

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki przyrodnicze

Część III



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2018

Redakcja naukowa

dr Marcin Baran, IOR - PIB

dr inż. Jędrzej Nyckowiak, UPP

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-65677-93-8)

ISBN (wydanie online 978-83-66139-00-8)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66139-01-5)

Ilość znaków w książce: 520 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 13.0

Data wydania: czerwiec 2018

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów, spis recenzentów zamieszczono na końcu książki. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

Spis treści

1. Korelacja struktury dominacji liczebności i współczynnika masy ciała zgrupowań wybranych grup Lepidoptera	7
<i>Baranowski Artur, Skrypko Malwina Barbara,</i>	
2. Skuteczność optymalizacji wielkości próby i czasu prowadzonych badań na podstawie badań grupy Lepidoptera	16
<i>Baranowski Artur, Jaworska Anna,</i>	
3. Functional properties of hydrogels	22
<i>Klaudia Brzoza, Katarzyna Czyżewska, Karolina Labus</i>	
4. Dressing materials based on hydrogels	30
<i>Klaudia Brzoza, Katarzyna Czyżewska, Karolina Labus</i>	
5. Wpływ niedoboru wody w glebie na cechy morfologiczne oraz wielkość i jakość plonu nasion soi (<i>Glycine max</i> (L.) MERR.)	38
<i>Czopek Katarzyna, Staniak Mariola</i>	
6. Catalase - characterization, industrial applications and sources of isolation – a review	45
<i>Katarzyna Czyżewska</i>	
7. Enzymatic degradation of lignocellulosic biomass – the importance and strategies in current technologies	51
<i>Katarzyna Czyżewska, Halina Maniak</i>	
8. Paratuberkuloza u zwierząt wolno żyjących	57
<i>Didkowska Anna, Orłowska Blanka, Żygowska Marta, Wadowska Iza</i>	
9. Rola <i>Mycobacterium avium</i> spp. <i>paratuberculosis</i> w etiologii choroby Leśniowskiego-Crohna	62
<i>Didkowska Anna, Orłowska Blanka, Żygowska Marta, Wadowska Iza</i>	
10. Charakterystyka, znaczenie i zastosowanie jonów miedzi w aktywności przeciwdrobnoustrojowej	67
<i>Monika Drózd, Dominik Straszak, Gabriela Widelska, Aleksandra Dymek, Jacek Skup, Monika Pitucha</i>	
11. Metody spektroskopowe oznaczania struktury związków kompleksowych z jonami metali	72
<i>Monika Drózd, Dominik Straszak, Gabriela Widelska, Aleksandra Dymek, Jacek Skup, Monika Pitucha</i>	
12. Procesy destrukcyjne zachodzące w tłuszczach roślinnych i wskaźniki jakości tłuszczów	77
<i>Gawrońska Monika, Szalińska Marta, Dzieciotł Małgorzata</i>	
13. Regioselektywność metalacji wybranych pochodnych pirazolu	84
<i>Górska Agnieszka, Mańko Diana</i>	
14. Porównanie zawartości wybranych składników odżywczych w tuszach typowych ofiar kotów domowych, a rekomendacje FEDIAF i AAFCO	92
<i>Górska Agnieszka, Anna Krajewska, Mańko Diana</i>	
15. Biotechnologiczne zastosowanie egzopolisacharydów bakteryjnych	99
<i>Kopycińska Magdalena, Lipa Paulina, Kozieł Marta</i>	
16. Charakterystyka czynników Nod: struktura, synteza, rola w symbiozie	108
<i>Magdalena Kopycińska, Marta Kozieł, Paulina Lipa</i>	

17. Adsorpcja biosurfaktantów na granicy faz woda-powietrze	115
<i>Mańko Diana, Górską Agnieszka</i>	
18. Wpływ budowy chemicznej biosurfaktantu na jego aktywność powierzchniową i krytyczne stężenie micelizacji	122
<i>Mańko Diana, Górską Agnieszka</i>	
19. Strategie wprowadzania systemu CRISPR/Cas9 do komórek roślinnych	129
<i>Olejnik Przemysław</i>	
20. Sandwiczowe ftalocyjaniny lantanowców – synteza i właściwości	135
<i>Zakrzyk Maja, Słota Rudolf</i>	

Przedmowa

Opracowanie przeznaczone jest dla wszystkich zainteresowanych zgłębianiem wiedzy z dość obszernego zakresu nauk przyrodniczych. Niniejsze wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” jest rezultatem współpracy w sferze naukowej, prezentujące dokonania młodych osób, które pragnęły podzielić się swoim dorobkiem naukowym z szeroką rzeszą czytelników. W serii opracowań zajmujących się dokonaniami młodych naukowców, zakres stawianych przed nimi zadań i działań ciągle rozszerza się. Nauki przyrodnicze zajmują się badaniem zachodzących zjawisk celem poznania rządzącymi nimi praw wykorzystując je dla dobra człowieka. W szybko rozwijających się naukach przyrodniczych, codziennie odkrywane są nowe zależności i powiązania z innymi obszarami nauki informujące o złożoności tej dziedziny. Obecnie utrwała się coraz bardziej i powszechniej przekonanie, że stosowanie jedynie kompleksowych badań z zakresu wszystkich dziedzin nauki, prowadzi do pełniejszego zrozumienia procesów. Konieczność znajomości zjawisk zachodzących w ówczesnym świecie wymusza na nas samych wdrożenie etapu samorozwoju poprzez zgłębienie wiedzy z wielu dziedzin nauki. Zagadnienia, którymi zajmują się badacze wymagają wykonania pewnej liczby doświadczeń. Doświadczenia te dają podstawę do wysuwania wniosków, które mogą wymagać dalszych, głębszych i wnikliwszych badań. W przyrodzie nie ma identyczności, więc uzyskane wyniki mogą być tylko pośrednimi w drodze tych badań.

Część pierwszej monografii poświęcono żywności i żywieniu, gdzie rozbito na elementy składowe, między innymi produkty mięsne, jak i drogi ich przetwarzania oraz przemian fizykochemicznych w celu wytwarzania produktów bardziej bezpiecznych i zdrowych. W drugiej części skupiono się na produkcji roślinnej, przedstawiając potencjał biotechnologiczny roślin i mechanizmy wpływu oraz ich pochodnych na życie człowieka. Wykorzystano także badania z zakresu zrównoważonego rolnictwa polepszające warunki fizykochemiczne gleby oraz roli instytucji rolniczych. W części trzeciej badania młodych naukowców ukierunkowane są w stronę zależności, roli oraz relacji grup organizmów zwierzęcych. Mowa jest tu o procesach destrukcyjnych, niedoborach oraz właściwościach struktur oraz strategiach działania jak również o stosowaniu nowych rozwiązań.

W części czwartej zgłębiane są zagadnienia nauk medycznych w oparciu o podejście do badanego procesu lub zależności ze strony genetycznej. Analizy zawierają oceny skuteczności i stabilności emulsji, olejków oraz próbek biologicznych w zastosowaniach biochemicznych przy użyciu całego spektrum metod badawczych.

Piąta z monografii zawiera rozdziały dotyczące działalności weterynaryjnej. Ukazane są tutaj zagrożenia na jakie narażeni jesteśmy ze strony zwierząt, a także całe bogactwo analiz przebiegów chorób, zaburzeń zwierząt domowych i gospodarskich. Nakreślono tu także role i genę zwierząt w symbiozie z człowiekiem.

Część szósta omawia i skupia się na oddziaływaniach wewnątrz środowiskowych. Badania zawarte w tej części opisują zależności i presję środowiska oraz powiązania składowych łańcuchów zależności biotycznych. Uwidocznione i proponowane są tutaj nowe narzędzia oceny i rozwiązania wpływające na bioróżnorodność fauny i flory.

Zespół redakcyjny ma nadzieję, że zawarte w tym opracowaniu wiadomości z zakresu nauk przyrodniczych umożliwią czytelnikom zrozumienie i zapoznanie się z wiadomościami niezbędnymi do otwarcia na wiele dyscyplin nauki oraz zjawisk zachodzących w otaczającym nas świecie. Mamy także nadzieję, że przystępność formy przypadnie Państwu do gustu i przyczyni się do propagowania dokonań młodych naukowców. Zdajemy sobie sprawę, że pełne i całkowite zrozumienie przedstawionych w zestawieniu prac o tak szerokiej tematyce jest rzeczą trudną i skomplikowaną lecz nie niemożliwą. Wszystko wymaga pewnej dyskusji wśród zainteresowanych oraz uzgodnienia własnych poglądów.

dr Marcin Baran
Instytut Ochrony Roślin - PIB

1. Korelacja struktury dominacji liczebności i współczynnika masy ciała zgrupowań wybranych grup Lepidoptera

Correlation of dominance and body mass index chosen groups of Lepidoptera

Baranowski Artur, Skrypko Malwina Barbara,

Wydział Biologii i Nauk o Środowisku, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie

Artur Baranowski: a.baranowski@uksw.edu.pl

Słowa Kluczowe: Wigierski Park Narodowy, Macrolepidoptera

Streszczenie

Badania terenowe prowadzone były w Wigierskim Parku Narodowym od lipca do listopada w roku 2009 i służyły głównie zebraniu materiału do pomiarów i analiz. W tym okresie zebrano 18 prób. W sumie przy użyciu standardowej samolówki z żarówką rtęciowo-żarową, odłowiono 502 osobniki motyli i 56 gatunków (Lepidoptera) z kilku rodzin Macrolepidoptera: Arctiidae, Drepanidae, Thyatiridae, Lymantriidae, Notodontidae oraz Sphingidae. Wszystkie złapane osobniki mierzono według ustalonego schematu nadając im odpowiedni indeks stanowiący podstawę nadania współczynnika masy. Następnie dokonano analizy struktury dominacji na podstawie liczebności oraz współczynnika masy ciała, celem sprawdzenia w jaki sposób te dwa sposoby ułożenia gatunków w kolejnych klasach dominacji różnią się i które z gatunków odgrywają decydującą rolę w zgrupowaniu nie ze względu na liczebność ale masę ciała. Badania i ich wyniki należy traktować jako wstępne ze względu na nieliczną reprezentację gatunków i osobników.

1. Wstęp

Jednym z głównych problemów w ekologii jest wyznaczenie i zrozumienie wzorców rozmieszczenia oraz liczebności gatunków (Magurran i Henderson 2003). Jedną ze znanych i dobrze udokumentowanych reguł jest fakt, iż populacje składają się z niewielu bardzo licznych gatunków oraz dużej liczby gatunków określanых jako rzadkie, co odbija się w charakterystycznym kształcie tzw. SADs (species abundance distributions), czyli wklęsłym rozkładzie liczebności (Simons i in. 2015). Zrozumienie i poznanie skutków takiego rozkładu to również jedno z najstarszych pytań stawianych w ekologii ale też wciąż znajdująca się w zainteresowaniu wielu badaczy kwestia naukowa (Locey i White 2013; Majumdar i in. 2016). Zebrane dane dotyczące liczebności służą z jednej strony pomiarowi cech bioróżnorodności, a uzupełnienie prostego bogactwa gatunkowego względną liczebnością pozwala na szersze definiowanie tej hierarchicznej właściwości bogactwa gatunkowego (Majumdar i in. 2016), mimo wielu jej ograniczeń. Generalny rozkład liczebności (rozkłady log-normalne), a szczególnie mechanizm generowania dużej liczby gatunków rzadkich, znalazł swoje wyjaśnienie już dawno (Sugihara 1980), choć później zostało to uzupełnione przez innych badaczy (np. Magurran i Henderson 2003). Kiedy mówimy o liczebności, często mamy na myśli mówiąc o gatunkach najliczniejszych, iż odgrywają one największą rolę w zespole. Oczywiście w ogóle tak nie musi być, ponieważ najważniejszą rolę w zgrupowaniu odgrywają te gatunki, przez które przepływa największa energia, tj. mające największą biomasę. W związku z tym badacze zaczęli używać innej skali do oznaczenia dominacji na podstawie biomasy a nie liczebności. Szacowanie całkowitej biomasy jest niezwykle ważne również z punktu widzenia ogromnej liczebności stawonogów w ogóle (Sample i in. 1993) są one bowiem m.in. źródłem pokarmu dla wielu kręgowców. Wstępne badania wykonane już dość dawno temu przez Rogers i inni (1977) wskazują, iż współczynnik pomiarów i wagi różni się istotnie między taksonami ale również wewnątrz taksonów, również jeśli dotyczy to tego samego gatunku ale pochodzącego z różnych szerokości geograficznych (Schoener 1980). Wielu autorów sugeruje, iż takie współczynniki powinny być wytyczane dla lokalnych faun (Rogers i in. 1976; Sample i in. 1993; Hodar 1996). Do dziś relatywnie niewiele jest badań w których wykonano takie pomiary (Johnson i Strong 2000; Ribeiro i Freitas 2011; Schoener 1980; Simonsen i Kristensen 2003). Istnienie dziś wielu badań koncentrujących się

wokół pomiarów wyłącznie rozpiętości skrzydeł, pomiarów szerokości i długości, a wyznaczenia indeksu masy na podstawie długości ciała jest daleko niedokładne i niewystarczające (García-Barros 2015). Tendencją jaką dotychczas zaobserwowano w pomiarach grupy Lepidoptera w relacji pomiędzy ciężarem ciała a pojedynczym pomiarem np. rozpiętością skrzydeł bądź długością ciała, jest delikatnie negatywny trend allometryczny, nieproporcjonalny. Wskazuje on na stosunkowo lżejszą masę ciała przy dużych gatunkach w stosunku do mniejszych gatunków, których ciała są relatywnie cięższe (García-Barros 2015).

Do pomiaru indeksu masy ciała, służącego ostatecznie oszacowaniu ciężaru żywego osobnika, użyto dotychczas wiele różnych technik. Jedną z nich jest metoda fotograficzna ale daje one w badanych przypadkach dokładność w zakresie 12%-25% błędu, a autorzy sugerują, iż powinny zostać wykonane dalsze badania aby zwiększyć dokładność metody (Smiley i Wisdom 1982). Mimo generalnej akceptacji użycia indeksów masy bądź pomiarów wagi do szacunków ekologicznych (np. Miller 1977), takie badania należą do rzadkości i to w ograniczonym zakresie (Agosta i Janzen 2005; Davis i in. 2012). Publikowane dane dokonanych pomiarów wagi i badania relacji z pomiarami dotyczą ponadto niewielu gatunków motyli i ciem. Związane jest to z praktycznymi trudnościami zdobycia żywych osobników pochodzącymi z różnych regionów (Agosta i Janzen 2005; Davis i in. 2012).

Z tego względu podjęto w tej pracy próbę porównania różnych technik i parametrów pomiaru w celu określenia gatunkowych struktur dominacji na bazie różnych technik. Autorzy pracy zakładali, iż przede wszystkim, iż struktura dominacji oparta na liczebności przedstawia inne gatunki w głównych klasach w porównaniu ze strukturą dominacji opartą o zastosowany indeks masy ciała.

Po zakończeniu tych prac zaplanowano kolejne etapy badań poszerzone o pomiary wagi żywych osobników poszczególnych gatunków, pomiary wagi osobników wysuszonych znajdujących się w zbiorach oraz pomiary różnych długości w celu wyznaczenia dokładnych parametrów i oceny skuteczności różnych technik pomiaru.

2. Materiał i Metody

Podstawową metodą gromadzenia materiałów były odłowy na przynęty świetlne - samolówka z żarówką rtęciowo-żarową MIX 250W. Samolówka została umieszczona na terenie Wigierskiego PN. Odłowy prowadzono od lipca do listopada 2009 roku, w sumie 18 prób. Złapane okazy mierzono za pomocą suwmiarki elektronicznej do drugiego miejsca po przecinku, według schematu (Rys. 1), oznaczano i wpisywano do bazy danych. Każdy pomiar wykonywano dwukrotnie a wartość średnią wpisywano do bazy. Każdy gatunek był reprezentowany przez kilka osobników od 1 do 15, w zależności od częstości obserwacji danego gatunku. Oznaczeń gatunków dokonywano na podstawie dostępnej literatury oraz zbioru porównawczego.

Pomiaru indeksu masy polegał na wykonaniu kilku pomiarów pokazanych graficznie na rycinie 2: Pierwsza wartość: A - długość ciała (A_1) - od końca odwłoka do czubka głowy + szerokość tułowia (A_2). Druga wartość: B - rozpiętość skrzydeł

Trzecia wartość: C a w tym:

C_1 - obwód przedniego skrzydła w obrysie trójkąta (C_{1A} od nasady skrzydła do wierzchołka górnego;

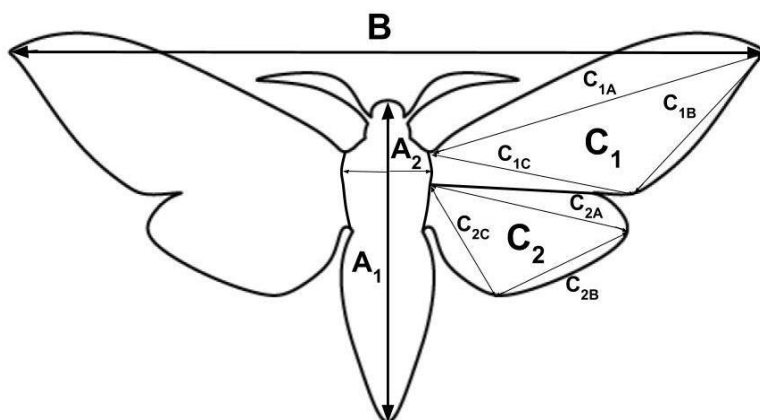
C_{1B} od wierzchołka górnego do wierzchołka dolnego; C_{1C} od wierzchołka dolnego do nasady skrzydła);

C_2 - obwód tylnego skrzydła w obrysie trójkąta (C_{2A} od nasady skrzydła do wierzchołka górnego;

C_{2B} od wierzchołka górnego do wierzchołka dolnego; C_{2C} od wierzchołka dolnego do nasady skrzydła).

Wartości obu skrzydeł pomnożono przez 2.

Wszystkie wartości następnie sumowano $A + B + C$, co dało wartość tzw. współczynnika indeksu masy. Wyznaczono również index masy ciała na podstawie wyłącznie rozpiętości skrzydeł jako średnia wartość pochodząca z danych literaturowych wspólnie dla samców i samic, w celu porównania skuteczności w określaniu struktury dominacji.



Rys. 1. Sposób wytyczenia indeksu masy ciała na podstawie pomiarów.

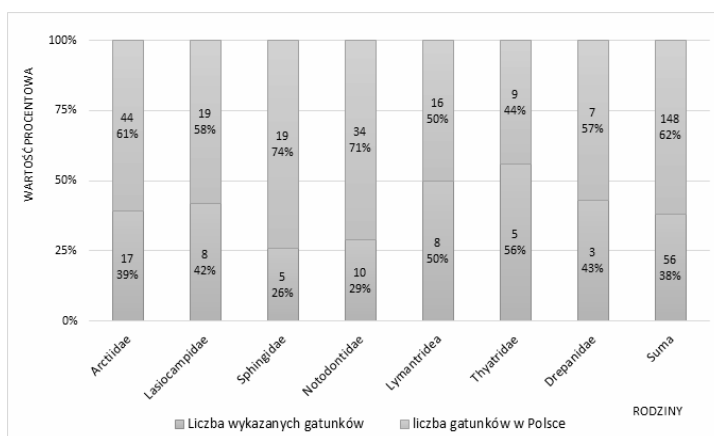
3. Wyniki i dyskusja

W trakcie badań zaobserwowano 174 gatunki i 2763 osobniki ale podstawą do przeprowadzonej niniejszej analizy, była baza danych 56 gatunków i 502 osobników pochodzących z kilku wybranych rodzin motyli, co przedstawia Tab. 1. Liczba gatunków w poszczególnych rodzinach procentowo na tle kraju przedstawia Rys. 2. Z uwagi na dość krótkie badania terenowe ale bogaty przyrodniczo teren udało zebrać się dość reprezentatywną grupę gatunków na terenie który wcześniej nie był szeroko badany. Badania miały szerszy charakter, a niniejsza praca ujawnia tylko fragment prowadzonych prac na tym terenie.

Tab. 1. Zaobserwowane gatunki wraz z liczebnością.

Lp.	Rodzina / Gatunek	liczebność	Lp.	Rodzina / Gatunek	liczebność
Arctiidae			Notodontidae		
1	Thumata senex	9	31	Phalera bucephala	1
2	Miltochrista miniata	54	32	Furcula furcula	1
3	Cybosia mesomella	4	33	Pheosia gnoma	1
4	Pelosia muscerda	2	34	Notodonta dromedarius	2
5	Eilema lutarella	2	35	Notodonta torva	1
6	Eilema complana	24	36	Notodonta ziczac	3
7	Eilema deplana	7	37	Pterostoma palpina	2
8	Lithosia quarda	2	38	Ptilodon capucina	5
9	Atolmis rubicollis	3	39	Clostera curtula	6
10	Coscinia cribraria	2	40	Clostera anastomosis	1
11	Arctia caja	6	Lymantiridae		
12	Spilosoma lubricipeda	17	41	Orgyia antiqua	5
13	Spilosoma urticae	1	42	Calliteara abietis	7
14	Spilosoma lutea	3	43	Calliteara pudibunda	9

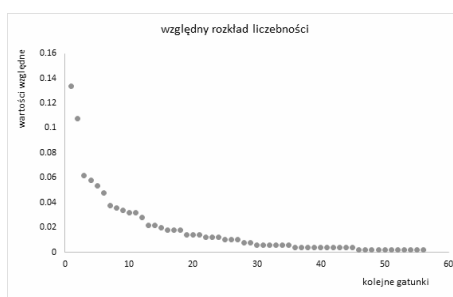
Lp.	Rodzina / Gatunek	liczebność	Lp.	Rodzina / Gatunek	liczebność
Arctiidae			Lymantriidea		
15	<i>Spiris striata</i>	19	44	<i>Euproctis chryssorrhoea</i>	10
16	<i>Phragmatobia fuliginosa</i>	18	45	<i>Euproctis similis</i>	3
17	<i>Callimorpha dominula</i>	1	46	<i>Leucoma salicis</i>	1
Lasiocampidae			47	<i>Lymantria monacha</i>	11
18	<i>Poecilocampa populi</i>	31	48	<i>Lymantria dispar</i>	3
19	<i>Trichiura crataegi</i>	2	Thyatridae		
20	<i>Malacosoma neustria</i>	16	49	<i>Thyatira batis</i>	29
21	<i>Lasiocampa trifolii</i>	1	50	<i>Habrosyne pyritoides</i>	14
22	<i>Dendrolimus pini</i>	7	51	<i>Tethea or</i>	27
23	<i>Eutrix potatoria</i>	4	52	<i>Tethea fluctuosa</i>	6
24	<i>Gastropacha quercifolia</i>	2	53	<i>Ochropacha duplaris</i>	5
25	<i>Odonestis pruni</i>	1	Drepanidae		
Sphingidae			54	<i>Falcaria lacertinaria</i>	9
26	<i>Sphinx pinastri</i>	11	55	<i>Drepana falcataria</i>	67
27	<i>Mimas tiliae</i>	1	56	<i>Drepana curvatula</i>	16
28	<i>Smerinthus ocellatus</i>	3			
29	<i>Laothoe populi</i>	2			
30	<i>Deilephila elpenor</i>	2			



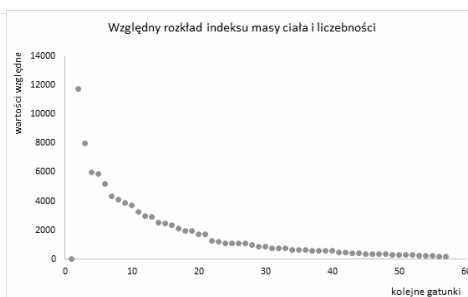
Rys. 2. Liczba gatunków w poszczególnych rodzinach oraz odłowiony w kraju w Wigierskim Parku Narodowym procent na tle liczby gatunków. Na słupkach umieszczono wartości liczbowe: liczby gatunków oraz procent.

Do zobrazowania skali i wytyczenia gatunków dominujących tzw. eudominantów i dominantów użyto krzywą wklęsłą rozkładu liczebności (Rys. 3) oraz krzywą wklęsłą rozkładu według indeksu masy (Rys. 4). Dla większości wielogatunkowych zgrupowań owadów krzywe liczebności przyjmują taki właśnie rozkład i jest on oczekiwanym rozkładem, którego mechanizm został zaproponowany przez Sugiharę (Sugihara 1980). Dominację określono na podstawie przyjętych w literaturze klas dominacji (Kasprzak, Niedbała 1981). W kolejnych rycinach przedstawiono gatunkową strukturę dominacji w dwóch pierwszych klasach eudominantów i dominantów oddzielnie dla struktur wyznaczonych na podstawie liczebności (Rys. 5) i indeksu masy ciała (Rys. 6). Następnie podobnie dla klasy subdominantów.

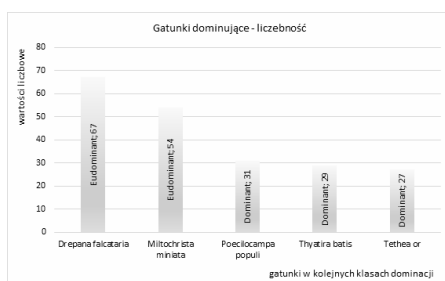
W kolejnych Rys. 7-8 oraz Tab. 2-3 pokazano dynamikę zmian w każdej z trzech klas dominacji tj. eudominantów, dominantów oraz subdominantów. Na rycinach przedstawiono każdą z zastosowanych miar używanych do określania indeksu masy ciała. Pogrubioną wyraźnie linię zastosowano do przedstawienia dominacji na podstawie liczebności. Warto zauważyć, iż mimo zasadniczo dość równomiernego rozkładu poszczególnych miar w kolejnych gatunkach, zmiany i dynamiczne różnice są jednak obserwowane. Są one spowodowane inną wagą danego pomiaru co w konsekwencji doprowadza do zmiany w kolejności w danej klasie wśród gatunków a nawet klasyfikacji do innej klasy.



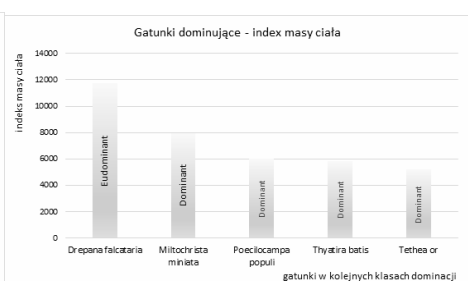
Rys. 3. Krzywa wklęsła względnego rozkładu liczebności.



Rys. 4. Krzywa wklęsła względnego rozkładu indeksu masy zgodnie z liczebnością każdego gatunku



Rys. 5. Klasy dominacji w strukturze dominacji opartej na liczebności.



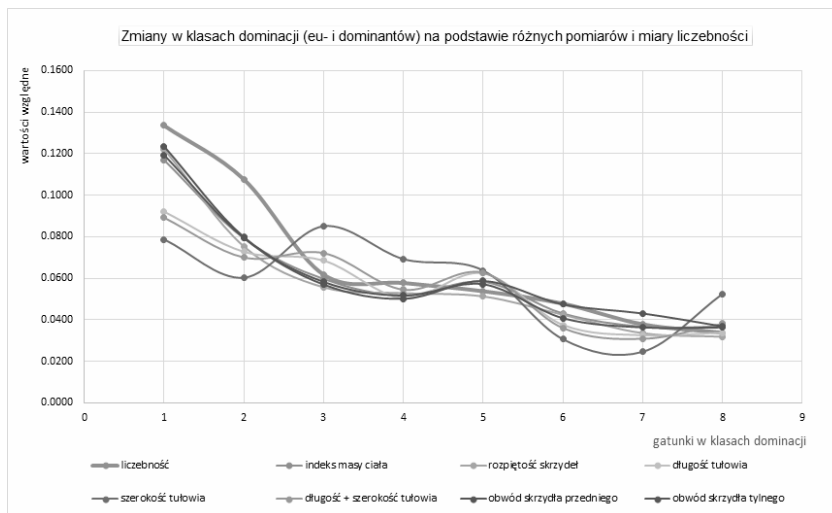
Rys. 6. Klasy dominacji w strukturze dominacji opartej na indeksie masy ciała uwzględniając liczebność zgrupowania.

W tabelach pogrubioną czcionką zaznaczono miary tych gatunków, których wartości odnosiły się do klasy eudominantów i dominantów (Tab. 2) oraz subdominantów (Tab. 3) i były spójne z generalnie z wyznaczoną dominacją na podstawie liczebności. Odstępstwa dotyczyły 5 przypadków dla 3 gatunków.

W klasie subdominantów dynamika zmian jest znacznie bardziej widoczna niż w dwóch poprzednich klasach co przedstawia Rys. 8 oraz Tab. 3. Zmiany w tej klasie dotyczą 16 przypadków i 5 gatunków.

Na Rys. 7-8 pokazano trzy najważniejsze klasy dominacji i ich wzajemne dynamiczne relacje. Klasy dominacji wyznaczono miarą liczebności (pogrubiona linia) i porównano ją z różnymi

pomiarami metrycznymi. Kolejnych dwóch klas dominacji (recedentów i subrecedentów) nie przedstawiono, ale ich dynamika i różnice są również bardzo wyraźne. Aby porównać dwa zbiory tj. klasę dominacji dotyczącą liczebności oraz klasę dominacji dotyczącą ogólnego indeksu masy ciała, użyto testu parametrycznego dla dwóch zmiennych par powiązanych używając danych względnych dla wszystkich gatunków we wszystkich klasach. Porównywano tu różnicę w każdej z kolejnych par tego samego gatunku w klasie dominacji opartej o liczebność oraz indeks masy ciała.



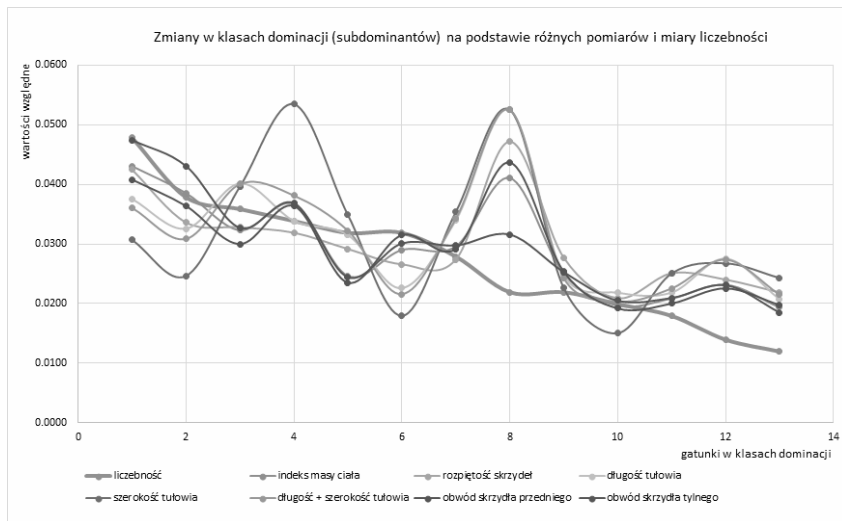
Rys. 7. Porównanie wartości względnych liczebności z różnymi średnimi miarami.

Tab. 2. Zmiany statusu gatunków wewnątrz klasy oraz pomiędzy klasami dominacji - eudominacji i dominacji.

gatunek / wartości względne	liczebność	indeks masy ciała	rozpiętość skrzydeł	długość tułowia	szerokość tułowia	długość + szerokość tułowia	obwód skrzydła przedniego	obwód skrzydła tylnego
<i>Drepana falcataria</i>	0.1335	0.1169	0.1221	0.0921	0.0787	0.0892	0.1235	0.1193
<i>Mitochrista miniata</i>	0.1076	0.0792	0.0753	0.0727	0.0603	0.0700	0.0798	0.0794
<i>Poecilocampa populi</i>	0.0618	0.0597	0.0557	0.0685	0.0851	0.0721	0.0583	0.0570
<i>Thyatira batis</i>	0.0578	0.0518	0.0528	0.0504	0.0693	0.0545	0.0517	0.0501
<i>Tethea or</i>	0.0538	0.0583	0.0513	0.0624	0.0638	0.0627	0.0571	0.0587
<i>Eilema complana</i>	0.0478	0.0431	0.0425	0.0376	0.0307	0.0361	0.0408	0.0474
<i>Spiris striata</i>	0.0378	0.0367	0.0336	0.0326	0.0246	0.0309	0.0364	0.0431
<i>Spilosoma lubricipeda</i>	0.0339	0.0367	0.0319	0.0339	0.0525	0.0381	0.0364	0.0369
<i>Sphinx pinastri</i>	0.0219	0.0411	0.0472	0.0525	0.0535	0.0525	0.0437	0.0316

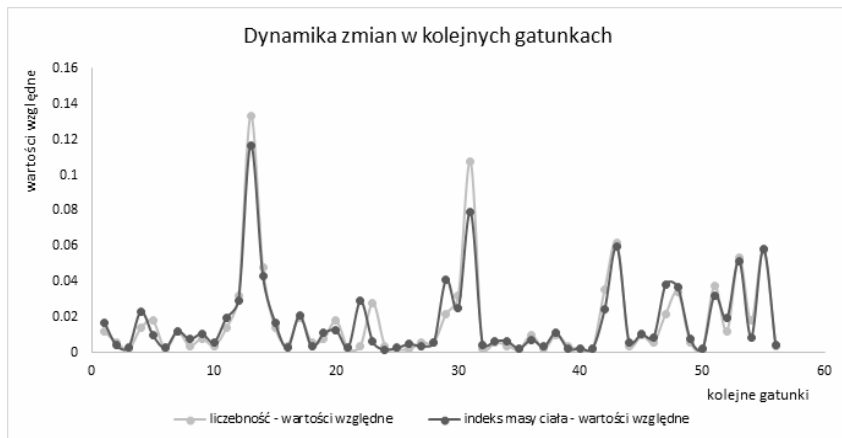
Tab. 3. Zmiany statusu gatunków wewnątrz klasy oraz pomiędzy klasami dominacji - subdominacji.

gatunek / wartości względne	liczebność	indeks masy ciała	rozpiętość skrzydeł	długość tułowia	szerokość tułowia	długość + szerokość tułowia	obwód skrzydła przedniego	obwód skrzydła tylnego
<i>Eilema complana</i>	0.0478	0.0431	0.0425	0.0376	0.0307	0.0361	0.0408	0.0474
<i>Spiris striata</i>	0.0378	0.0385	0.0336	0.0326	0.0246	0.0309	0.0364	0.0431
<i>Phragmatobia fuliginosa</i>	0.0359	0.0323	0.0328	0.0402	0.0397	0.0401	0.0300	0.0327
<i>Spilosoma lubricipeda</i>	0.0339	0.0367	0.0319	0.0339	0.0535	0.0381	0.0364	0.0369
<i>Malacosoma neustria</i>	0.0319	0.0247	0.0292	0.0315	0.0349	0.0322	0.0235	0.0244
<i>Drepana curvatula</i>	0.0319	0.0290	0.0266	0.0226	0.0179	0.0216	0.0315	0.0301
<i>Habrosyne pyritoides</i>	0.0279	0.0296	0.0274	0.0340	0.0354	0.0343	0.0292	0.0298
<i>Sphinx pinastri</i>	0.0219	0.0411	0.0472	0.0525	0.0525	0.0525	0.0437	0.0316
<i>Lymandria monacha</i>	0.0219	0.0250	0.0277	0.0248	0.0226	0.0243	0.0254	0.0253
<i>Euproctis chrysorrhoea</i>	0.0199	0.0197	0.0209	0.0218	0.0150	0.0204	0.0192	0.0205
<i>Calliteara pudibunda</i>	0.0179	0.0208	0.0251	0.0218	0.0251	0.0225	0.0200	0.0209
<i>Dendrolimus pini</i>	0.0139	0.0232	0.0240	0.0275	0.0268	0.0274	0.0226	0.0231
<i>Arctia caja</i>	0.0120	0.0194	0.0219	0.0207	0.0243	0.0215	0.0198	0.0185



Rys. 8. Porównanie wartości względnych liczebności z różnymi średnimi miarami w kolejnych gatunkach.

Wynik testu T studenta $p=0.8925$ nie pozwala na przyjęcie tezy o podobieństwie klas dominacji budowanych na podstawie liczebności i indeksu masy ciała. Wskazuje on na brak podobieństwa klas dominacji opartych na pomiarach ciała tworzących indeks masy ciała względem klas dominacji opartych na liczebności. Dodatkowo relację zmian poszczególnych gatunków w dwóch parametrach tj. liczebności i indeksu masy ciała pokazuje Rys. 9. Wynik ma prawie 11% błędu, sugeruje raczej konieczność przeprowadzenia dalszych badań na większej próbie, oraz z zastosowaniem innych pomiarów w tym wagi suchej i żywych osobników.



Rys. 9. Dynamika zmian wszystkich gatunków w relacji liczebność i indeks masy ciała.

Jak wskazują dane na Rys. 3 i 4, obie wartości tj. liczebności i sumy indeksu masy ciała przybierają postać typowej krzywej wklęsłej, przyjmując charakter rozkładu normalnego (dane niepublikowane). Kolejne ryciny 5 i 6 wskazują na gatunki eudominanty i dominanty. Porównanie tych gatunków w tych klasach według rozkładu liczebności i indeksu masy ciała prowadzi do wniosku, iż są one zbudowane zasadniczo z tych samych gatunków, choć obserwuje się zmianę klasy z eudominanta do dominanta. Ponieważ eudominanty pełnią w środowisku kluczową rolę taka zmiana jest istotną.

Na kolejnych Rys. 7 i 8 a także Tab. 2 i 3 przedstawiono dynamikę zmian różnych parametrów pomiaru. Analizy te ujawniają brak równie stabilnego pomiaru w porównaniu do klas

opartej o liczebność. Poza brakiem stabilności obserwuje się duże stosunkowo wahania w kolejności gatunków w kolejnych klasach.

Kolejne klasy dominacji tj. recedentów i gatunków akcesorycznych również wskazują na brak korelacji tj. współwystępowania tych samych gatunków w klasach dominacji (dane niepublikowane).

4. Wnioski

Choć badania mają charakter wstępny ich wyniki wskazują, iż poszczególne klasy dominacji, choć są dość stabilne w różnych miarach to jednak mogą być budowane przez inne zestawy gatunków, jeżeli chodzi o kolejność danych gatunków w klasach lub nawet zmieniają one klasę na wyższą bądź niższą. Takie wahania mają miejsce porównując zgrupowania pod względem klas budowanych na podstawie liczebności i indeksu masy ciała, ale również wszystkich innych badanych miar. Przedstawione diagramy oraz wynik testu statystycznego również wskazują na brak zadowalającej korelacji użytych miar. W związku z tym trudno jest zaakceptować na wysokim poziomie dokładności miary i indeksy oparte o np. rozpiętość skrzydeł. Koniecznym wydaje się przeprowadzenie pomiarów opartych o ważenie żywych osobników i dokonanie następnie statystycznej analizy użyteczności przyjętych i używanych częściowo miar w badaniach. Podejście biorące pod uwagę indeks masy wydaje się być najbardziej użytecznym ze względu na rzeczywistą rolę jaką te gatunki zajmują w przestrzeni ekosystemu. Niestety podejście takie nie jest często spotykane w badaniach faunistycznych w ogóle. Brak jest również szerokich badań tej grupy i wyznaczenia istotnych wskaźników dla poszczególnych gatunków. To oczywiście nie pozwala właściwie patrzeć na poszczególne gatunki i ich rolę jaką pełnią w środowisku (Morris, 2014) w poszczególnych badaniach faunistycznych.

Z tego powodu należy wykonać pomiary przyżyciowe gatunków oraz spreparowanych osobników znajdujących się w kolekcjach dla szeroko reprezentowanych przez co najmniej 100 osobników każdej z płci danego gatunku, pochodzących z tego samego rejonu geograficznego, a następnie dokonanie dokładnej analizy i oceny przydatności zastosowanych pomiarów oraz indeksów opartych o osobniki spreparowane. Dokonanie pomiaru może być również przeprowadzone w innych wariantach, a ponowna analiza wielu dotychczas wykonanych badań mogłaby pozwolić na nowo spojrzeć na tę grupę owadów w ich środowisku i ich roli jaką odgrywają.

Ogólne rekomendacje do dalszych badań z przeprowadzonego przeglądu literatury oraz wstępnych badań własnych są następujące:

- 1) Wykonanie estymowanego indeksu suchej masy motyli dostępnych w zbiorach muzealnych, naukowych i kolekcjonerów poprzez ich zważenie i oszacowanie ciężaru szpilek.
- 2) Wykonanie ważenia przyżyciowego najszerzej możliwej grupy motyli.
- 3) Stworzenie bazy danych indeksu masy ciała, w tym rzeczywistych pomiarów wagi, z wykonanymi pomiarami docelowo dla 100 osobników każdej z płci i udostępnienie jej publicznie tak aby osoby wykonujące badania w podobnym przedmiocie mogły wykonać dodatkowe analizy.
- 4) Sprawdzenie dokładności relacji poszczególnych pomiarów, w tym indeksu masy ciała w stosunku do suchej masy oraz żywych osobników.

5. Literatura

- Agosta SJ, Janzen DH (2005) Body size distributions of large Costa Rican dry forest moths and the underlying relationship between plant and pollinator morphology. *Oikos* 108: 183–189.
- Davis RB, Javois J, Pienaar J i.in. (2012) Disentangling determinants of egg size in the Geometridae (Lepidoptera) using an advanced phylogenetic comparative method. *Journal of Evolutionary Biology* 25: 210–219.
- García-Barros E (2015) Multivariate indices as estimates of dry body weight for comparative study of body size in Lepidoptera. *Nota Lepidopt.* 38(1): 59-74.
- Hodar JA (1996) The use of regression equations for estimation of arthropod biomass in ecological studies. *Acta Oecologica* 17: 421-433.

- Johnson MD Strong AM (2000) Length-Weight relations of Jamaican Arthropods. *Entomological News*. 111 (4): 270-281.
- Kasprzak K, Niedbała W (1981) Wskaźniki biocenotyczne stosowane przy porządkowaniu i analizie [W:] Górny M, Grum L. (red.): *Metody stosowane w zoologii gleby*. PWN, Warszawa: 397-409.
- Locey KJ, White EP (2013) How species richness and total abundance constrain the distribution of abundance. *Ecology Letters*, 16: 1177–1185.
- Magurran AE, Henderson PA (2003) Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. *Nature* 422: 714–716.
- Majumdar S, Chaki KK, Roy S i.in. (2016) Species-abundance distribution (SAD) of sarcosaprophagous fly population guild. *J. Ent Z Stud* 4(2): 347-360.
- Miller WE (1977) Wing measure as a size index in Lepidoptera: the family Olethreutidae. *Annals of the Entomological Society of America* 70: 253–256.
- Ribeiro DB, Freitas AVL (2011) Large-sized insects show stronger seasonality than small-sized ones: a case study of fruit-feeding butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, Vol. 104, 4: 820–827.
- Rogers LE, Buschbom L, Watson CR (1977) Length-weight relationship of shrub-steppe invertebrates. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70: 51-53.
- Rogers LE, Hinds WT, Buschbom RL (1976) A General Weight vs. Length Relationship for Insects. *Ann Ent Soc Am*, Vol. 69, 2: 387–389.
- Sample BE, Cooper RJ, Greer RD, Whitmore RC (1993) Estimation of insect biomass by length and width. *Am. Midl. Nat.* 129: 234-240.
- Schoener TW (1980) Length-Weight Regressions in Tropical and Temperate Forest-Understory Insects. *Ann Ent Soc Am*, Vol. 73, Issue 1, 106–109.
- Simons N K, Gossner MM, Lewinsohn TM i.in. (2015) Effects of land-use intensity on arthropod species abundance distributions in grasslands. *J Anim Ecol*, 84: 143–154.
- Simonsen TJ, Kristensen NP (2003) Scale length/wing length correlation in Lepidoptera (Insecta). *Journal of Natural History* Vol. 37, Issue 6.
- Smiley JT, Wisdom CS (1982) Photographic Estimation of Weight of Insect Larvae. *Annals of the Entomological Society of America*, Vol. 75, 6: 616–618.
- Sugihara G (1980) Minimal community structure: an explanation of species abundance patterns. *American Naturalist*. 116: 770–787.

2. Skuteczność optymalizacji wielkości próby i czasu prowadzonych badań na podstawie badań grupy Lepidoptera

The effectiveness of the sample size and time of the research based on Lepidoptera study

Baranowski Artur, Jaworska Anna,

Wydział Biologii i Nauk o Środowisku, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie

Artur Baranowski: a.baranowski@uksw.edu.pl

Słowa kluczowe: metodologia badań, monitoring, Macrolepidoptera, estymacja.

Streszczenie

Głównym celem badań było wstępne określenie teoretycznej optymalnej wielkości próby służącej oszacowaniu całkowitej liczby gatunków w terenowych badaniach lepidopterologicznych na podstawie wykonanych badań terenowych oraz ich późniejszej analizie i symulacji. Otrzymany wynik optymalnej wielkości próby może być pomocny w przyszłych badaniach, wskazując ile pobierać prób i jaka jej wielkość musi zostać osiągnięta, w zależności od dokładności oczekiwanego wyniku. Taki wynik może być również pomocny w zoptymalizowaniu wielkości próby celem oszacowania bogactwa gatunkowego. To wszystko znacznie zmniejsza koszty oraz czas prowadzenia badań terenowych i tym samym daje optymalny pogląd na ocenę lokalnej bioróżnorodności w badaniach porównawczych. Badania te prowadzono w północno-wschodniej Polsce, w miejscowości Plewki w latach 2008-2009. Do odłowu fauny Lepidoptera użyto samolówek świetlnych z żarówką rtęciowo-żarówą. W sumie zebrano 6761 osobników, 242 gatunki w 35 próbach.

1. Wstęp

Zrozumienie zmian zachodzących w lokalnej i regionalnej bioróżnorodności w czasie i siedlisku wymaga wdrożenia monitoringu obejmującego użycie najlepiej dostosowanej do danej grupy organizmów metody czy techniki pobierania prób ale również określenie najbardziej optymalnej liczby prób, biorąc pod uwagę czas i koszty prowadzenia takich obserwacji. Z faktem tym wiąże się również nierozłączne określenie bogactwa gatunkowego, co jest od dawna w centrum zainteresowań nauki bioróżnorodności (Magurran 2004). Poza tym wybór takiej metody powinien określać jej wpływ na lokalną bioróżnorodność (Bosch i in. 2017).

Wyznaczenie optymalnej wielkości próby w badaniach entomologicznych jest bardzo istotne, ponieważ w zasadzie nigdy nie jesteśmy w stanie wykazać wszystkich gatunków występujących na danym terenie (Gotelli i Colwell 2001). Pobieranie prób w terenie oraz identyfikacja gatunkowa jest poza tym bardzo czasochłonna i tym samym kosztowna. Dodatkowo istotnie dużą frakcję stanowią gatunki o bardzo małej liczebności, które zwykle są nie odnotowywane w badaniach monitoringowych, a są one najważniejsze z punktu widzenia oceny bogactwa gatunkowego danego terenu. Dlatego też metody statystyczne szacujące całkowitą liczbę gatunków są bardzo często stosowane, a oparte o gatunki już odłowione i ogólną liczebność zgrupowania poszczególnych gatunków. Choć same estymatory bogactwa gatunkowego nie wskazują na wielkość próby (liczbę osobników) jaką należy pobrać aby uwidocznić w niej wcześniej nie odłowioną a szacowaną w estymatorach liczbę gatunków, to nowe narzędzia statystyczne pomagają ocenić wielkość takiej minimalnej próby (liczbę osobników) z dużym prawdopodobieństwem (Chao 2009). Wiele badań wskazuje na to, iż aby wykazać całkowitą liczbę gatunków na danym terenie, należy pobrać wielokrotność pobranej sumy prób we wcześniejszych badaniach i waha się ona w granicach od 1.05 do 10.67 wielokrotności. Wyraźnie mniejszy wysiłek należy włożyć aby wykazać 90% wszystkich gatunków, i waha się on od 0.33 do 1.1 wielokrotności (Chao 2009).

Wyznaczenie takiej optymalnej próby jest bardzo użyteczne w monitoringu ale i w badaniach, choć każda metoda ma swoje zalety jak i ograniczenia. Wielu autorów sugeruje także konieczność użycia wielu współwystępujących metod pobierania prób, (Baker i in. 2017) choć dla

grupy Macrolepidoptera ale również wielu Microlepidoptera, odłów na światło jest metodą najbardziej reprezentatywną, dającą możliwość rozpoznania szerokiej filogenetycznej grupy. I jak pokazuje praktyka w przeważającej większości badań, monitoring oparty jest zwykle na jednej metodzie pobierania prób (Bosch i in. 2017).

Prowadzenie badań i monitoringu jest konieczne w ochronie przyrody ze względu na obecność wielu czynników antropogenicznych erodujących różnorodność biocenotyczną (Cardinale i in. 2012; Naeem, Duffy i Zavaleta, 2012) i bez ich prowadzenia nie jesteśmy w stanie określić ich wpływu, a tym samym przewidywać skutków jakie niesie za sobą antropopresja i podjęć działań niwelujących owe oddziaływanie.

2. Materiał i Metody

Podstawową metodą gromadzenia materiałów były odłowy na przynęty świetlne - samolówka z żarówką rtęciowo-żarową MIX 250W. Samolówka została umieszczona na granicy dwóch środowisk otwartego o charakterze rolniczym w pobliżu lasu, w bezpośredniej odległości od zabudowań. Odłowy prowadzono od lipca do października 2008 r, w sumie 35 prób w miejscowości Plewki w północno-wschodniej Polsce. Do sporządzenia pełnej listy gatunków, odłowy uzupełniające prowadzono w roku następnym w okresie od wczesnej wiosny do lata, co w sumie dało 54 prób. Do analiz użyto jednak bazę 6761 rekordów - tj. osobników, 35 prób oraz ujawnione 242 gatunki.

Do wykonania obliczeń przewidywanej całkowitej liczby gatunków obecnych w badanym siedlisku oraz oszacowania czasu i wielkości próby liczonej liczbą osobników, w której można by zaobserwować szacowaną liczbę gatunków użyto programu EstimateS (Colwell 2013) oraz programu SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation) (Chao i Shen 2010).

3. Wyniki i dyskusja

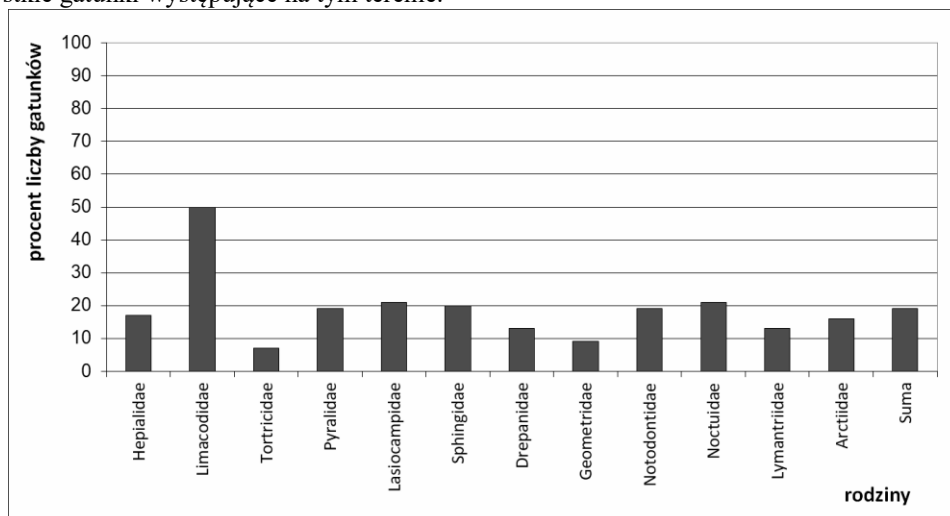
Mimo niewielkiej liczby gatunków (Rys. 1), udało się oszacować całkowitą liczbę gatunków wynoszącą 299, jako średnia 4 estymatorów (Tab. 1), których wyniki są zbliżone. Przyczyną występowania niewielkiej liczby gatunków (19% krajowej fauny), jest fakt wynikający z badania uboższego florystycznie terenu o krajobrazie rolniczym oraz niepełny sezon prowadzenia odłowów.

Tab. 1. Wyniki szacowania całkowitej liczby gatunków.

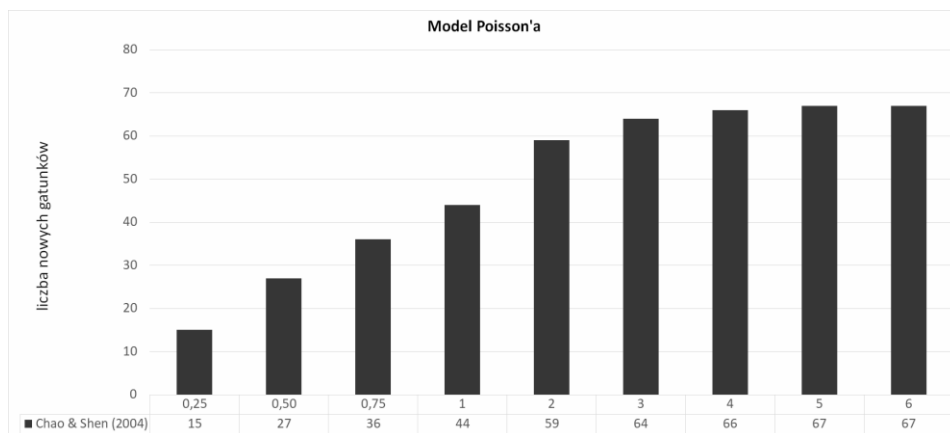
Estymator	wynik szacunku (liczba gatunków)
First order jackknife	309
Second order jackknife	274
Chao 1	308
Chao 2	305
średnia	299

Do oszacowania czasu w którym można by wykazać całkowitą liczbę gatunków na tym terenie, użyto modelu Poissona, a do oszacowania wielkości próby (liczonej liczbą osobników) w której można by wykazać nowe gatunki użyto modelu Multinomialnego (Chao i Shen 2004; Shen i in. 2002). Wyniki estymacji wskazują, iż całkowita liczba gatunków tej grupy wynosi 299 czyli jest jeszcze 68 nowych gatunków możliwych do odnalezienia. W modelu Poissona (Rys. 2) można by ją zaobserwować dopiero po 4 latach badań. W modelu tym przyjęliśmy, że $l=35$ prób, dzięki temu możemy zaobserwować jak nasze wyniki tj. obserwacja nowych gatunków zmienia się wraz

z wielkością próby. W modelu multinomialnym (Rys. 3) postawiono pytanie ile nowych gatunków wykazemy np. w 100 nowo odłowionych osobnikach. Wyniki takie możemy odczytać z tej ryciny i dowiedzieć się, iż po odłowieniu prawie 20000 osobników jesteśmy dopiero w stanie ujawnić wszystkie gatunki występujące na tym terenie.



Rys. 1. Procent liczby gatunków odłowionych na stanowisku do liczby gatunków występujących w kraju.



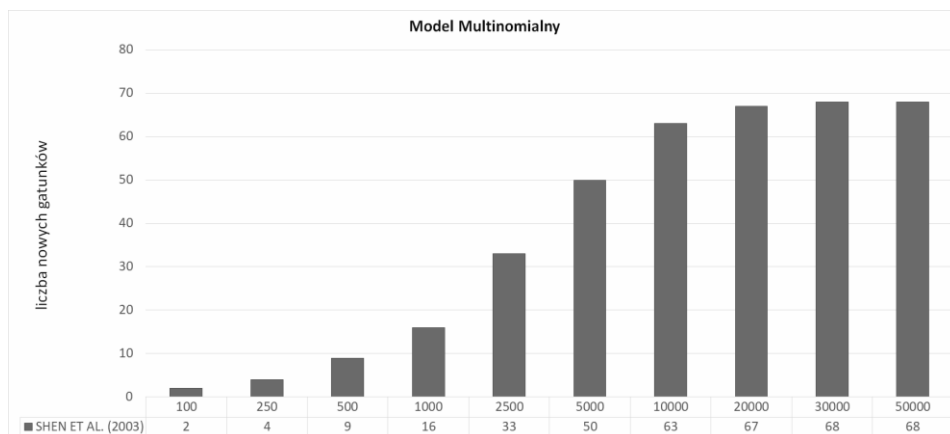
Rys. 2. Estymacja nowych gatunków motyli w kolejnych jednostkach czasu badań.

Poza tym Rys. 4 pokazuje, iż zależność ujawnienia nowych gatunków nie jest proporcjonalna do liczby odłowionych osobników i po osiągnięciu pewnego progu, bez względu na wielkość próby odnalezienie nowych gatunków nie jest możliwe.

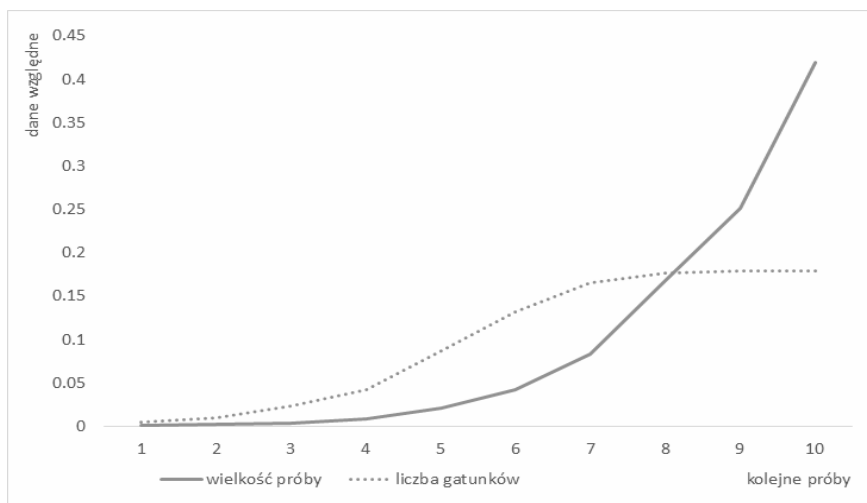
Analizując wyniki z tych dwóch modeli wynika, iż wykazanie wszystkich gatunków jest bardzo czasochłonne i nieekonomiczne (3-5 lat badań lub odłowienie 20000-30000 osobników). To dodatkowo sugeruje konieczność użycia estymatorów w badaniach monitoringowych.

Aby oszacować całkowitą liczbę gatunków na danym terenie z możliwie niskim progiem błędów (20%) należy posiadać jednak dość dobrze zbadaną grupę, tj. powinno być znanych 60-80% wszystkich gatunków. Taka liczba została odłowiona, 242 gatunki co stanowi 81% całkowitej szacowanej liczby gatunków wynoszącej 299 gatunków. Dla zebranych danych wykonano analizę aby sprawdzić ile prób należy zbierać aby wykonać prawidłowe szacowanie. Analizę wykonano dla kolejnych wielkości prób 25%, 50%, 75% jako całej próby. Z analizy widać, iż wykazana liczba gatunków w 26 próbach (75% prób) wynosi 212 a szacunkowa 299, co stanowi 70% wszystkich

gatunków. Tylko na tym etapie widać, iż całkowitą wielkość prób można zredukować o 9, co stanowi prawie 26% wszystkich zebranych prób. Wynika z tego, iż aby odłowić 75% gatunków można pobrać aż o 26% mniejszą liczbę prób, czyli 26 prób z 35. W tej próbie odnotowano 4729 osobników (z 6761 ogółem) i ta próba w zupełności wystarcza aby poprawnie szacować całkowitą liczbę gatunków, wynoszącą 299 gatunków.



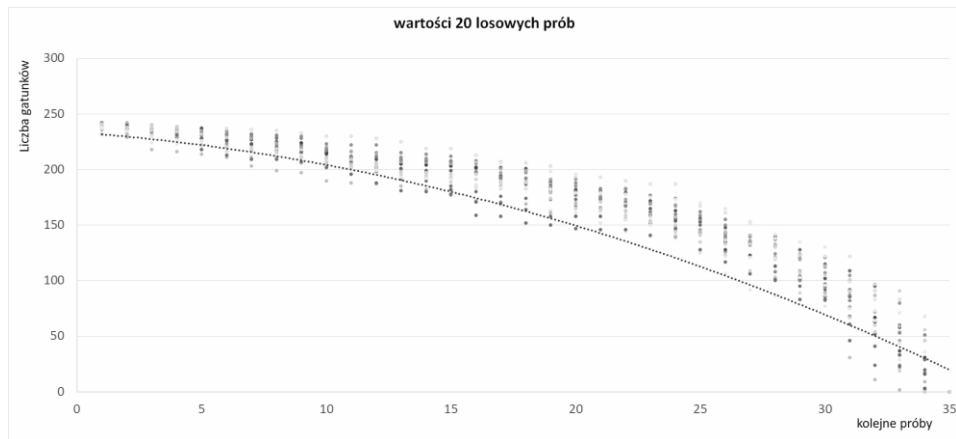
Rys. 3. Estymacja nowych gatunków motyli w kolejnych próbach - odłowionej liczbie nowych osobników.



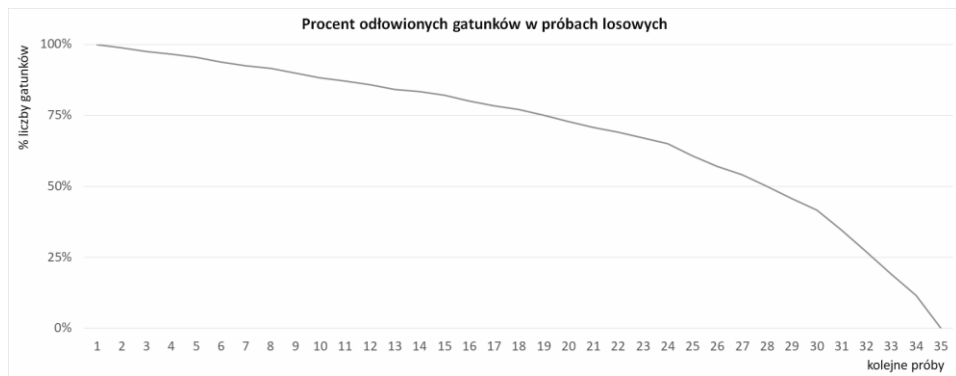
Rys. 4. Zależność wykazania liczby nowych gatunków od wielkości próby - liczby osobników.

Takie podejście do badań inwentaryzacyjnych o charakterze szacunkowym pozwala szybko i ekonomicznie szacować liczbę gatunków w wielu obiektach przyrodniczych jednocześnie, stanowiąc podstawę do badań porównawczych i monitoringowych (Chao i in. 2005; Colwell i in. 2012).

Dodatkowo w celu zoptymalizowania wielkości próby, dokonano losowej analizy poboru optymalnej liczby prób, odejmując losowo wszystkie z kolejnych 35 prób. Losowanie powtórzono dwudziestokrotnie a uśredniony wynik pokazano na Rys. 5, który ujawnia bardzo powolny spadek liczby gatunków w pierwszych etapach zmniejszającej się liczby prób. Z ryciny 6 wynika, iż wystarczy nawet 19 prób, czyli 54% wszystkich prób aby odłowić 75% wszystkich gatunków niezbędnych do szacowania całkowitej liczby gatunków. Niestety analiza nie mówi które to mają być próby, ale pokazuje, iż jest teoretyczna możliwość zebrania stosunkowo niewielkiej liczby prób, aby otrzymać bardzo zbliżone wyniki. Do uzyskania szczegółowych danych o wyborze prób niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań i analiz.



Rys. 5. Liczba gatunków w uśrednionej wartości prób losowych.



Rys. 6. Procent liczby gatunków w uśrednionej wartości prób losowych.

Znalezienie metody do szybkiego i dokładnego określania bioróżnorodności, które jednocześnie byłoby optymalne ekonomicznie jest sprawą kluczową dla prowadzenia monitoringu w szerszym zakresie i badań dużych grup systematycznych jest kluczowe (Baker i in. 2016). Niniejsza praca jest przykładem ale i propozycją do wykonania podobnych analiz celem określenia skuteczności takiej metody.

4. Wnioski

Choć badania mają charakter wstępny ich wyniki wskazują, iż do oszacowania całkowitej liczby gatunków może wystarczyć nawet o 50% mniejsza liczba pobranych prób niż ma to miejsce w standardowo prowadzonych badaniach lepidopterologicznych.

Rekomendacje dotyczące przyszłych badań dotyczą

1. wykonania podobnych analiz na większej liczbie badań oraz określenie czynników wpływających na optymalizację wielkości próby np. czynników klimatycznych,
2. wyznaczenie liczebności populacji i określenie wpływu użytej techniki pobierania prób na lokalną bioróżnorodność, mimo, iż w literaturze przedmiotu twierdzi się a priori o niskim wpływie na lokalne populacje użytej metody - samolówek świetlnych.

5. Literatura

Baker DG, Eddy TD, McIver R i in. (2016) Comparative analysis of different survey methods for monitoring fish assemblages in coastal habitats. PeerJ, 4, 1832.

- Baker LF, Artym KJ, Swanson HK (2017) Optimal sampling methods for modelling the occupancy of Arctic grayling (*Thymallus arcticus*) in the Canadian Barrenlands. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2017, Vol. 74, No. 10 : pp. 1564-157
<https://doi.org/10.1139/cjfas-2016-0429>
- Bosch NE, Gonçalves JMS, Erzini K i in. (2017) “How” and “what” matters: Sampling method affects biodiversity estimates of reef fishes. Vol. 7, 13:4891–4906
- Cardinale BJ, Duffy JE, Gonzalez A i in. (2012) Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486(7401), 59–67.
- Chao A, Chazdon RL, Colwell RK i in. (2005) A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology Letters*, 8: 148–159.
- Chao A, Colwell RK, Lin CW i in. (2009) Sufficient sampling for asymptotic minimum species richness estimators. *Ecology* 90, 1125-1133.
- Chao A, Shen TJ (2004) Non-parametric prediction in species sampling. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 9, 253-269.
- Chao A, Shen TJ (2010) Program SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation). Program i przewodnik po programie dostępny na stronie <http://chao.stat.nthu.edu.tw>
- Colwell RK (2013) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9. User’s Guide and application published. Retrieved from <http://purl.oclc.org/estimates>
- Colwell RK, Chao A, Gotelli NJ i in. (2012) Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages, *Journal of Plant Ecology*, Vol. 5, 1: 3–21.
- Gotelli NJ, Colwell RK (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4:379–391.
- Magurran AE (2004) *Measuring biological diversity*. Blackwell, Malden, Massachusetts, USA.
- Naeem S, Duffy JE, Zavaleta E (2012) The functions of biological diversity in an age of extinction. *Science*, 336(6087), 1401–1406.
- Shen TJ, Chao A, Lin JF (2002) Predicting the number of new species in further taxonomic sampling. *Ecology* 84: 798-804.

3. Functional properties of hydrogels

Klaudia Brzoza, Katarzyna Czyżewska, Karolina Labus

Division of Bioprocess and Biomedical Engineering, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology

Opiekun naukowy: dr inż. Karolina Labus

Brzoza Klaudia: brzozaclaudia@gmail.com

Keywords: cross-linked polymer structures, material characteristics, bio-applications

Abstract

Hydrogels are functional materials with high potential for application. They can be used in medicine, pharmacy, biotechnology, cosmetology, food processing and agriculture. Appropriate properties are key factors determining the effective use of hydrogels in various fields. In particular, it is of great importance in biomedicine and pharmacy, where it is observed continuous increase of demand for new functional materials for specific applications. The key factors influencing the effective use of hydrogels are their physicochemical and mechanical properties that determine their functionality. The most significant features include: hydrophilicity, absorption properties, including the ability of reversible swelling in aqueous solutions, porosity, semi-permeability, mechanical strength, chemical and thermal resistance, biocompatibility, non-toxicity, biodegradability and sensitivity to external stimuli.

1. Introduction

Hydrogels are three-dimensional, crosslinked networks of hydrophilic polymers able to absorb and retain high quantities of water. Due to their hydrated environment and tunable properties, these materials have been intensively studied and widely used in biomedicine (e.g. tissue engineering, controlled drug delivery and wound healing), biotechnological applications (e.g. immobilization of enzymes, biosensors, food processing) and other sectors such as: cosmetics, gardening and agriculture (Ahmed 2015; Sarvaš et al. 2008; Ullah et al. 2015). The key factors associated with effective use of hydrogels are their physicochemical and mechanical properties that determine their functionality. Those which contribute to the popularity of these materials are high degree of biocompatibility, biodegradability, adequate oxygen permeability, physical properties similar to tissues, the porosity that allows on transport of various substances, possibility of active molecules immobilization and ability to gel *in situ* (Patel and Mequanint, 2011).

The presented work is a synthetic review of significant functional properties of hydrogels that determine their practical applications.

2. Description of the issue

2.1 Types of hydrogels

In general, hydrogels can be divided according to the type of cross-linking into chemical and physical materials. Nevertheless, they can be also classified in terms of source and composition of polymers, structure type, charge, physical properties and biodegradability (Fig.1).

The hydrogels can be classified according to the type of cross-linking (Patel and Mequanint 2011). In this case, one can distinguish physical hydrogels, known as reversible or pseudogels, in which connections within the polymer network are based on unstable ionic interactions and hydrogen bonds. These linkages can be destroyed due to changes in physical conditions of microenvironment as ionic strength, pH, or temperature. In contrast, chemical hydrogels (permanent) are those in which the polymer network is maintained by means of covalent bonds, which provide stability for the structure regardless of the change of external factors (e.g. pH, temperature). These materials are chemically durable and not subject to decay without the complete destruction of macromolecules.

Both types of hydrogels show a non-homogeneous structure, non-uniform cross-linking degree and uneven distribution of water (Peppas et al. 2000).

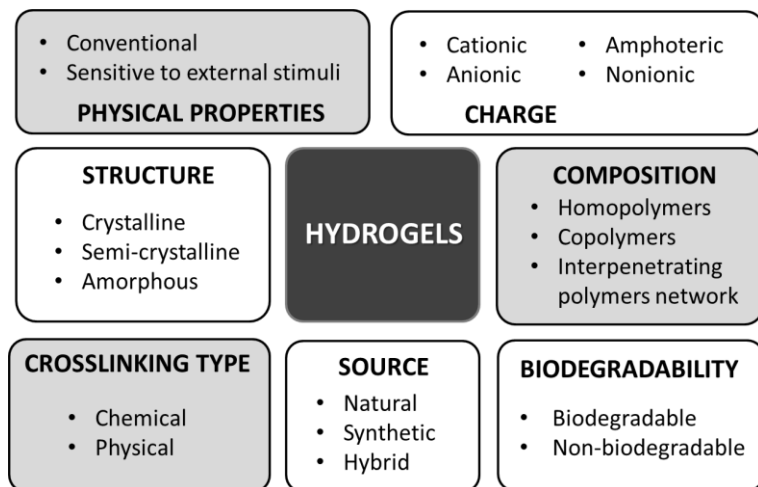


Fig.1. Classification of hydrogels (Ahmed 2015; Patel and Mequanint 2011).

Considering the source of the polymer, hydrogels can be of natural and synthetic origin. Natural hydrogel materials are typically made from polysaccharides and protein chains, while common examples of synthetic are poly(vinyl alcohol) or poly(ethylene oxide). Natural polymers are characterized by considerable biocompatibility, since in the human body they can be degraded by enzymes and as a result bioresorbable by-products are formed (Ahmadi et al., 2015). In turn, synthetic polymers are highly mechanically robust, but their degradation occurs much slower (Tabata 2009). The third group consists of hybrid materials which thanks to the differentiated contribution of individual components can exhibit unique properties.

Hydrogels can also be divided due to the polymer composition into homopolymers, copolymers and interpenetrating polymers networks (IPNs). The homopolymer matrix is obtained from one type of monomer, which is the basic structural unit. The copolymer (heteropolymer) is a construct composed of two or more different monomers arranged randomly or as a block of repeating elements along of the chain, of which at least one is hydrophilic. In turn, the multipolymer structure of IPN is constituted by interpenetrating building blocks derived from two or more independently cross-linked polymers of natural and/or synthetic origin (Ahmed 2015). Full-IPN consists of two independently crosslinked polymers, whereas in the semi-IPN hydrogel one polymer is cross-linked and the other is in a linear or branched form, not connected to the first polymer (Bakar et al. 2011).

Considering the charge of the side groups of polymer chains forming the hydrogels structure, these materials can be of three types: ionic, non-ionic and amphoteric (Peppas et al. 2000). Non-ionic hydrogels are electrically neutral. Ionic ones can be negatively (anionic) or positively (cationic) charged. In contrast, the amphoteric hydrogel can ionize both into anions and cations (Ahmed 2015).

According to the physical structure of hydrogels, they can be classified as amorphous (non-crystalline), crystalline and semi-crystalline (complex formed by the amorphous and crystalline phase) (Ahmed 2015).

Referring to the fate of hydrogels in the human body, they can be described as biodegradable or non-biodegradable. The former, susceptible to biological agents (e.g. hydrolysis in the presence of enzymes) can disintegrate into harmless low molecular weight by-products, fully resorbable or safely excreted from the body. For example, this eliminates the necessity of surgical removal of the hydrogel carriers after the release of the drug substance, in contrast to those based on non-biodegradable materials (Wu and Chu 2008).

Physical properties are the last category, according to which hydrogels can be divided. In this case, conventional and smart materials could be distinguished. Unique of the second group is that

their features could change as a result of the response to a deliberate action of various external stimuli (Simões et al. 2012; Ullah et al. 2015).

2.2 Materials for hydrogels production

Hydrogels are a unique class of macromolecular network structures of which a large part is the fraction of the aqueous solvent. The hydrophilicity of the network results from the presence of chemical residues such as hydroxyl (-OH), carboxylic (-COOH), amide (-CONH-, -CONH₂), sulfonic (-SO₃H), and others that can be found within the polymer backbone or in his side chains. Nevertheless, it is also possible to synthesize hydrogels containing a significant part of hydrophobic polymers by blending or copolymerization of hydrophilic and hydrophobic individual building blocks (Yang 2012).

Hydrogels can be prepared from a diverse range of natural and synthetic polymers, and combinations thereof (Tab.1).

Tab.1. Types of polymers used for the production of hydrogels (Ahmadi et al. 2015).

Polymer type	Examples
Natural	alginate, hyaluronic acid, carrageenan, dextran sulphate, chondroitin sulphate, chitosan, starch, polylysine, dextran, agarose, pullulan, gelatin, collagen, peptides
Synthetic	poly(vinyl alcohol) (PVA), polyacrylamide (PAM), poly(ethylene oxide) (PEG), poly(lactic acid) (PLA), polycaprolactone (PCL), polyhydroxybutyrate (PHB), poly(propylene oxide) (PPO), N-isopropylacrylamide (NIPAAm), hydroxypropylmetacrylate (HPMA), polyethylene oxide (PEO)
Hybrid	alginate-PVA, collagen-acrylate, hyaluronic acid- NIPAAm, poly(PEG-co-peptide), poly(HPMA-co-peptide)

Natural polymers are characterized by a considerable biocompatibility, since they can be degraded in the human body by enzymes resulting in formation of biotolerant by-products. In contrast, synthetic polymers are highly mechanically strong, but their degradation proceeds much slower (Ahmadi et al. 2015; Ahmed 2015). By using polymers of different origin, hydrogel materials with desired, specifically designed properties can be obtained (Wu and Chu 2008). In this case, by controlling the hydrophilic/hydrophobic ratio, ionization of the polymeric structure and the interaction between each building block, one can have an influence on the degree of cross-linking, porosity, sorption and transport properties of the hydrogels (Yang 2012).

2.3. Practical applications of hydrogels

The unique hydrogels properties create the opportunities for their various industrial applications, which are related both to the everyday items as well as medicine and industrial biocatalysis (Fig.2).

Considering the applications in cosmetics, the bioadhesive hydrogels have good properties for skin care due to a long residence time on the application place the maintenance of the high local concentration of active ingredients in the surrounding tissues and reduced product administration frequency. This kind of hydrogels can be produced from acrylic acid, its derivatives and carrageenans, the naturally occurring polysaccharide extracted from red seaweed (Parente et al. 2015).

In agriculture, hydrogels allow plant colonization of reclaimed areas after mining. Their application leads to the increase planting stock survival and affects by soil moisture conditions. Moreover, a new generation of hydrogels, like highly cross-linked polyacrylamides containing 40% of the amides hydrolyzed are able to adsorb water and store up to 400 times their own weight, thus can reduce the negative effects on plant physiology under water stress conditions (Sarvaš et al. 2007).

The modern industrial biocatalysis is closely related to various methods of enzyme immobilization. One of the popular immobilization approaches is the entrapping method involving a

different type of carriers, among which hydrogels play an important role. Hydrophilic polymeric carrier ensures a relatively inert aqueous environment inside the matrix as well as causes relatively low decrease in enzyme activity. Furthermore, hydrogel structure allows entrapping other active ingredients. Entrapment of glucose isomerase, the well known commercial enzyme, inside Poly(acrylic acid-co-2-Acrylamido 2-methyl Propane sulfonic acid) is promising tool for biomedical applications (Kamal et al. 2014).

Tissue engineering leads to the regeneration and repair of defective and damaged tissues. The assurance of a suitable environment for treated cells enhances and regulates proliferation and differentiation processes for cell-based tissue engineering. The research related to the creation of hydrogel scaffolds are connected to stem cell biology and medicine. Furthermore, they allow obtaining a high quality of cell transplantation therapy (Tabata 2009).

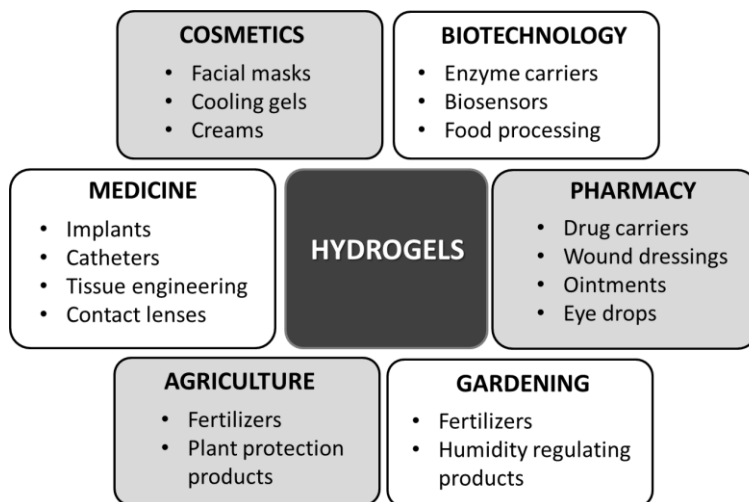


Fig. 2. The application areas of hydrogels materials (Ahmed 2015, Ullah et al. 2015).

2.4. Functional properties of hydrogels

Appropriate properties are key factors determining the possibility of effective use of hydrogels in various fields. In particular, it is of great importance in biomedicine and pharmacy, where it is observed a continuous increase in the demand for new functional materials for specific targeted applications. The most significant functional properties are hydrophilicity, absorption properties, including the ability of reversible swelling in aqueous solutions, porosity, semi-permeability, mechanical strength, chemical and thermal resistance, biocompatibility, non-toxicity, biodegradability and sensitivity to external stimuli.

2.4.1. Absorption properties

The most important element affecting the properties of hydrogel materials is water, which can constitute up to 99% of their total mass. Absorption properties (water absorption and swelling capacity) could be controlled by various factors (Gupta et al. 2002). The first group is represented by properties of polymeric components of hydrogels such as: concentration, crosslink density, nature of functional groups, ionic charge and hydrophilic/hydrophobic ratio. The second group of factors are the properties of the microenvironment, like pH, ionic strength or temperature.

Swelling, the process of water absorption by a dry hydrogel, is initiated by the hydration of hydrophilic groups that are highly polar. As a result, the hydrogel begins to swell, causing the hydrophobic groups to move outward. Then, after the exposure of all these groups, the osmotic

pressure around the cross-linked structure of hydrogels is created as a result of striving to equalize the saturation conditions. Thanks to this, it is possible to absorb the additional amount of water that fills the pores (unoccupied voids between the chains) (Ganji et al. 2010). Water absorption and swelling degree can be expressed by appropriate equations given in Tab.2.

Tab. 2. Equations for determination of water absorption and swelling degree of hydrogels (Labus et al. 2016).

Feature	Equation
Water absorption (WA)	$WA[\%] = \frac{m_{SW} - m_{SD}}{m_{SD}} 100\%$
Swelling degree (SD)	$SD[\%] = \frac{m_{SW} - m_{ID}}{m_{ID}} 100\%$

m_{ID} – initial mass of dry hydrogel before swelling [kg]; m_{SW} – mass of wet hydrogel after swelling [kg]; m_{SD} – mass of hydrogel dried after swelling [kg].

2.4.2. Crosslinking degree

The polymers forming hydrogel are linked by chemical bonds, so it is possible to produce their three-dimensional network. The creation of such structure is called: cross-linking, during which could be formed single covalent bonds, multiple connections, as well as the most frequently occurring so-called molecular entanglement. The crosslinking of polymer chains in the hydrogel structure occurs during the reaction of polymerization or polycondensation. This leads to the production of large three-dimensional hydrogel networks that change the absorbed water into the gel form.

The average number of cross-linked units (γ) which possibly could be created on a hydrogel polymer chain can be calculated using the following equation (Yang 2012):

$$\gamma = \alpha \cdot \lambda_n$$

where: α – amount of functional groups; λ_n – average chain size (degree of polymerization).

Hydrogel materials with a high degree of cross-linking are more compact and rigid, which is associated with a much lower mobility of polymer chains, and thus with a reduction in the degree of swelling.

2.4.3. Porosity

The amount of voids, called porosity, is one of the most important parameters determining the structure and properties of the hydrogels. In case of these materials, a cross-linked network composed of polymers linked by various interaction forms a porous structure. The factors determining the porosity of the hydrogels are mainly the type and concentration of initial reagents and can be determined by following equation (Thompson et al. 2017):

$$P = \left(1 - \frac{\rho}{\rho_0}\right) \cdot 100\%$$

where: P – porosity; ρ – pore density [kg/m^3]; ρ_0 – overall density of the hydrogel [kg/m^3].

Porosity together with the degree of cross-linking are the factors conditioning the permeable properties of hydrogel materials. Therefore, by adding the favorable swelling capacity and the content of large amounts of water (universal solvent of bioactive molecules) it can be concluded that hydrogels are efficient matrices for the transport of various substances, including: drugs, enzymes or growth factors (Gupta et al. 2002; Peppas 2000; Ullah et al. 2015).

2.4.4. Elasticity

Flexibility is defined as tensile resistance. This feature allows modifying the shape or volume of the material under the action of mechanical factors (Melekaslan et al. 2004). Due to their high flexibility, hydrogels react to stresses with almost immediate and completely reversible deformation. The rapid rearrangement of polymer fragments under the influence of stress is possible due to the specific structure of the gel, and more specifically its cross-linking and a large number of voids between polymers chains. The flexibility of the hydrogels is characterized by the high extensibility of the polymeric material due to low mechanical stress.

Due to the hydrophilicity and significant water content, hydrogels are characterized by flexibility very similar to natural tissues, which enables effective use of these materials in tissue engineering and in the production of implants (Melekaslan 2004; Tabata 2009).

2.4.5. Biocompatibility and biodegradability

Hydrogels like all other biomaterials in contact with the human body (for example in the form of drugs, implants, dressings or food) must obligatorily fulfil the requirements of non-toxicity and biocompatibility. Designing hydrogels for such applications, the risk of allergy or irritation caused by gel components should be ruled out. In order to accomplish assumed functions, these materials cannot induce adverse reaction of the organism.

A favorable property of hydrogels is also the ability to biodegrade in the human body. For example, if they are used as subcutaneous time-releasing implants, this eliminates the need for the surgical removal of such a carrier, which significantly enhances patient comfort during therapy (Wu and Chu 2008).

2.4.6. Sensitivity to external stimuli

In the group of hydrogels there could be also distinguished so-called smart materials, which

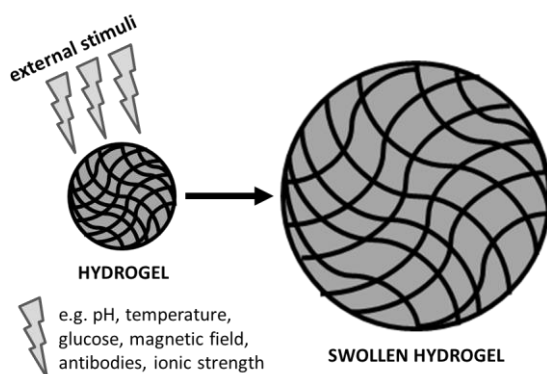


Fig.3. Change of swelling properties of a hydrogel sensitive to various external stimuli (Simões et al. 2012).

are sensitive to environmental changes and able to modulate their properties in response to changes in pH, temperature, ionic strength, electric field, or concentration of a specific analyte (Fig.3). This makes it possible to design a carrier releasing the drug in specific part of the human body (e.g. at a specific pH of stomach or intestine) (Byrne et al. 2002).

The most common property that varies in response to an external stimulus, is a change in volume of the hydrogel as a result of the dynamic swelling and the transition of the hydrogel from the gel into a sol, or vice versa in case of injectable materials (Ullah et al. 2015).

3. Summary

Hydrogels are multi-functional materials based on polymeric crosslinked networks filled with water. Their unique feature is ability to absorb and retain high quantities of water. Due to their hydrated environment and tunable properties, hydrogels are widely used in various industrial applications, such as: tissue engineering, implantology, drug release devices, contact lenses, biosensors, food processing, cosmetics, hygiene products, or plant protection products.

The presented work gives an insight into the examples of significant functional properties of hydrogels that determine their practical applications. Among the most important properties that characterize an ideal hydrogel material are (Ahmed 2015): appropriate absorption capacity, preferred particle size and porosity, the lowest residual monomers, the highest durability and stability in the swelling environment and during the storage conditions, biodegradability without formation toxic by-products, biocompatibility (if required) and the lowest price. The set of desirable properties can be obtained by modulating key parameters of hydrogel materials, such as: chemical composition, degree of cross-linking, flexibility, mechanical resistance, etc.

4. References

- Ahmadi F, Amoozgar Z, Oveisi Z, Samani SM (2015) Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Research in Pharmaceutical Sciences* 10(1): 1-16.
- Ahmed EM (2015) Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* 6(2): 105-121.
- Bakar M, Kostrzewa M, Pawelec Z, Smoliński N (2011) Właściwości mechaniczne mieszanin polimerowych o przenikających się sieciach przestrzennych. *Tribologia* 5: 89-100.
- Byrne M, Park K, Peppas N (2002) Molecular imprinting within hydrogels. *Advanced Drug Delivery Review* 54(1): 149-61.
- Ganji F, Vasheghani-Farahani S, Vasheghani-Farahani E (2010) Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iranian Polymer Journal* 19(5): 375-98.
- Gupta P, Vermani K, Garg S (2002) Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today* 7(10): 569-79.
- Kamal H, Hegazy ESA, Sharada HM (2014). Immobilization of glucose isomerase onto radiation synthesized P(AA-co-AMPS) hydrogel and its application. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(2): 154-162.
- Labus K, Drozd A, trusek-Holownia A (2016) Preparation and characterisation of gelatine hydrogels predisposed to use as matrices for effective immobilisation of biocatalysts. *Chemical Papers* 70(5): 523-530.
- Melekaslan D, Kasapoglu F, Ito K, et al. (2004) Swelling and elasticity of hydrogels based on poly(ethylene oxide) macroinimer. *Polymer International* 53: 237-242
- Parente ME, Andrade AO, Ares G, et al. (2015). Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science* 37: 511–518.
- Peppas NA, Bures P, Leobandung W, et al. (2000) Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50: 27-46.
- Sarvaš M, Pavlenda P, Takáčová E (2007). Effect of hydrogel application on survival and growth of pine seedlings in reclamations. *Journal of Forest Science* 53(5): 204–209.
- Simões S, Figueiras A, Veiga F (2012) Modular Hydrogels for Drug Delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 3: 185-199.
- Tabata Y (2009) Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J Journal of The Royal Society Interface* 6(3): 311-324.
- Thompson BR, Horozov TS, Stoyanov SD, et al. (2017) Hierarchically porous composites fabricated by hydrogel templating and viscous trapping techniques. *Materials and Design* 137: 384-393.
- Ullah F, Othman MBH, Javed F et al. (2015) Classification, processing and application of hydrogel: A review. *Materials Science and Engineering* 57: 414-433

- Wu DQ, Chu CC (2008) Biodegradable hydrophobic-hydrophilic hybrid hydrogels: swelling behavior and controlled drug release. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 19(4): 411-429.
- Yang T (2012) Mechanical and swelling properties of hydrogels. KTH Chemical Science and Engineering, Wiley Periodicals, Inc.

Acknowledgments

This work is a part of the project Determination of an influence of composition and spatial structure of hydrogels on the properties of entrapped biocatalysts supported by National Science Centre (Poland). NCN project number 2015/19/D/ST8/01899.

4. Dressing materials based on hydrogels

Klaudia Brzoza, Katarzyna Czyżewska, Karolina Labus

Division of Bioprocess and Biomedical Engineering, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology

Opiekun naukowy: dr inż. Karolina Labus

Brzoza Klaudia: brzozaclaudia@gmail.com

Keywords: cross-linked polymer structures, functional materials, wound treatment

Abstract

Hydrogels are a group of hydrophilic polymeric materials with specific properties. They have an extraordinary ability to be semi-permeable, which makes it possible to transport the substance to and from these polymeric structures. Hydrogels are functional materials that are readily used in biomedicine and biotechnology because of their biocompatible properties and similarity to living tissues. They are used in tissue scaffolds, drug carriers, contact lenses, etc. One of the dynamically developing directions of research on the use of hydrogels is also the application of these materials as the new generation dressings. They are most often used in the case of hard to heal wounds such as: ulcers, bedsores, wounds after surgery, diabetic and necrotic as well as burns and places after skin grafts. The highest advantage is that hydrogel dressings primarily separate wounds from the external environment while ensuring gas exchange to facilitate the healing process. In addition, these materials are characterized by beneficial moisturizing and cooling properties and the ability to apply the drug without the need to remove the dressing by soaking its outer side with the medicament solution.

1. Introduction

Hydrogels are a group of hydrophilic polymeric materials with specific properties. A characteristic feature of these cross-linked structures is the swelling capacity in aqueous solutions and semi-permeability, which makes it possible to transport various substances to and outside these materials. Properties such as absorbency, hydrophilicity, biocompatibility, non-toxicity, resemblance to living tissues, biodegradability, and in some cases sensitivity to stimuli, make hydrogels functional materials successfully used in biomedicine and biotechnology. In these sectors, the most important applications include: tissue scaffolds, drug carriers, anti-cancer targeted therapies, implants, stents, soluble surgical threads, contact lenses, biosensors, immobilized enzyme preparations and diagnostic tests (Ahmed 2015).

One of the dynamically developing directions of research on the use of hydrogels is also the application of these materials as the new generation dressings. Their use is particularly justified in the case of hardly healing wounds: ulcers, decubitus ulcers, surgical wounds, diabetic and necrotic wounds, as well as burns and places after skin grafts. The greatest benefit resulting from the use of hydrogel dressings is primarily the separation of the wound from the external environment while ensuring gas exchange facilitating the healing process by adequate oxygenation of regenerated cells. In addition, these materials are characterized by beneficial moisturizing and cooling properties and the ability to apply the drug without the need to remove the dressing by soaking its outer side with the medicament solution (Tyliszczak et al. 2007).

The presented article is a synthetic review of using hydrogel materials as dressings, with particular emphasis on the functionality of these preparations in the healing of chronic wounds.

2. Description of the issue

Hydrogel is a material composed of natural or synthetic hydrophilic polymers forming a network, capable of storing large amounts of water and other biological fluids (Sosnowska 2009). Their use increases dynamically due to their beneficial properties: biocompatibility, non-toxicity,

similarity to living tissues and, in some cases, sensitivity to stimuli. These properties make hydrogels excellent materials used as drug carriers and tissue scaffolds (Mielewczyk 2011).

Hydrogels can be built from (Tab.1):

- **Natural polymers** consisting of proteins, polysaccharides and protein-derived polymers, or polysaccharide hybrids. Natural hydrogels are characterized by low toxicity and high compatibility (Liu et al. 2015).
- **Synthetic polymers** that have more favorable properties for treatment processes than natural polymers, which with appropriate composition manipulation are sensitive to changes in pH, temperature, ionic strength, etc. (Liu et al. 2015). They have the ability to photopolymerize. They are characterized by the ease of manipulation of mechanical properties and the ease of controlling the crosslinking structure. Their transport properties can be adjusted by adjusting the polymer chain length and density (Zhu 2010).

Tab. 2. Types of polymers used for the production of hydrogels (Ahmed et al. 2015).

Polymer type	Examples
Natural	alginate acid, hyaluronic acid, carrageenan, dextran sulphate, chondroitin sulphate, chitosan, starch, polylysine, dextran, agarose, pullulan, gelatin, collagen, peptides
Synthetic	poly(vinyl alcohol) (PVA), polyacrylamide (PAM), poly(ethylene oxide) (PEG), poly(lactic acid) (PLA), polycaprolactone (PCL), polyhydroxybutyrate (PHB), poly(propylene oxide) (PPO), N-isopropylacrylamide (NIPAAm), hydroxypropylmetacrylate (HPMA), polyethylene oxide (PEO)

2.1. Properties of hydrogels

The ability to retain significant amounts of water (swelling) and semi-permeability are some of the most important features of hydrogels. Owing to their three-dimensional structure and cross-linking they are able to store a large amount of water, including wastes from the wounds or drug solutions. Hydrogel is colloquially referred to a container with semi-permeability boundaries through which water and charged molecules can move freely (Sergey 2012). Hydrogel preparations can absorb 10 to 1000 times more liquid than their dry weight. They have the ability to maintain shape even in the presence of water (Tyliszczak et al. 2007). An additional advantage of biodegradable hydrogels are the unstable bonds occurring in the main chain or polymer grid. These bonds can be easily broken under physiological, enzymatic or chemical conditions by hydrolysis. This facilitates the degradation of the material implanted into the body or the place where the goal is to replace the polymer structure with living tissue. This is of great importance in tissue engineering or in the process of wound healing. In the case of transporting medications to the body, degradation of the drug capsule is designed to release the therapeutic agent in a timely manner after taking the dose of the drug. This is possible due to the biodegradable polymer structure (Sergey 2012).

Biocompatibility is another important feature of hydrogels. It is connected with the necessity of congruence with the immune system, the hydrogel and degradation products as well as the lack of toxicity of individual components of the hydrogel. They should be easily metabolized or filtered through the kidneys. This advantageous function results from their low free energy, hydrophilic surface at the interface when in contact with body fluids. In addition, the soft and rubbery nature of hydrogels minimizes irritation of surrounding tissues (Sergey 2012; Zhu 2010).

Interconnections in the polymeric network give the hydrogel preparations flexibility, viscosity and shape the gel structure. Moreover, it is possible to change their chemical properties, such as: polarity, surface, mechanical properties and degree of swelling (Sergey 2012).

Immunotolerance is an extremely important feature, especially in biomedical applications. Due to the presence of water, hydrogels are characterized by an unusual similarity to living tissues, which favors their absorption by surrounding tissues and reduces the risk of irritation (Tyliszczak et al. 2007).

An advantage is also the ease of washing the hydrogels from the transdermal surface. Moreover, such preparations release active substances much faster than ordinary lipophilic substrates depending on the cross-linking degree of their structures (Mielewczyk 2012).

Hydrogels are unusual polymeric materials, giving back character to copies of natural cells or tissues, therefore they are used to reconstruct multilayer systems. This gives them additional ability to transport biologically active substances, such as drugs, physiological fluids or growth factors (Hoffmann 2012).

2.2. Overall applications of hydrogels

Due to absorbent, hydrophilic, biocompatible and non-toxic properties, hydrogels are intensively studied functional materials. As a result, they are the subject of dynamic research in many industrial fields, such as: medicine, pharmacy, cosmetics, agriculture and many others (Tyliszczak et al. 2007).

Hydrogels have also gained recognition in the electronic industry as components of various types of sensors. They are also used in ophthalmology (Winnicka 2008), as dressings for oozing wounds and burns, surgical glues, various types of implants, as well as carriers facilitating drug transport. The examples of practical applications of hydrogels are presented in Fig. 1.

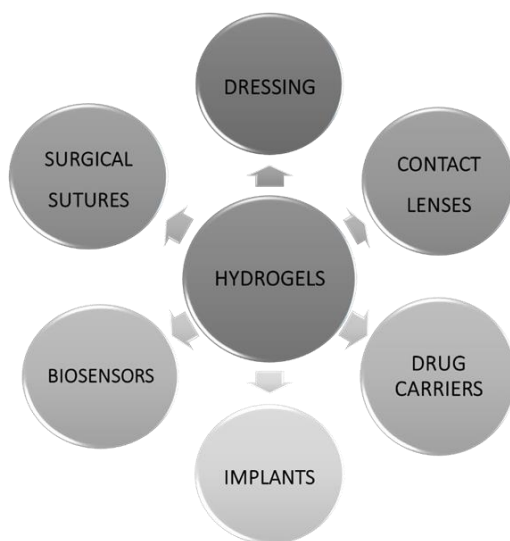


Fig. 1. Practical applications of hydrogels.

➤ Tissue engineering

It is a field of science that deals with the promotion of alternative solutions for artificial tissues, organ transplants or treatment by replenishing cavities. In this case, the most important goal is to design of such biological material that would be able to replace the natural tissue or support its function, thus having the structure closest to it, including mechanical properties. In this field, hydrogels are used to form the matrices designed from cellulose derivatives and acrylates. Currently there are prototypes of artificial organs like tendons, muscles or kidneys (Lee 2013).

➤ Pharmacy

In this field, hydrogels are the most widely used for the transport and release of drugs. Particular emphasis is placed on the way of dosing medicines, so that their frequent reception is not necessary. This is possible owing to a suitable gel that ensures contact with the digestive system, contact with the mucosa and controlled dosing of the drug. (Pluta et al. 2013)

➤ Gardening and agriculture

Great interest and usability of hydrogels, also known as agrogels, also gained in horticulture and agriculture. In these fields, they are used for moisturizing and irrigating plants. The watering plants cause swelling of the hydrogel and storage of water, which is released when the environment gets dry.

This reduces the costs of production of crops associated with the use of water and employees, and also limits the use of fertilizers by retaining mineral components inside the gels (Syed 2011).

➤ **Ophthalmology**

Hydrogel preparations are currently applied in many eye diseases and diseases, such as dry eye syndrome. They are used for moisturizing and possibly delivering the drug. They produce a water film that is often called "artificial tears." Due to their unique properties, in contact with eyes they are able to pass between the sol-gel phases (Winnicka 2008).

➤ **Dermatology and cosmetology**

Hydrogels are also used in the treatment of skin diseases or during therapeutic and cosmetic treatments. Processes can be easily controlled due to their external use. They are easy to remove (Ahmed 2015).

2.3. Wound dressings based on hydrogels

Hydrogel dressings are seen as a significant element supporting the treatment of various types of wounds. This is because the hydrogel dressing helps to keep the wound surface moist, create the perfect environment for cleaning the wound and help to get rid of necrotic tissue. Moreover due to their soothing and cooling properties, hydrogel dressings bring the relief to patients and significantly reduce the pain feeling. That is why they are used in many different types of wounds. Due to their high moisture content, they also prevent the bacteria from reaching the wound surface, creating an impermeable barrier, which exclude infection development.

Particular wound types heal in a different way and each of them requires individually planned therapy. Each treatment should start with the diagnosis of the wound type and classification of preparations used in the treatment process. Moreover, obstacles and possible complications that may arise during the therapy should be foreseen (Iwanek 2015). The huge drawback is that classic dressings are unfortunately still used. They maintain compresses that provide a moist environment around the wound. Without moisturizing, ordinary dressings can stick to the wounds, irritating the area of injury, interfering with the structure of the healing tissue and drying in the formation of clots, which increases the contact of the wound with the environment and negative factors. This can lead to swelling, infection through microbial infiltration, itching or mechanical interference. During the change of such dressing, the patient experiences physical discomfort and suffer from intolerable pain. The clot may break off with the bandage and reopen the wound. Therefore, ordinary dressings are constantly replaced by hydrogel dressings. Figure 2 presents the environmental recognition of the wound condition and the individual steps of the treatment of possible exudation.

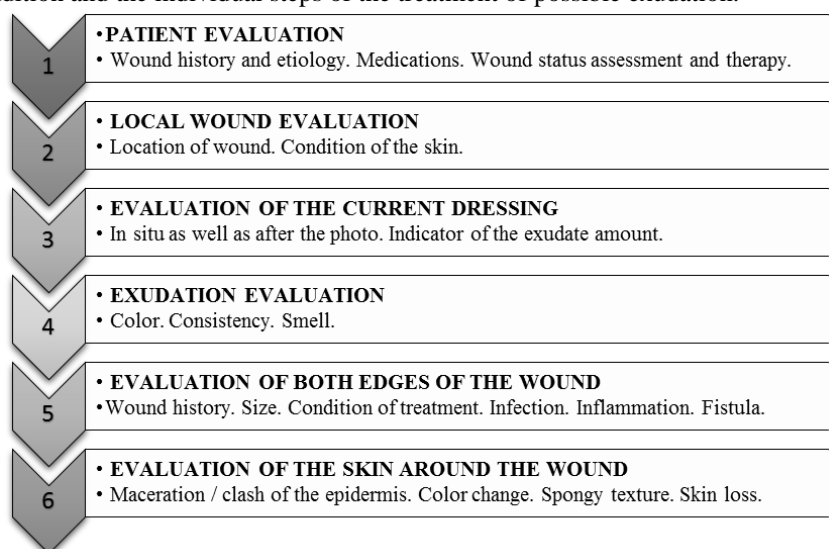


Fig. 2. Steps of treatment of exudate and similar wound healing problems.

For a successful wound healing therapy it is necessary to specify:

- ✓ Placement of the wound,
- ✓ The size and depth of the wound,
- ✓ Wound exudate,
- ✓ Wound surface.

Extremely important in different types of injury is also to determine the criticality of the wound condition and selection of the most advantageous and comprehensive healing procedure. There is a wide variety of raw materials used as therapeutic matrices for healing of typical injuries and other skin wounds. Therefore, it is necessary to categorize symptoms, ailments and categories of dressings applied in their treatment.

Currently the most popular dressings are hydrogels. Due to their transparency, provided by the use of water or glycerol it is possible to monitor the course of treatment without removing the preparation from the wound and exposing the patient to pain and additional ailments. Moreover, owing to high hydration, they moisturize and clean dry wounds, dissolve various scabs and facilitate the treatment of necrosis. In addition, they oxygenate cells, bind secretions and have cooling properties (Iwanek 2015).

2.3.1. Favorable properties of hydrogel dressings

- They are accepted by the body (biotolerance and biocompatibility) - they do not have a negative effect on physiology, do not cause acute immune reactions, inflammation or allergic reactions, high absorbency dressings provide hydration and prevent infections by creating a barrier against microorganisms;
- They enable local drug introduction and periodic release;
- The moist environment around the wound protects against drying out;
- Protect the structure of new tissue and allow gas exchange;
- Hydrogel structure provides a painless change of the dressing;
- They can absorb large amounts of liquid during the cleaning of eg necrotic wounds.
- Combinations of polymers expand to form in such a way that they create spaces for closing secretions from wounds, microorganisms or odors (Tabata 2009).

Due to the combination of natural and synthetic components, hydrogels are characterized by high resistance to damage. The building blocks provide them with excellent sterility. Dressings of this type are usually about 3 mm thick, which allows continuous control of the treatment process without necessity of removing the dressing. They adhere well to the wound and the surrounding skin. This is very helpful when dressing is applied on the face or around the eyes. They are easy to place and change, that protect the newly formed tissue from damage. Their structure allows on drug application (without the need to remove the hydrogel) by soaking the outer side of the dressing with a medicament solution (Peppas 2000). The high water content not only gives the cooling feeling, but also makes it easier to evaporate water and dry the wound. Hydrogels are not recommended for dry and rough skin. In case of exudative wounds, it is important to check the condition of the dressing, because irregular dressing changes may cause microbial growth in the water located in the gel.

The dressings should also contain additional, preservative substances that increase microbiological stability. It is also common to use hydrogels in the case of intolerance to lipophilic substrates as well as in diseases and diseases of the hairy skin or oily skin. It is advisable to use them in applications on the oral mucosa, nose and eye due to their bioadhesive benefits. Hydrogels release substances faster than lipophilic dressings (Sosnowska 2009).

2.3.2. Characterization of wounds healing with the use of hydrogel dressings

Wound types, which are effectively treated using variety of hydrogel dressings, are presented in Fig.3. They include: bedsores, skin abrasions, wounds after surgical operations, venous ulcers shin, diabetic wounds, palaces after skin grafts, skin burns, etc.

Bedsore	<ul style="list-style-type: none"> • They are damage to skin tissues resulting from an abnormal blood supply resulting from long-lasting pressure on the tissue at the site of the wound. This leads to a reduction in cellular metabolism, resulting in hypoxia, malnutrition of the cells in the area of injury and eventually leads to necrosis. Necrosis affects changes in muscles, joints or bone changes. Cavities filled with black-brown decaying tissues appear.
Skin abrasions	<ul style="list-style-type: none"> • Injuries occurring as a result of contact of the skin element with a rough surface that wipes the area of injury. The dermis is distorted which can lead to bleeding or fluid exudation (suppuration).
Wounds after surgical operations	<ul style="list-style-type: none"> • Arise after surgery requiring surgical intervention. Despite the optimal conditions, complications may occur. We distinguish several types of surgical wounds, for example, clean wound: hernia, varicose veins or clean contaminated cholecystectomy. There are also wounds contaminated after operations on the large intestine or dirty wounds - arising during drainage, etc. In such cases the patient has to deal with infection or pain during movement and when dressing changes.
Venous ulcers shin	<ul style="list-style-type: none"> • Hard to heal wound appears in the area of the ankle. Patients with a tendency to varicose veins, blood clots etc. suffer most often. Ulcers cause pain, exudation and may cause unpleasant odors. This wound causes a deficit of protein and electrolytes lost from the body.
Diabetic wounds	<ul style="list-style-type: none"> • Currently one of the biggest problems arising in the treatment of this type of wound. This phenomenon is a source of enormous costs. The diabetic wound is manifested in the destruction, infection and ulceration of the deep tissue. There are neurological disorders and peripheral vascular lesions. The most common complaint is diabetic neuropathic, ischemic or mixed diabetic foot. It is the result of long-term ill-treated diabetes causing hyperglycaemia and leading to diabetic neuropathy. Damaged nerves cause muscular atrophy, weakness or even complete disappearance of pain, touch or temperature. People suffering from this condition have problems in the treatment of any wounds, abrasions or cuts. Neglect can lead to limb amputation
Places after skin grafts	<ul style="list-style-type: none"> • In this case, skin grafts are readily used as a method of treating burns. The graft is placed on the surface of the wound and immobilized. In place of injury, a vacuum dressing or high-energy hydrogels are applied. The most common complications that may occur at the site of the transplant include various types of infections, hematomas, scars, necrosis or negative effects of a poorly positioned dressing.
Skin burns	<ul style="list-style-type: none"> • They arise due to the influence of causative agents on the skin, such as hot fluid burns, the influence of hot surface, flame, steam or air, chemical or electrical burns, frostbite, exposure to ionizing radiation or UV, otherwise known as radiation during cancer therapy. The effect may be surface burns treated relatively easily with the use of various types of dressings or deep, which are the cause of burn disease. All these causes can lead to extensive damage and deformation of organs and to dysfunctions of the body system.
Dry and dried wounds	<ul style="list-style-type: none"> • Wounds with inadequate humidity reduce the effectiveness of cells in the treatment of dry wounds, which results in longer treatment times or may lead to complications. That's why they need to provide this amount of water with a dressing that will insure the environment with the right level of hydration. In this case, hydroactive dressings are one of the most effective agents. Intensely moisturize the site of injury and do not stick to the wound minimizing pain.
Other chronic wounds	<ul style="list-style-type: none"> • Manifested by a skin lesion due to illness or injury, characterized by long-term treatment and complicated therapy.

Fig. 3. Characterization of the wound types healing with the use of hydrogel dressings (Leaper and Harding 2010).

3. Future prospects of hydrogel dressing

Considering the opinions of people who are in daily contact with various types of hard-wearing wounds, it would be necessary to look more closely at the problem of epidermal formation. This process is very difficult to achieve when treating difficult to heal wounds. The epidermis is the outermost and at the same time the thin epithelium that covers the body of the living organism. It poses an extremely delicate structure and can be damaged even when removing the dressing. Therefore, it is important to place in the hydrogel dressing a substance that accelerates the rate of epidermal growth and its durability. It would be extremely important when treating difficult wounds that can heal for years. The hydrogel dressing is almost perfect, because the drug substance can simply be injected into the gel structure, and then the drug could penetrate itself into the wound. Thus, it is not necessary to expose wounds to external factors too often. However, this dressing must be changed once a day. And here the problem arises, because it is very easy to damage the delicate epithelial structure, the wound opens up again and the whole process should be repeated. This situation can be represented by a difficult bladder on the foot after being rubbed with a shoe. Everyone has experienced this waiting and taking care of the delicate pellicle that appears during healing.

Therefore, research on the healing properties of hydrogels should follow this way to finish the process of epidermis and dermis faster and more effectively, because it is really the most difficult and the most important step in the whole healing process.

4. Summary

All hydrogel preparations, regardless of their intended use as an implant, dressing or medication carrier, must fulfill basic requirements. Hydrogels possess many favorable properties, such as: hydrophilicity and the ability of reversible swelling, mechanical, chemical and thermal resistance, porosity, non-toxicity, biodegradability and sensitivity to external stimuli as well as stability during technological processes. It makes them attractive functional materials in variety of industrial branches. In relation to traditional materials, hydrogels can be considered as new generation matrices with high application potential.

Dressings have been used by people since ancient times. For centuries we have been struggling with the problems of injuries, the way they are treated and the protection of wounds. The greatest benefit resulting from the use of hydrogel dressings is the ability to minimize or completely eliminate the risk of ailments occurring during use: pain when changing bandages, infections during the treatment process through contact with the environment or irritation. Due to this, there is observed dynamically growing interest in developing the new, innovative dressing materials. Based on this synthetic review it was shown the huge potential of hydrogel structures as the functional dressings for effective treatment of various kinds of wounds and skin injuries.

5. References

- Ahmed EM (2015) Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* 6(2): 105-121.
- Gulrez SKH, Al-Assaf S and Phillips OG (2011) *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. Chapter 5. Science, Technology and Medicine open access publisher.
- Hoffman AS (2012) Hydrogels for biomedical applications. *Advance Drug Delivery Reviews* 64: 18-23.
- Iwanek K (2015). *Zasady stosowania środków opatrunkowych i antyseptycznych opieka farmaceutyczna*. *Farmakoterapia* 25: 16-26.
- Leaper DJ, Harding KG (2010) *Rany chirurgiczne i urazowe*. W *Leczenie ran w praktyce*, PZWL: 26-30.
- Kazakov SV (2012). *Hydrogel Films on Optical Fiber Core: Properties, Challenges, and Prospects for Future Applications*. *New Polymers for Special Applications*. Chapter 2. Science, Technology and Medicine open access publisher.

- Kharkar PM, Kiick KL, Kloxin AM (2013) Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments. *Chemical Society Reviews* 42: 7335-7372.
- Lee SC, Kwon IK, Park K (2013) Hydrogels for delivery of bioactive agents: A historical perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65: 17-20.
- Liu J, Zheng H, Poh P, Machens HG, et al. (2015) Hydrogels for Engineering of Perfusable Vascular Networks. *International journal of Molecular Science* 16: 15997–16016.
- Lu J, Li Y, Hu D, et al. (2015) Synthesis and Properties of pH-, Thermo-, and Salt-Sensitive Modified Poly(aspartic acid)/Poly(vinyl alcohol) IPN Hydrogel and Its Drug Controlled Release. *BioMed Research International* 2015: ID 236745, 12 pages.
- Mielewczyk A, Osmalek T (2012). Hydrożele. Available: <http://www.skntf.ump.edu.pl/?hydrozele,18>. Last accessed 15.12.2017.
- Peppas NA, Bures P, Leobandung W, et al. (2000) Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50: 27-46.
- Pluta J, Karolewicz B (2013) Hydrożele: właściwości i zastosowanie w technologii postaci leku. II. Możliwości zastosowania hydrożeli jako nośników substancji leczniczej. Available: http://www.dbc.wroc.pl/Content/2174/304_Plut.pdf. Last accessed 20.12.2017.
- Sosnowska K (2009) Hydrożele jako nowoczesna postać leku *Gazeta Farmaceutyczna* 34-36.
- Tabata Y (2009) Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of The Royal Society Interface* 6: 311-324.
- Teixeira LSM., Feijen J, van Blitterswijk CA, et al. (2012) Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials* 33: 1281-1290.
- Tyliszczak B, Pielichowski K (2007) Charakterystyka matryc hydrożelowych- zastosowania biomedyczne superabsorbentów polimerowych. *Czasopismo techniczne* 159-167.
- Winnicka K (2008) Leki okulistyczne w aptece– nowe technologie. *Gazeta Farmaceutyczna* 7: 30-32.
- Zhu J (2010) Bioactive Modification of Poly(ethylene glycol) Hydrogels for Tissue Engineering. *Biomaterials* 31: 4639-4656.

5. Wpływ niedoboru wody w glebie na cechy morfologiczne oraz wielkość i jakość plonu nasion soi (*Glycine max* (L.) MERR.)

The impact of water deficiency on morphological features, quantity and quality of seeds yield of soybean (*Glycine max* (L.) MERR.)

Czopek Katarzyna, Staniak Mariola

Zakład Uprawy Roślin Pastewnych, Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Opiekun naukowy: dr hab. Mariola Staniak, prof. nadzw.

Czopek Katarzyna: kczopek@iung.pulawy.pl

Słowa kluczowe: soja, stres, susza, plon, skład chemiczny

Streszczenie

W ostatnich latach soja wzbudza coraz większe zainteresowanie. Nasiona soi są wyjątkowo cennym źródłem białka i tłuszczu oraz wielu związków chemicznych, takich jak błonnik, lecytyna, witaminy, sole mineralne i antyoksydanty, dlatego jest chętnie wykorzystywana na cele konsumpcyjne i paszowe. Susza rolnicza, powodowana niedoborami opadów, przyczynia się do powstania deficytu wody w glebie i zmniejszenia poziomu wód gruntowych, co utrudnia uprawę roli i niekorzystnie wpływa na plonowanie roślin uprawnych. Soja, podobnie jak inne rośliny strączkowe jest gatunkiem o nierównomiernym plonowaniu, co w dużej mierze uzależnione jest od warunków pogodowych. U większości gatunków susza niekorzystnie wpływa na plon i jego skład chemiczny. Redukcja plonu nasion soi w dużym stopniu zależy od odmiany i fazy rozwojowej roślin. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań związanych z reakcją soi na niedobór wody w glebie na podstawie dostępnej literatury oraz badań własnych.

1. Wstęp

Soja jest jedną z najważniejszych roślin uprawnych na świecie, użytkowaną na cele paszowe i konsumpcyjne. Pod względem powierzchni uprawy zajmuje czwarte miejsce na świecie (po pszenicy, ryżu i kukurydzy), a jej areal ciągle wzrasta. Jest to związane z sytuacją na rynkach żywności i pasz, gdzie coraz większą rolę odgrywa białko roślinne, ponieważ jest tańsze w produkcji od białka zwierzęcego (Boczarski 2016). Udział Europy w globalnych zasiewach tego gatunku jest jednak niewielki. Podobnie w Polsce powierzchnia uprawy soi jest nieduża, ze względu na wymagania klimatyczne tego gatunku, zaś zapotrzebowanie na białkowe produkty paszowe zaspakajane jest głównie poprzez import poekstrakcyjnej śruty sojowej (Jerzak i in. 2012). Duże uzależnienie polskiego rolnictwa od importu śruty stwarza jednak zagrożenie i budzi zrozumiałą niepewność. Stąd też w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania uprawą soi, także w klimacie umiarkowanym. Jest to związane z dużą wartością biologiczną nasion i zaletami dietetycznymi, a także z obserwowanym w ostatnich latach ocieplaniem się klimatu i wydłużaniem okresu wegetacyjnego w naszej szerokości geograficznej. Nasiona soi zawierają około 35-40% białka, o bardzo dobrym składzie aminokwasowym, którego wartość jest uważana za wyższą od białka zwierzęcego. Dodatkowo nasiona zawierają 18-22% tłuszczu bogatego w niezbędne, nienasycone kwasy tłuszczowe, składniki mineralne (wapń, fosfor, potas), a także witaminy z grupy B i cenne fitoestrogeny (Boczarski 2016). Składniki te powodują, że nasiona soi stanowią ważne źródło pokarmu zarówno dla ludzi (olej sojowy), jak i dla zwierząt (poekstrakcyjna śruta sojowa).

Soja jest rośliną dnia krótkiego, pochodzącą z południowo-wschodniej Azji, dlatego ma duże wymagania termiczne i mocno reaguje na zmiennie warunki pogodowe. W czasie wegetacji bardzo ważnym czynnikiem decydującym o wielkości plonu soi jest temperatura, ale także opady (Michałek 1999). Niekorzystne warunki wilgotnościowe powodują zaburzenia procesów fizjologicznych, hamują wzrost i rozwój roślin, a w konsekwencji redukują plon i pogorszą jego jakość. Reakcja soi na okresowe i długotrwałe niedobory wody w glebie jest jednak zróżnicowana w zależności, między innymi, od odmiany i fazy rozwojowej roślin (Fazeli i in. 2007).

2. Opis zagadnienia

Soja jest rośliną o umiarkowanych wymaganiach wodnych, ponieważ jest genetycznie przystosowana do okresowych niedoborów wody w glebie. Owłosienie na liściach i łodygach chroni ją przed nadmiernym parowaniem, a głęboki, palowy system korzeniowy umożliwia pobieranie wody z głębszych warstw gleby. Ponadto, w czasie suszy liście soi ustawiają się równolegle do padających promieni słonecznych, dzięki czemu zmniejsza się intensywność procesów fizjologicznych zachodzących w roślinie. Jej zapotrzebowanie na wodę jest większe w niektórych fazach rozwojowych, tzw. okresach krytycznych. Pierwszy okres krytyczny przypada od siewu do pełni wschodów, kiedy to ilość pobranej wody w okresie kiełkowania stanowi około 120% masy nasion. Brak wody w tym czasie powoduje, że nasiona słabo wschodzą i łan jest przerzedzony. Biorąc pod uwagę małą konkurencyjność soi, późny siew i uprawę w szerokich rzędach pojawia się wówczas duży problem z zachwaszczeniem. Drugi okres krytyczny występuje w fazie kwitnienia, zaś trzeci – wypełniania strąków. W czasie kwitnienia niedobór wody może powodować zrzucanie kwiatów, co w efekcie prowadzi do zmniejszenia liczby strąków i obniżenia masy nasion. Niedobór wody w fazie wypełniania strąków, ogranicza masę wytworzonych nasion, a ponadto rośliny nierównomiernie dojrzewają, co może prowadzić do pęknięcia strąków i osypywania się nasion (Sionit i Kramer 1977). Reakcja soi na niekorzystne warunki wilgotnościowe gleby jest zróżnicowana także w zależności od odmiany (Michałek i Borowski 2006, Kołodziej i Pisulewska 2000). Liczne badania z tego zakresu mają na celu dobór odpowiednich odmian do rejonu uprawy oraz maksymalizację plonowania.

3. Przegląd literatury

Dostępność wody w glebie wpływa na plon soi, jednak zapotrzebowanie roślin na wodę jest zróżnicowane w zależności od odmiany i fazy rozwojowej (Ku i in. 2013). W badaniach Michałka i Borowskiego (2006), odmiany o drobniejszych nasionach plonowały lepiej, zarówno w optymalnych warunkach, jak i przy ograniczonej wilgotności podłoża. Różnica w wysokości plonu u odmiany najlepiej (Polan) i najslabiej (Jutro) plonującej wynosiła średnio 26,8% w doświadczeniu wazonowym i 8,9% w warunkach polowych. Rośliny poddane suszy, niezależnie od odmiany, wytworzyły istotnie mniejszą masę nasion, odpowiednio o 49,1 i 19,8%. Największą redukcję plonu wykazano u odmian Jutro i Aldana (średnio o 53,4% w doświadczeniu wazonowym i o 29,4% w warunkach polowych), a najmniejszą - u odmiany Polan w doświadczeniu wazonowym (o 41,2%) i u odmiany Nawiko w doświadczeniu polowym (Tab. 1 i 2). Pod wpływem suszy zanotowano też spadek masy tysiąca nasion (MTN), przy czym różnice nie były statystycznie istotne. Z kolei w badaniach Kołodziej i Pisulewskiej (2000) drobnonasienna odmiana soi Nawiko okazała się bardziej wrażliwa na zmienne warunki pogody niż grubonasienna odmiana Aldana. Wyniki badań własnych przeprowadzonych w 2017 roku (doświadczenie wazonowe w układzie kompletnie zrandomizowanym, w 6 powtórzeniach) także wykazały, że w warunkach mniejszej wilgotności gleby (30% polowej pojemności wodnej) średni plon nasion czterech odmian soi był istotnie niższy niż w warunkach optymalnych (60% polowej pojemności wodnej). Przy ograniczonej wilgotności gleby najbardziej zredukowały plon odmiany Aldana i Annuszka (średnio o 17%). Przy optymalnym poziomie uwodnienia gleby uzyskano mniejszą MTN, jednak różnice nie były statystycznie istotne. Wykazano natomiast różnice odmianowe. Niezależnie od poziomu wilgotności gleby największą MTN charakteryzowała się odmiana Aldana, zaś istotnie mniejszą – odmiany Merlin i Annuszka (Tab. 3). Ponadto, w warunkach stresu rośliny badanych odmian soi były istotnie wyższe oraz wyżej osadzały pierwszy strąk (Rys. 1).

Redukcja plonu nasion soi pod wpływem niedoboru wody w glebie w dużym stopniu uzależniona jest od fazy rozwojowej roślin oraz długości trwania stresu. W trzyletnich badaniach Ecka i in. (1987) stres zainicjowany w fazie początku lub pełni kwitnienia i trwający do fazy początkowego rozwoju strąków zredukował plon nasion soi o 9-13%, natomiast, gdy niedobór wody został utrzymany do fazy pełnego rozwoju strąków i początku rozwoju nasion plon zmniejszył się o 46%. Z kolei stres zapoczątkowany w fazie początku rozwoju nasion, a zakończony w fazie pełni ich rozwoju ograniczył plon jedynie o 15%, zaś rozciągający się do końca okresu wegetacyjnego (5 tygodni) zmniejszył go o 45%. Zadanie roślinom stresu w ciągu ostatnich 3 tygodni okresu

wegetacyjnego (począwszy od fazy pełni rozwoju nasion) przyczyniło się do redukcji plonu nasion o 21%. Według Mandić i in. (2005) gorsze skutki powoduje susza w fazach formowania strąków i wytwarzania nasion niż w fazie kwitnienia. Kwitnienie soi rozpoczyna się od pojawienia się pierwszych kwiatów na niższych węzłach łodygi i trwa przez około 3-4 tygodnie, aż do momentu pojawienia się kwiatów na wierzchołku. W czasie suszy długość okresu kwitnienia wydłuża się, co prowadzi do eliminacji przez roślinę nadmiernej ilości kwiatów. Odrzucane są kwiaty lub już uformowane strąki w dolnej części łodygi, a na wierzchołku inicjowane jest powstawanie nowych. Redukcja kwiatów i strąków zmniejsza się pod koniec kwitnienia i całkowicie ustaje wraz z zakończeniem procesu tworzenia się kwiatów, które przypada w połowie fazy formowania nasion. Soja ma możliwość zasilenia mniejszej ilości strąków niż wytwarza kwiatów, dlatego jedynie 25-30% z zawiązanych kwiatów przekształca się w strąki. Zatem, dopiero brak wody w późniejszych fazach rozwojowych skutkuje znaczącą stratą plonu. Zdaniem Fredericka i in. (2001) susza trwająca od fazy początku kwitnienia do wypełniania strąków powoduje zmniejszenie całkowitego plonu nasion soi głównie poprzez ograniczenie wegetatywnego wzrostu pędów bocznych.

Tab. 1. Wpływ suszy na plon nasion, wybrane elementy struktury i jakość plonu różnych odmian soi w warunkach doświadczenia wazonowego (Michałek i Borowski 2006)

Odmiana	Liczba strąków na roślinie (szt.)		Masa nasion z rośliny (g)		MTN (g)		Białko ogólne (%)		Tłuszcz surowy (%)	
	wilgotność podłoża									
	K*	S*	K	S	K	S	K	S	K	S
1*	10,9	6,6	4,62	2,14	205	184	36,8	38,6	19,4	17,0
2	10,4	6,2	4,38	2,06	210	187	36,7	38,4	18,3	16,2
3	14,9	9,6	5,54	3,26	176	159	37,4	39,8	17,6	14,8
4	13,4	8,6	5,32	2,78	181	169	36,8	38,9	16,2	13,8
5	14,0	8,9	5,75	2,94	166	149	34,8	37,4	15,4	13,9
6	15,2	9,4	5,24	2,64	181	168	38,5	41,6	14,8	13,3
7	14,6	9,8	5,86	2,87	153	135	37,7	39,5	15,0	12,2
NIR	0,57		0,44		r.n.		-		-	

*1-Aldana 2-Jutro 3-Polan 4-Progres 5-Mazowia 6-Gaj 7-Nawiko

*K - obiekt kontrolny (warunki optymalne); *S - stres suszy

Tab. 2. Wpływ suszy na plon nasion, wybrane elementy struktury i jakość plonu różnych odmian soi w warunkach doświadczenia polowego (Michałek i Borowski 2006)

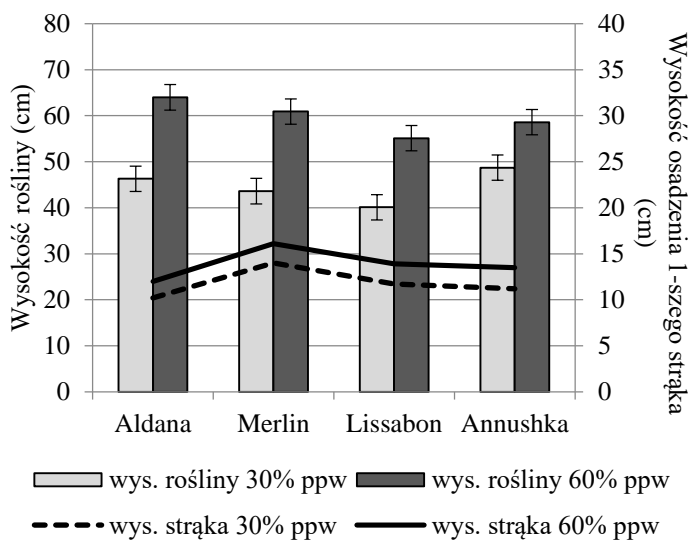
Odmiana	Liczba strąków na roślinie (szt.)		Masa nasion z rośliny (g)		MTN (g)		Białko ogólne (%)		Tłuszcz surowy (%)	
	wilgotność podłoża									
	K*	S*	K	S	K	S	K	S	K	S
1*	19,2	14,2	8,82	6,24	238	218	39,6	42,8	15,0	14,7
2	20,5	15,1	8,78	6,18	246	232	37,9	41,2	14,9	15,1
3	18,8	15,6	8,96	7,46	195	189	42,1	44,0	15,1	14,2
4	19,6	15,1	8,75	7,18	201	198	38,4	42,5	15,2	13,8
5	22,5	19,7	8,58	7,64	172	169	38,9	40,6	14,6	13,6
6	21,2	17,8	8,87	7,23	219	216	42,4	43,5	14,2	13,3
7	23,4	22,3	8,62	7,51	161	155	39,3	42,2	14,3	13,4
NIR	2,37		0,37		r.n.		-		-	

1-Aldana 2-Jutro 3-Polan 4-Progres 5-Mazowia 6-Gaj 7-Nawiko

*K- obiekt kontrolny(warunki optymalne); *S- stres suszy

Tab. 3. Wpływ poziomu wilgotności gleby na plon i skład chemiczny nasion wybranych odmian soi (wyniki badań własnych).

Odmiana	Masa nasion z wazonu (g)		MTN (g)		Białko ogólne (%)		Tłuszcz surowy (%)	
	poziom wilgotności gleby (% ppw)							
	30	60	30	60	30	60	30	60
Aldana	11,8	14,2	118,6	117,0	23,1	24,4	27,9	25,8
Merlin	11,0	10,1	101,7	77,9	27,5	26,2	25,0	23,3
Lissabon	11,4	11,9	109,3	102,8	24,4	24,4	23,8	23,5
Annushka	11,3	13,5	96,5	100,5	22,5	28,8	26,6	25,0
NIR	2,91		24,96		-		-	
średnia dla odmiany								
Aldana	13,0		117,8		23,8		26,8	
Merlin	10,6		89,9		26,9		24,2	
Lissabon	11,6		106,0		24,4		23,6	
Annushka	12,4		98,5		25,6		25,8	
NIR	2,05		17,65		-		-	
średnia dla poziomu wilgotności gleby (% ppw)								
30	11,3		106,5		24,4		25,8	
60	12,4		99,6		25,9		24,4	
NIR	1,45		12,48		-		-	



Rys. 1. Wpływ poziomu wilgotności gleby na wysokość roślin i wysokość osadzenia 1-szego strąka u wybranych odmian soi (wyniki badań własnych).

Dużą wrażliwość na stres, związany z niedoborem wody w glebie, wykazano także w pierwszym okresie krytycznym soi. Michałek i Borowski (2002) stwierdzili, że warunki symulowanej suszy w większym stopniu wpływały na kiełkowanie nasion niż na późniejszy wzrost i rozwój roślin. Optymalny potencjał wody, umożliwiający właściwe kiełkowanie nasion wynosił od

0,0 do -0,4 mPa. Spadek potencjału wody w roztworze istotnie obniżał ilość skielkowanych nasion, szybkość ich kiełkowania oraz przyrost masy kiełków. Wyniki te potwierdzili Samarah i in. (2009). Z kolei według Mandić i in. (2015) stres związany z niedoborem wody w glebie istotnie ograniczał wzrost i rozwój roślin we wczesnych fazach rozwojowych.

W badaniach Desclaux i in. (2000), rośliny poddane stresowi suszy charakteryzowały się mniejszą liczbą węzłów na roślinie oraz krótszymi międzywęzłami, przez co były niższe. Według Michałka i Borowskiego (2006) niedobór wody w podłożu wyraźnie ograniczył wytwarzanie strąków, nie wpłynął natomiast istotnie na liczbę nasion w strąku. W badaniach Sadeghipour i Abbasi (2012) stres wodny powodował zrzucanie kwiatów i strąków, przez co ograniczona została liczba strąków na roślinie, liczba nasion w strąku oraz masa nasion, co ostatecznie spowodowało spadek plonu. Z kolei w badaniach Ohashi i in. (2009) stres suszy zastosowany w fazie wypełniania nasion ograniczył wzrost i rozwój strąków oraz zmniejszył suchą masę rośliny, natomiast dodatkowo wpłynął na wysokość roślin i średnicę pędu.

Niedobór wody w glebie wpływa również na rozwój systemu korzeniowego soi. W warunkach stresu zmienia się struktura korzenia, tj. długość i liczba rozgałęzień bocznych. Według Thu i in. (2014) przy ograniczonym dostępie do wody korzenie soi były krótsze, co ograniczało pobieranie wody z głębszych warstw gleby. Z kolei zdaniem Comas i in. (2013) podczas suszy korzenie soi silniej rozwijały się w głębszych warstwach gleby, gdzie zawartość wody była większa niż w suchej, powierzchniowej warstwie. Wielkość systemu korzeniowego soi jest więc uzależniona nie tylko od dostępności wody, ale także od także innych od warunków siedliskowych, takich jak rodzaj gleby i jej struktura. W warunkach suszy bardzo ważne jest, aby system korzeniowy był rozbudowany i zawierał dużo korzeni bocznych, ponieważ zwiększa się wtedy ilość włócników, a przez to całkowita powierzchnia korzenia, co ułatwia pobranie wody i składników odżywczych.

Do głównych parametrów określających wartość odżywczą nasion soi należą zawartość białka ogólnego i tłuszczu surowego w nasionach, przy czym zawartość białka jest ujemnie skorelowana z zawartością tłuszczu (Chung i in. 2003). Wyniki badań własnych wykazały, że w warunkach stresu zawartość białka była większa (średnio o 6,2%), zaś tłuszczu - mniejsza (średnio o 5,7 %) (Tab. 3.). Także badania przeprowadzone przez Michałka i Borowskiego (2006) wykazały, że pod wpływem ograniczonej dostępności wody zawartość tłuszczu surowego w nasionach soi zmniejszyła się (średnio dla odmian o 13,3%), natomiast wzrosła zawartość białka ogólnego (średnio o 6,0 %) (Tab.1). Odmienne wyniki prezentują natomiast Kołodziej i Pisulewska (2000), którzy wykazali, że przy wzroście opadów o 10 mm zaobserwowano spadek plonu tłuszczu o 5,4 kg/ha u odmiany Nawiko oraz o 9,0 kg/ha u odmiany Aldana. Również Lorenc-Kozik i in. (2007) wykazali wyższą zawartość białka w nasionach soi w latach o dużej ilości opadów niż w roku, w którym opady były znacznie niższe od średniej z wielolecia. Na podstawie innych badań autorzy Ci stwierdzili istotny wpływ warunków pogodowych także na plon oraz zawartość makroelementów w nasionach soi (Lorenc-Kozik i in. 2011). W roku o najkorzystniejszych warunkach termiczno-wilgotnościowych (2002) uzyskali najwyższy plon nasion, o najlepszym składzie chemicznym (Tab. 4 i 5). Brak jednoznacznych wyników, dotyczących zawartości podstawowych składników pokarmowych w nasionach soi w zależności od warunków wilgotnościowych, świadczy o dużej złożoności tego zagadnienia i prawdopodobnym wpływie także innych czynników na skład chemiczny nasion tego gatunku.

Tab. 4. Plon nasion różnych odmian soi ($q \cdot ha^{-1}$) (Lorenc-Kozik i in. 2011).

Lata	Odmiana			Średnio	LSD $_{\alpha=0,05}$ dla lat
	Aldana	Gaj	Nawiko		
2002	2,75	3,17	3,10	3,01	0,89
2003	1,32	1,76	1,38	1,49	
2004	1,30	1,20	1,73	1,41	
Średnio	1,79	2,04	2,07	-	-
LSD $_{\alpha=0,05}$ dla odmian	r.n.			-	

Tab. 5. Zawartość makroelementów u różnych odmian soi (%) (Lorenc-Kozik i in. 2011).

Lata	Odmiana			Średnio	LSD $\alpha=0,05$ dla lat
	Aldana	Gaj	Nawiko		
P					
2002	0,78	0,81	0,90	0,83	0,04
2003	0,69	0,70	0,71	0,70	
2004	0,93	1,01	1,10	1,01	
Średnio	0,80	0,84	0,90		-
LSD $\alpha=0,05$	r.n.				-
Mg					
2002	0,110	0,107	0,120	0,112	0,004
2003	0,102	0,102	0,112	0,105	
2004	0,107	0,107	0,117	0,110	
Średnio	0,106	0,105	0,116		-
LSD $\alpha=0,05$	0,004				-
Ca					
2002	0,17	0,17	0,18	0,17	0,01
2003	0,17	0,17	0,20	0,18	
2004	0,21	0,20	0,23	0,21	
Średnio	0,18	0,18	0,20		-
LSD $\alpha=0,05$	0,01				-
K					
2002	2,11	2,00	2,14	2,08	0,03
2003	1,41	1,52	1,49	1,47	
2004	1,62	1,61	1,63	1,62	
Średnio	1,71	1,71	1,75		-
LSD $\alpha=0,05$	0,02				-

4. Podsumowanie

Duże zapotrzebowanie na białko roślinne, wzrost cen śruty sojowej oraz prowadzone prace hodowlane, ukierunkowane na uzyskanie odmian o wysokiej wartości użytkowej i większej odporności na stresy, spowodowały wzrost zainteresowania uprawą soi w Polsce. Ponadto, obserwowane od wielu lat zmiany klimatu, związane z wydłużaniem się okresu wegetacyjnego i wzrostem liczby dni słonecznych w naszej szerokości geograficznej pozwalają przypuszczać, że soja w niedługim czasie ma szansę na rozszerzenie swojego areалу uprawy w Polsce. Pomimo znacznej genetycznej odporności soi na okresowe niedobory wody w glebie, związanej, m.in. z wielkością systemu korzeniowego oraz owłosieniem ograniczającym transpirację, dłuższe okresy posuszne mogą przyczynić się do znaczącego spadku plonu i pogorszenia jego jakości.

5. Literatura

- Boczar P (2016). Znaczenie gospodarcze soi oraz możliwości rozwoju jej produkcji w Polsce. ZN SGGW PRŚ 16(3), 35-48.
- Chung J, Babka HL, Graef GL, et al. (2003) The seed protein, oil, and yield QTL on soybean linkage group I. *Crop Science* 43(3): 1053-1067.
- Comas LH, Becker SR, Cruz VMV, et al. (2013). Root traits contributing to plant productivity under drought. *Front. Plant Sci.* 4:442.
- Desclaux D, Huynh TT, Roumet P (2000) Identification of soybean plant characteristics that indicate the timing of drought stress. *Crop Sci* 40: 716–722
- Eck HV, Mathers AC, Musick J.T.(1987) Plant water stress at various growth stages and growth and yield of soybeans. *Field Crops Research* 17(1): 1-16.

- Fazeli F, Ghorbanli M, Niknam V (2007) Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biol. Plantarum* 51(1): 98-103.
- Frederick JR, Camp CR, Bauer PJ (2001) Drought-stress effects on branch and mainstem seed yield and yield components of determinate soybean. *Crop Science* 41(3): 759-763.
- Jerzak MJ, Czerwińska-Kayzer D, Florek J, i in. (2012) Determinanty produkcji roślin strączkowych jako alternatywnego źródła białka – w ramach nowego obszaru polityki rolnej w Polsce. *Rocz. Nauk Rol., Ser. G* 99(1): 113–120.
- Kołodziej J, Pisulewska E (2000) Wpływ czynników meteorologicznych na plon nasion i tłuszczu oraz zawartość tłuszczu w nasionach dwóch odmian soi. *Rośliny Oleiste/Oilseed Crops* 21: 759–776.
- Ku YS, Au-Yeung WK, Yung YL, et al. (2013) Drought Stress and Tolerance in Soybean. In *A Comprehensive Survey of International Soybean Research—Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships*; Board, J.E., Ed.; InTech: New York, 209–237.
- Lorenc-Kozik A, Pisulewska E, Gondek K (2011) Impact of Weather Conditions on Chemical Composition of the Seeds of Three Soybean Cultivars, *Ecological Chemistry and Engineering* 18 (8): 1079-1086.
- Lorenc-Kozik A, Pisulewska E, Kołodziejczyk M (2007). Influence of different sowing dates on the yield and protein content in selected soybean cultivar. *Fragm. Agron.* 2(94): 190–198.
- Mandić V, Krnjaja V, Tomić Z, et al. (2015) Effect of water stress on soybean production. *Proceedings of the 4th International Congress New Perspectives and Challenges of Sustainable Livestock Production*, October 7-9.
- Michalek S (1999) Wzrost, wymiana gazowa i plonowanie kilku polskich odmian soi w warunkach suszy. *Zesz. Problem. Post. Nauk Rol.* 469: 217-223.
- Michalek S, Borowski E (2002) Kiełkowanie nasion i wzrost siewek krajowych odmian soi (*Glycine max* (L.) Merr.) w warunkach suszy. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 2002(223-224): 195-201.
- Michalek S, Borowski E (2006) Plonowanie oraz zawartość tłuszczu, kwasów tłuszczowych i białka w nasionach krajowych odmian soi w warunkach suszy. *Acta Agroph.* 8: 459-471.
- Ohashi Y, Nakayama N, Saneoka H, et al. (2009) Differences in the responses of stem diameter and pod thickness to drought stress during the grain filling stage in soybean plants. *Acta Physiol Plant* 31: 271-277.
- Sadeghipour O, Abbasi S (2012) Soybean Response to Drought and Seed Inoculation. *World Applied Science Journal* 17 (1): 55-60.
- Samarah NH, Mullen RE, Anderson I (2009) Soluble sugar contents, germination, and vigor of soybean seeds in response to drought stress. *Journal of New Seeds* 10(2) :63-73.
- Sionit N, Kramer PJ (1977) Effect of water stress during different stages of growth of soybean. *Agron J* 69: 274–278.
- Thu NB, Nguyen Q T, Hoang XL, et al. (2014) Evaluation of drought tolerance of the Vietnamese soybean cultivars provides potential resources for soybean production and genetic engineering. *BioMed Res. Int.* 2014:9

6. Catalase - characterization, industrial applications and sources of isolation – a review

Katarzyna Czyżewska

Division of Bioprocess and Biomedical Engineering, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology

katarzyna.czyzewska@pwr.edu.pl

Keywords: extremophilic microorganisms, food, paper, textile industry, sources of enzyme isolation

Abstract

Catalase, the hydrogen peroxide scavenger plays an important role in industrial applications. Its great catalytic properties lead to the increasing popularity of industrial biocatalysis. Moreover, the available tools of molecular biology, like advanced screening and effectively recombination procedures lead to the production of enzymes, with specific characteristics, that meet the requirements of industrial biocatalysis. The presented work shows the review of currently reports related to the industrial catalase applications, its properties as well as it demonstrates some kinds of microorganisms, which may be recognized as an interesting catalase isolation sources.

1. Introduction

Biocatalysis is considered as a useful tool in modern technological solutions. The environmental benefits related to its application such as reduction of water and energy consumption as well as less waste generation and no by-products formation are appreciated in industrial processes. Additionally, the action under milder reaction conditions increases the importance of enzyme-treatment reactions. Moreover, the increasing industrial enzyme market confirms a great potential of biocatalysis in household care, food, animal feed, technical industries, fine chemicals as well as in pharmaceutical areas. The growing number of microbial enzyme applications allows changing the hazardous technologies related to chemical catalysis to more eco-friendly installations, mainly due to a high enzyme specificity and biodegradability. Biocatalysis in combination with the using of bio-based materials leads to the cleaner production processes (Jegannathan and Nielsen 2013).

2. Catalase characterization

Catalase, the enzyme exhibiting an oxidoreductase and peroxidase activity is considered as one of the most important industrial biocatalysts. It has been identified in plants, animals and microorganisms as an important element of cellular defense mechanisms against oxidative stress. It is localized in peroxisomes, both in prokaryotes and eukaryotes cells, with some exceptions. Catalase is a hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenger, that decomposes it into oxygen and water. It can also participate in the redox-type reactions due to its double activity. Catalases can be classified depending on the physical and biochemical properties as mono-functional haem catalases, catalase peroxidases, non-haem catalases and minor catalase. The classical catalases, mono-functional haem, consist of a tetramer of four identical subunits and their molecular mass is in the range of 200-340 kDa (Sooch et al. 2017).

The unique properties of catalase allow its widely used in many industrial areas, like food, bioremediation, medical, pharmaceutical industries and others (biocorrosion, catalase-based micromotors). The commercial catalase preparations are under the brand name Fermcolase and CAT-IG, Enzeco or Terminox, from Genencor DuPont - USA, Enzyme Development - USA and Novozymes - Denmark, respectively (Sooch et al. 2017). Operational conditions during industrial processes enforce using biocatalysts with suitable properties, like the high activity and stability at extreme values of pH and temperature, their re-using in many batches as well as the stability at high substrate concentrations. Furthermore, the possibility of immobilized preparation formation is highly valued (Schmid et al. 2001). The wide application possibilities of commercial catalase lead to the new enzyme sources searching to meet requirements of industrial biocatalysis. Catalase isolated from

microbial sources is an appreciated industrial enzyme. However, most of the available commercial catalase preparations exhibited stability at narrow pH and temperature range (Sooch et al. 2017), thus the versatile catalases that showed, on the one hand, the high activity and stability in low and high-temperature range and on the other hand in acidic and alkaline conditions are wanted. This approach allows using one enzyme in both various processes, e.g. in food and textile technologies. It is possible by the advanced screening, genetic engineering and modern bioprocess engineering (Hatti-Kaul 2009).

3. Catalase applications

3.1. Food industry

The role of catalase in the food industry is closely related with the applications of H₂O₂ in foodstuff technologies, due to the action of H₂O₂ as a food preservative and sterilizing agent, accepted by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO 1973).

Besides mentioned usages, catalase can be also applied for detection of calcium in milk and water samples as well as for the detection of infected milk. In the first case, the immobilized catalase on the teflon membrane has been proposed for the creation of amperometric bio-device, with the detection range of 1-10 mM and the response time of 1 Min. It has been reported that catalase from bovine liver was the best candidate from other commercial preparations in these applications. Moreover, the conductometric biosensor with immobilized catalase and ethanol oxidase allows for efficient detection of ethanol in food samples. Some of the amperometric biosensors related to the interior localized immobilized catalase preparation can be used to determine alcohol concentration in alcoholic beverages. It has been presented that the usage of the immobilized catalase based Clark-type electrode can be used for the detection of azide compounds in fruit juices, that are considered as a high toxicity. The available electrodes are sensitive for azide in the range of 25-300 μM (Sooch et al. 2017). Furthermore, catalase isolated from *Scytalidium thermophilum* with the additional activity of phenol-oxidase (CATPO- catalase-phenol oxidase) is related to the fungus antioxidant mechanism and it can be recognized in future food and biotechnology applications (Koclar Avci et al. 2013). It has been shown that catalase-phenol oxidase exhibited activity towards catechin, catechol, caffeic acid, and other phenolic substrates. This correlation is important because the end products of these substrates are recognized as phenolic secondary metabolites that can act as anti-oxidant, pro-oxidant and signal-transduction molecules. The usage of bifunctional catalases helps to scavenge free radicals and thus it leads to a reduction of oxidation that is responsible for the deterioration of foodstuffs (Sooch et al. 2017).

The basic application of catalase in the food industry is related to H₂O₂ decomposition from beverages, especially from dairy products after cold pasteurization. It has been reported that H₂O₂ in the concentration of 0.07-0.1% can effectively limit the growth of most of the coliforms during cheesemaking (Farkye 2004). Additionally, 0.04-0.05% H₂O₂ successfully preserve the raw milk up to 24 hours during cold pasteurization (Sooch et al. 2017).

The anti-microbiologically-triggered corrosive action of catalase is regarded in the food industry and allows for prevention of machines corrosion and biofilm formation at the metal surface (Sooch et al. 2017).

3.2 Textile industry

The application of catalase in the textile industry is related to the bleaching processes, in which hydrogen peroxide is widely used. The hydrogen peroxide-triggered bleaching effect is considered as a result of perhydroxyl ion (HO₂⁻) action, which is generated in highly alkaline conditions. It allows for oxidation of organic compounds and achieving the satisfactory effects of fibers bleaching. It has been reported the optimal values of pH and temperature for efficient bleaching processes, that were in the range of 10.5-10.8 and 60-90°C, respectively (Brooks and Moore 2000). The textile processing units, especially dyeing, demand the complete removal of H₂O₂ from bleaching bath to provide a high quality of dyeing processes. Even trace residues of H₂O₂ in bleaching bath can interfere the dyeing processes by interaction with dyes. Thus, the enzymatic decomposition of H₂O₂

is noted in many patent reports. The traditional approach to H_2O_2 removal from bleaching bath was related to multi-step rinsing procedure with hot water, that was economically disadvantageous (Choudhury 2004).

The requirements of textile, paper as well as the domestic and commercial laundry industries forced application of appropriate technologies, which lead to receiving of fibers without damaging of cellulose structure. Additionally, by the choice of the best results and thus technological solutions, the impact on the environment is evaluated. The biocatalysis method is considered as a satisfactory solution, affected positively on the environment, for the textile industry which engages a lot of commercial enzymes like, amylases, catalases, cellulases, laccases, lipases, proteases, pectinases, oxido-reductase and xylanase (Choudhury 2004).

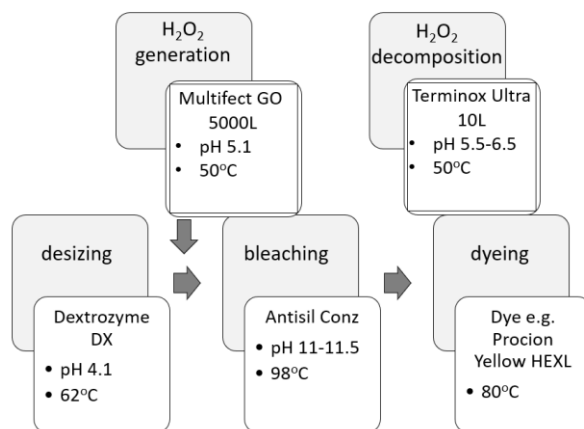


Fig. 1. The enzymatic one-bath process of desizing, bleaching and dyeing for cotton fabrics (Eren et al. 2009).

It has been reported, that catalase-treatment is safe for fibers and dyes. Furthermore, it allows to use of one bath to desizing, bleaching and dyeing processes, due to the application of enzyme mixture, containing amyloglucosidase/pullanase, glucose oxidase and catalase, respectively (Eren et al. 2009). In the proposed method, it was used the commercial preparations from Novozymes and Genencor. All processes were conducted at the temperature in the range of 50-98°C. Thus, thermostable enzymes application was necessary. The operational conditions of bleaching were pH 11.0-11.5 and 98°C. To provide the highest activity of catalase (Terminox Ultra 10L) it was necessary the change of reaction conditions on pH 5.5-6.5 and 50°C (Fig.1.). To improve the process economic conditions, it can be proposed the other thermostable catalase, that was active and stable at a temperature above 70°C (Sarmiento et al. 2015), wherein in most cases, the temperature of bleaching bath is about 100°C. It has been shown that enzymatic one-bath process caused 42% decreasing of COD (chemical oxygen demand) and 21% decreasing of BOD (biological oxygen demand), in contrast to conventional processes (Eren et al. 2009).

4. The new sources of catalase isolation

Catalase is a widespread enzyme, occurring both in eukaryotic and prokaryotic representatives. One of the well-known and often used catalase preparation in industrial applications is catalase from bovine liver. The pH and temperature limitations during its application force to looking for a new preparation, which meets the requirements of the industry. The obtainability of new genome sequences, isolation of metagenomes from extremophilic sources, screening genomic libraries, protein-engineering, biochemical-reaction engineering as well as the current bioinformatics analyses are the useful tools during searching of new enzyme isolation sources. The extreme environments in terms of temperature, pH, acidity, alkalinity, pressure and salinity help in the discovery of new enzymes for industrial applications (Littlechild 2015). Bacteria, fungi and yeast

have been examined in the context of enzymes bio-synthesis, their isolation, properties characterization, production on a bench-scale as well as a pilot-scale and finally their further commercial applications. Additionally, the possibilities of molecular techniques lead to improving the quality and performance of microbial enzymes (Nigam 2013).

The biggest limitations of industrial operational conditions and biocatalysis are related to the temperature values. With the temperature increase, the reaction rate is higher and the process time can be reduced, which is involved with the economic benefits. On the other hand, current technologies strive to the reduction of temperature to optimum values to balance environmental and economic needs. In this case, the thermophilic microorganisms seem to be the best solution. The thermostable enzymes, due to the action at a higher temperature than normal biocatalysts can decrease the possibilities of microbial contaminations. Their application promotes the breakdown and digestion of raw materials, as well as the higher reaction temperature, enhances the enzyme penetration inside substrate by the reduction of substrate viscosity (Nigam 2013). Catalase isolated from *Ureibacillus thermosphaericus* FZSF03 exhibits a high activity. It was identified as a monofunctional haeme catalase of 52 kDa. The purified preparation of catalase showed the specific activity of 219,360 U/mg, that was higher than others commercial catalases, for which the activity is standardly above 50,000 U/ml. Moreover, its stability at 60°C and pH 10 emphasizes great application possibilities for industrial production and applications, e.g. a direct addition to the bleaching bath during textile processes (Jia et al. 2017). Another example of microbial thermophilic catalase is catalase isolated from *Thermus* species strain YS 8-13. The activity of this manganese catalase has been noted as 8000 U/mg at 65°C. Additionally, it has been exhibited the highest activity at 85°C and in the pH range of 7-10. In the contrast to other catalase representatives, the presented consisted of six identical subunits of molecular weight 36 kDa. Furthermore, in the catalase from *Thermus* sp. has been identified the homology sequence to catalase isolated from mesophilic *Lactobacillus plantarum* (Kagawa et al. 1999).

Besides thermostability, another desirable property of commercial enzyme preparations is a stability at extreme pH range, like 0-3 or 10-12. The recombinant catalase (KatA) expressed in *Escherichia coli* BL21 showed the high stability at 50°C and pH 6-10. Its activity has been noted as 78.762 U/ml. Moreover, the fed-batch fermentation allowed to get 92.5% enzyme production yield. The presented properties of alkaline catalase were appreciated in textile applications, where KatA was used to H₂O₂ decomposition after cotton fabrics bleaching. As a result, it has been shown that KatA addition led to a reduction of water, steam and electric power consumption by 25%, 12%, 16.7%, respectively. Furthermore, it has been noted no loss of productivity and quality of cotton fabrics after biocatalytic H₂O₂ decomposition (Yu et al. 2016). Varied catalase applications in food industry encourage the exploration of new enzymes, exhibited the high activity and stability in acidic conditions. It has been presented, that fungi which are capable of growing at low pH (1.0 or 2.5) and 42-45°C are considered as a great source of acidic catalase isolation. One of them was strain belonging to *Aspergillus* sp. A lot of studies have been reported on the great catalytic properties of catalase isolated from *Aspergillus niger* during dairy processes (Isobe et al. 2006; Sooch et al. 2017).

The efficient microbial catalase production is related to the optimization of the fermentation process. The kind and properties of medium for growth decide on the profitability of proposed solution. The recent studies have been shown great opportunities for biomass conversion and its utilization in industry technologies. Moreover, lignocellulosic biomass can be used as a growth medium for *Scytalidium thermophilum*, the thermophilic fungus, which allows for bifunctional catalase-phenol oxidase isolation (Koclar et al. 2013).

Among the potential candidates for industrial catalase, have been reported some interesting examples. The halo-tolerant catalase isolated from *Halomonas* sp. SK1, expressed in *E. coli* is stable in the presence of 4M KCl. Additionally, this catalase is considered as an alkali-tolerant, because of its high activity at pH 10. It showed significant loss of activity during exposition on 37°C per 5 Min, thus it was classified also as a thermo-sensitive. Moreover, the easy susceptibility to genetic modification allowed improving its thermal-stability to 45°C (Thuy et al. 2004). The tolerance on the high substrate concentrations is one of the key factors, which decided on enzyme industrial suitability. It has been presented that catalase isolation from *Methanosarcina acetivorans* and its expression in

E. coli (EcKatG) led to a 100-fold increase of catalase activity, compared to uninduced cells. Moreover, it has been observed a 10-fold increase in the resistance of recombinant catalase to H₂O₂ compared to control. Additionally, the EcKatG-induced cells were able to grow in the presence of high H₂O₂ concentration, that inhibited or killed uninduced cells (Jennings et al. 2014). The costs related to the enzyme isolation and purification often decide on the final product price. The direct microorganism addition to food is controversial. But some of them have a GRAS status and are considered as a safe for our health. Venkateshwaran et al. (1999) have been presented that the addition of the cell-free extract from *Saccharomyces cerevisiae* CFR-201 used as a catalase source, removed 99.9% of H₂O₂ after cold milk pasteurization, at 45°C, 0.05 % H₂O₂ for 1 hour.

5. Conclusion and future perspectives

The benefits related to biocatalysis have an impact on the current aspect of industrial technologies. Moreover, the selection of suitable biocatalyst to the strictly defined operational conditions allows obtaining the efficient process. Additionally, we can still modify the older technological solutions by application of extremophilic enzymes. The parallel development of molecular biology, chemical engineering as well as installation-engineering solutions lead to increase the economic benefits and decrease environmental footprint. The well-known catalase applications may be increased through molecular modification possibilities.

6. References

- Brooks R, Moore SB (2000) Alkaline hydrogen peroxide bleaching of cellulose. *Cellulose* 7: 263-286.
- Choudhury AKR (2014) Sustainable textile wet processing: applications of enzymes. In SS Muthu (Eds.), *Roadmap to sustainable textiles and clothing. Eco-friendly raw materials, technologies and processing methods*, (pp. 217-219), Springer.
- Eren HA, Anis P, Davulcu A (2009) Enzymatic One-bath Desizing – Bleaching – Dyeing Process for Cotton Fabrics. *Textile Research Journal* 79(12): 1091-1098.
- Farkye NY (2004) Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology* 5791-98.
- Hatti-Kaul R (2009) Enzyme production. In HW Doelle, JS Rokem, M Berovic (Eds.), *Biotechnology- Volume V: Fundamentals in Biotechnology* (pp. 21-23), Oxford, United Kingdom, EOLSS Publications.
- Isobe K, Inoue N, Takamatsu Y, et al. (2006) Production of Catalase by Fungi Growing at Low pH and High Temperature. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(1): 73-76.
- Jegannathan KR, Nielsen PH (2013) Environmental assessment of enzyme use in industrial production- a literature review. *Journal of Cleaner Production* 42: 228-240.
- Jennings ME, Schaff CW, Horne AJ, et al. (2014) Expression of a bacterial catalase in a strictly anaerobic methanogen significantly increases tolerance to hydrogen peroxide but not oxygen. *Microbiology* 160: 270-278.
- Jia X, Lin X, Tian Y, et al. (2017) High production, purification, biochemical characterization and gene analysis of a novel catalase from the thermophilic bacterium *Ureibacillus thermosphaericus* FZSF03. *International Journal of Biological Macromolecules* 103: 89–98.
- Kagawa M, Murakoshi N, Nishikawa Y, et al. (1999) Purification and Cloning of a Thermostable Manganese Catalase from a Thermophilic Bacterium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 362(2): 346-355.
- Koclar Avcı G, Coruh N, Bolukbasi U, (2013) Oxidation of phenolic compounds by the bifunctional catalase–phenol oxidase (CATPO) from *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 661-672.
- Littechild JA (2015) Enzymes from extreme environments and their industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3: 161.
- Nigam PS (2013) *Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications*. *Biomolecules* 3:597-611.

- Sarmiento F, Peralta R, Blamey JM (2015) Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3: 148.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, et al. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409: 258-268.
- Sooch BS, Kauldhar BS, Puri M (2017) Catalases. Types, Structure, Applications and Future Outlook. In RC Ray, CM Rossel (Eds.), *Microbial Enzyme Technology in Food Applications* (pp. 241-250). Boca Raton, CRC Press.
- Thuy LHA, Phucharoen K, Ideno A, et al. (2004) Alkali- and Halo-tolerant Catalase from *Halomonas* sp. SK1: Overexpression in *Escherichia coli*, Purification, Characterization, and Genetic Modification. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68(4):814-819.
- WHO Food Additives series no. 5, 1973, Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents.
- Venkateshwaran G, Somashekar D, Prakash MH, et al. (1999) Production and utilization of catalase using *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* 34: 187–191.
- Yu Z, Zheng H, Zhao H, et al. (2016) High level extracellular production of a recombinant alkaline catalase in *E. coli* BL21 under ethanol stress and its application in hydrogen peroxide removal after cotton fabrics bleaching. *Bioresource Technology* 214: 303–310.

7. Enzymatic degradation of lignocellulosic biomass – the importance and strategies in current technologies

Katarzyna Czyżewska, Halina Maniak

Bioprocess and Biomedical Engineering Group, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology

katarzyna.czyzewska@pwr.edu.pl

Keywords: lignocellulose, hemicellulase, xylanase, xylosidase, laccase, cellulase, industrial biocatalysis

Abstract

Biomass is considered as an important source of green energy. The availability of lignocellulosic biomass with the additional possibility of the biomass wastes reduction and receiving of value-added products is interesting for modern industrial technologies. The effective industrial biocatalysis of cellulose, hemicellulose and lignin is a challenge for the food, paper and biofuel industry. This work presents the characteristic of lignocellulose components, their enzymatic hydrolysis and industrial application of lignocellulosic conversion products.

1. Introduction

Biomass is recognized as a renewable energy source. It can contribute to sustainable development. Moreover, it is locally available – lignocellulosic sources include agricultural wastes, and its conversion is economically beneficial. Furthermore, its use can play an important role in reducing greenhouse gas emission (Hoogwijk et al. 2003). Additionally, biomass can be a source of industrial valuable products like biofuels and value-added fine chemicals. It can be used as cheap energy source for microbial fermentation and finally in enzyme production. Lignocellulose, the building structure of plant cell wall, is a popular substrate in green technologies. Its renewable nature and abundance are appreciated in the industrial technologies. Creating an efficient conversion of the main lignocellulosic components, such as lignin, cellulose and hemicellulose to valuable products is still a challenge for modern technologies (Anwar et al. 2014).

2. Lignocellulose components

2.1 Cellulose

Cellulose is a linear polymer $(C_6H_{10}O_5)_n$, built from the subunits of 1,4- β -D-glucose, which are linked by β -1,4-glucosidic bonds. It is the main component of plant cell wall (40-50%), next to 20-40% of hemicellulose and 20-30% of lignin. Cellulose is embedded in a matrix of hemicellulose, pectin and lignin. Its structure is formed by crystalline and highly organized microfibrils that are linked by intermolecular hydrogen bonds and van der Waals forces (the crystalline cellulose) and the region in which these bonds are broken and the arrangement of microfibrils is disorderly (the amorphous cellulose) (Quiroz-Castaneda et al. 2013). The quantitative ratio of crystalline and amorphous regions in treated substrate determines the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis. The critical factors to the assurance of high cellulose conversion are: the degree of polymerization (10 000-20 000), the accessibility of the cellulose surface for enzyme binding and the enzyme adsorption (Zhang et al. 2004).

2.2 Hemicellulose

Hemicellulose is considered as a second most abundant polysaccharide in nature. It is a branched-chain heteropolymer, that consist of D-xylose, D-glucose, D-mannose, D-galactose, L-arabinose, 4-O-methyl-D-glucuronic acid and other monomeric sugars (Chaabane et al. 2013). Hemicelluloses can be grouped into four classes in terms of the main types of sugar residues, such as xyloglucans, xylans, mannans and mixed-linkage- β -glucans. First class occur in primary cell walls of all higher plants. Moreover, it's tightly bonded to cellulose microfibrils through hydrogen bonds.

Second, the xylan group is localized in secondary cell walls of hardwood species and herbaceous plants. Xylan is the most abundant hemicellulose in nature. It contains mainly β -D-xylopyranolys residues linked by β -1,4-glycosidic bonds. Heteroxylan the most popular type of xylan, consists of xylose residues in the backbone with acetate as well as arabinose and glucose residues. The third group of hemicellulose representatives, glucomannans and galactomannans are the dominant hemicelluloses in conifer secondary cell walls. Finally, the mixed hemicellulose group is identified in *Poales* and some peridiphytes (Schadel et al. 2010; Van Dyk et al. 2012).

2.3 Lignin

Lignin is a heterogeneous polymer, consisted of phenyl-propane units (p-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols) linked by ether bonds. It is present in all plants and it fills the gap between cellulose and hemicellulose fibers (Anwar et al. 2014). Lignin is recognized as the most important factor limiting enzymatic hydrolysis of biomass by cellulase and hemicellulase. It creates a physical barrier that limits the accessibility of enzymes to the substrate surface. Moreover, it has been shown that cellulases can be non-specifically adsorbed to the lignin. Additionally, the residual lignin after biomass pretreatment can block the progress of cellulose conversion. Many reports are suggested various methods of lignin removal, including physical, chemical and enzymatic approaches (Van Dyk et al. 2012).

3. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose.

3.1 Cellulases

The effective enzymatic cellulose hydrolysis requires the synergistic action of enzymes mixture, which the activity is much higher than the sum of the activity of its individual components. Endo-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.4) hydrolyzes randomly the intramolecular β -1,4-glycosidic bonds of cellulose chains to obtain new chain ends. Next, exo-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.91 and EC 3.2.1.176 (cellobiohydrolase)) cleaves cellulose chain at the reducing and non-reducing ends to produce cellobiose or glucose. Finally, β -glucosidase (EC 3.2.1.21 (cellobiases)) hydrolyzes cellobiose to glucose. The most important limiting phenomenon of the effective cellulose hydrolysis and thus lignocellulose conversion is the product inhibition. The products of cellulose hydrolysis, glucose and cellobiose, inhibit the activity of the enzymes and hinder effective biomass enzymatic decomposition. (Quiroz-Castaneda et al. 2013).

3.2 Hemicellulases

Hemicellulose due to its complex structure needs a large number of enzymes to effectively hydrolyze. The enzymes involved in hemicellulose hydrolysis can be divided into depolymerizing enzymes and enzymes that remove substituents which may pose steric hindrances to the first group of enzymes. Endoxylanases allow for the xylan backbone cutting into shorter oligosaccharides, while β -xylosidases decompose short xylo-oligosaccharides into xylose. A similar hydrolysis scheme is observed during mannan hydrolysis, with the synergistic action of endomannanase and β -mannosidase. To provide the access to the core of xylan and mannan, the removal of different substituents linked to the main backbone by ancillary enzyme action is necessary. Among them, α -L-arabinofuranosidases, α -glucuronidase, ferulic acid esterase, α -galactosidase, feruloyl esterase, acetyl xylan esterase and acetyl mannan esterase are commonly used (Van Dyk et al. 2012).

3.3 Laccases

Laccases belong to a group of polyphenol oxidase (PPO), copper-containing enzymes. They oxidize phenolic substrate usually *ortho* or *para*-diphenols to related di-chinons by using molecular oxygen reduced to water molecules. In higher plants, laccases are responsible for cross-linking of *para*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohol precursors in a process of a lignin formation. On the contrary to plants, the laccases of fungal origin (white-rot fungi, grey mold) are responsible for lignin decomposition and plant pathogenesis (Strong and Claus 2011). The substrate range for the laccases is much more diverse and contains variety of organic (aromatic and non-aromatic) or inorganic molecules. The ability to oxidize such imposing number of compound is due to a one-electron radical-

catalyzed reaction mechanism in which enzyme might participate directly or indirectly – through mediator system. In this mechanism, the initial radical product is unstable and undergoes either enzyme-catalyzed oxidation or a non-enzymatic reaction such as hydration, disproportionation or polymerization (Kunamneni et al. 2007). In non-enzymatic reactions, laccases oxidize small molecules (mediators) that can in turn oxidize bulky substrate *e.g.* lignin which is too large to match to active site of the enzyme. The mediator system provides laccases a wide substrates specificity to oxidize, consequently, the enzymes found a numerous biotechnological applications.

4. Lignocellulose industrial applications

In the future perspective, it is being predicted that non-renewable sources of energy will run out soon, therefore renewable sources of energy are gaining much of interest nowadays. The key alternative for carbon and hydrocarbon resources seems to be a plant biomass. The lignocellulose complex is the most abundant raw material on Earth. It is estimated that its annual production is 60 billion tons (Christopher 2014). The biomass offers a variety of compounds from complex polymers to biologically active molecules.

The technology of plant-based manufacture is a complex process. It includes lignocellulose pretreatment (separation cellulose, hemicellulose and lignin), its hydrolysis and conversion to desired products: biofuels, chemicals or energy. The crucial role in the process is degradation of biopolymers. Nowadays, the most efficient catalysts are enzymes.

4.1 Cellulases

These enzymes are known to be of scientific and industrial interest from the last century and almost 40 years commercially available. The industrial sectors using cellulases are pulp and paper, textile, biofuel, brewing and winemaking, food processing, animal feed, agriculture, biomass refining (olive oil and carotenoid extraction), detergent and waste management (Kuhad et al. 2011).

The areas of cellulases activity in the paper industry is usually pulping wood biomass but also removing dyes agents from waste papers and magazines (Karmakar and Ray 2011). Classical pulping is connected with physico-chemical raw material delignification, which is accompanied by the formation of cellulose fines. These small fiber particles embed and block the pores in material surface. Cellulases improved drainage of the material by reducing amount of the fines. The other cellulases application is deinking process. It includes partial hydrolysis of cellulose fibers following by ink release from the fiber surface. It was postulated that uses of cellulases in paper industry has beneficial effect due to softening the reaction condition by mitigation of alkali usage, the lack of negative influence on fiber properties such as brightness, strength, pulp freeness, cleanliness and cost savings which results from limitation in chemicals usage and exclude energy consumption corresponded to mechanical pretreatment.

The application of cellulases in second generation biofuel production is one of the most popular nowadays. Lignocellulose complex serves as a carbon tank – a reservoir of monosaccharides being an excellent alternative for starch raw materials for bioethanol production. The main cellulose origins are plants but it is also recycled form paper industry waste products and may be reused many times. For example, cellulases were employed for newspaper cellulosic waste hydrolysis (Kuhad et al., 2010). Such material is composed of a high content of holocellulose – 70% (cellulose and hemicellulose) and lignin – 16%. Due to a significant amount of dyes deinking properties with the following hydrolysis of cellulose in the waste material were investigated. In comparison to other enzymes (xylanases, laccases), cellulases from *Trichoderma reesei* removed ink from the surface of the newspaper most effectively. The resulted deinked material was hydrolyzed in 59.8% by enzyme cocktail contained the cellulases and xylanase. One of the most promising strategies for effective cellulose hydrolysis which allows to overcome a phenomenon of the cellulases product inhibition is simultaneous saccharification and fermentation (SSF) (Tahezadeh and Karimi 2007). Enzymatic hydrolysis and fermentation processes take place in the same reaction mixture, in which glucose and cellobiose produced during the first stage are fermented by microorganisms. Consequently, enzyme inhibition is avoided by keeping the concentration of fermenting sugars at a low level. The limitation of SSF are the optimal reaction conditions which should be provided for both processes particularly

with respect to pH and temperature. The difference between the optimal temperature for cellulolytic enzymes and fermenting microorganisms (*Saccharomyces cerevisiae*) is usually 15°C. This could be overcome by using thermophilic microorganisms such as *Candida acidothermophilum* and *Kluyveromyces marxianus*. The other drawback is a high ethanol concentration which partially inhibits cellulases activity at 30 g/l. Nevertheless, the yield of ethanol production is much higher and concentration of enzyme is lower in comparison to saccharification and fermentation conducted as two separated processes.

4.2 Hemicellulases

Hemicelluloses are sources of various valuable industrially products. Due to their diversity, the individual components of hemicellulose can be removed from lignocellulose by various pretreatment methods. Moreover, hemicelluloses can be hydrolyzed into hexoses, like glucose, galactose and mannose as well as into other pentoses like xylose and arabinose. Xylose is the main goal of enzymatic hemicellulose hydrolysis. The products of hemicellulose hydrolysis can be transformed into ethanol fuel and value-added products, mainly 5-hydroxymethylfurfural, xylitol, ethanol, butanediol, butanol as well as single-cell protein. Additionally, hemicelluloses can be converted into biopolymers, such as polyhydroxyalkanoates and polylactates (Canilha et al. 2013).

4.2.1. Xylanases

Xylanases due to their great catalytic properties during xylan hydrolysis are widely used in the brewing, food, feed industries as well as during pulp bleaching and waste treatment. Xylanases are used in bread-making to improve the texture, loaf volume and shelf life of bread (Yegin 2017). In some cases, the synergy between xylanases and other enzymes brings satisfactory results, e.g. the synergistic action of xylanase and β -1,3-1,4-glucanase allows to reduction of the feed intestinal viscosity and improvement of filtration rate as well as the extraction yield in the brewing applications. The mixture of xylanase, pectinase, carboxymethylcellulases and amylases is used for juice clarification and in the brewing industry to improve the efficiency of filtration (Yegin 2017; Wang et al. 2016). *Aspergillus niger*, *Marasmius* sp. and *Paenibacillus* sp. strain E18 are recognized as a satisfactory xylanase isolation sources. Additionally, the obtained enzymes exhibited cellulase activity. Furthermore, the available genetic engineering tools allow for the creation of more sophisticated biocatalysts that can be multifunctional. The industrial application of xylanase is related to the strongly acidic and high-temperature conditions. Furthermore, during biomass conversion acidic pretreatment is popular. Thus, xylanase stability at acid environment is desirable. Xylanase isolated from brown rot fungus such *Gloeophyllum trabeum*, due to its optimum activity at pH 4.5-5.0 and 75°C and stability in a wide range of pH 2.0-7.5 and 70°C can be a potential candidate in food applications, especially in the feed and brewing industry (Wang et al. 2016). Fungi *Aureobasidium pullulans* are known from the extremely high production level of xylanase. Xylanase isolated from *A. pullulans* can be utilized in baking, fruit juice production, wine-making and brewing due to its thermal- and acidic-stability (pH 3.0-8.0, 30-50°C) as well as the high tolerance to ethanol (10%) (Yegin 2017).

Xylanases are widely used to reduce pollutions in the paper industry. Additionally, they improve the bleaching processes of paper. Thermostable, alkaline endo xylanase isolated from *Streptomyces althioticus* is a potential candidate for paper-industry biocatalysis. It shows optimum activity at 60°C and pH 8 and retains in these conditions 98.72% of residual enzyme activity, after 1 hour of incubation. Moreover, it remains active at a wide range of pH and temperature, 6.0-11.0 and 40-80°C, respectively. It has been shown, that the brightness of kraft pulp was improved through endo xylanase addition (Luo et al. 2016).

4.2.2. Xylosidases

β -xylosidase activity is necessary to overcome the problem of product inhibition, which is common in biomass conversion. β -xylosidase consumes xylobiose and xylotriose providing a high xylanase activity. Recombinant β -xylosidase isolated from *Clostridium clariflavum* and expressed in *Escherichia coli* BL21 is recognized as a promising solution for xylan saccharification in the biofuels

industry. It exhibits optimum activity at pH 6.0 and 60°C. Moreover, it retained 94.4% and 75.4% activity after 1-hour incubation in 55°C and 60°C, respectively. The obtained conversion yield of corncob xylan to xylose was 60.9% (Geng et al. 2017).

4.3 Laccases

Biotechnology is the basic area of fungal laccases application. Catalytic activity is strictly connected to their natural ability to lignin decomposition. Therefore, laccases are effectively used in paper industry as the pretreatment of biomass in biopulping and biobleaching processes. Pulping concerns wood treating to separate cellulose fibers. A classical process joins physical and chemical methods. Mechanically, wood is pressed, cut and grind in the presence of water and high temperature. The physical pretreatment aims the reduction of the biomass particle size and crystallinity of cellulose area. Chemical step engages different reagents (usually alkali) to lignin removal and improvement of cellulose fibers properties. A purpose of bleaching is related to the improvement of pulp brightness and cleanliness. Biobleaching idea is based on mechanical and biological methods. The second involves wood-decaying Basidiomycetes which colonize wood and degrade lignin by secreted into wood laccases. (Bajpai 2012). The laccase-mediator system has gain more attention recently. In general, the strategy includes oxidizing and cleaving phenolic and non-phenolic lignin components. During the reaction, lignin becomes depleted in pulps, then chemical bleaching is conducted which results in the lower content of residual lignin and higher pulp brightness. The process was first introduced as xylanase-aided bleaching of kraft pulps. Xylanases partially hydrolyzed xylan which was redeposited on the fiber surface and consequently improved the access off bleaching alkali to residual lignin (Christopher 2014). It is postulated that application of laccases provides milder and cleaner strategies during pretreatments of wood pulp with simultaneous preservation of the cellulose integrity (Kunamneni et al. 2007).

Laccases were found to be also effective catalysts in detoxification and bioremediation soil contamination and wastewaters from industry connected to pulp and paper, dye and printing, olive oil milling, distillery and municipal wastewaters, as it is described in details by Strong and Klaus (Strong and Klaus 2011).

5. Conclusions

The society with a high level of development has a serious impact on nature, evaluated as the environmental footprint. Depletion of fossil fuels with simultaneous increasing energy demand forces to search the alternative energy sources. The green energy connected with the enzymatic biomass hydrolysis is seen as an interesting solution. The difficulties related to the low efficiency of lignocellulose industrial enzymatic hydrolysis can be overcome by the searching of new enzyme isolation sources and use of the extremophilic enzymes.

6. References

- Anwar Z, Gulfraz M, Irshad M (2014) Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(2): 163-173.
- Bajpai P (2012). Biobleaching. In Bajpai P (Eds.) *Biotechnology for Pulp and Paper Processing*. Springer. pp. 93-137. ISBN 978-1-4614-1409-4
- Canilha L, de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues R, Fernandes Antunes FA, et al. (2013) Bioconversion of Hemicellulose from Sugarcane Biomass Into Sustainable Products. In Chandel AK, da Silva SS (Eds.). *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass- techniques, applications and commercialization*. In Tech. pp. 22-32. ISBN 978-953-51-1119-1
- Chaabane FB, Marchal R (2013) Upgrading the Hemicellulosic Fraction of Biomass into Biofuel. *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP Energies nouvelles* 68(4): 663-680.
- Christopher LP (2014) Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in Energy Research* 2(12): 1–13.

- Geng A, Wang H, Wu J, et al. (2017) Characterization of a β -Xylosidase from *Clostridium clariflavum* and Its Application in Xylan Hydrolysis. *BioResources* 12(4): 9253-9262.
- Hoogwijk M, Faaij A, Broek R, et al. (2003) Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. *Biomass and Energy* 25(2):119-133.
- Karmakar M, Ray RR (2011) Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. *Research Journal of Microbiology* 6(1): 41–53.
- Kuhad RC, Gupta R, Singh A (2011) Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* 2011: 1–10.
- Kuhad RC, Mehta G, Gupta R, et al. (2010) Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy* 34(8), 1189–1194.
- Kunamneni A, Ballesteros A, Plou FJ, et al. (2007) Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. In A. Mendez-Vilas (Eds.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. FORMATEX*. pp. 233–245. ISBN-13: 978-84-611-9421-6
- Luo L, Cai L, Wang C (2016) Purification and characterization of an alkaliphilic endo-xylanase from *Streptomyces althioticus* LMZM and utilization in the pulp paper industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 91: 1093-1098.
- Schadel C, Blochl A, Richter A, et al. (2010) Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 1–8.
- Strong PJ, Claus H (2011) Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41(4): 373–434.
- Taherzadeh MJ, Karimi K (2007) Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources* 2(4): 707–738.
- Quiroz-Castaneda RE, Folch-Mallol JL (2013) Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. In Chandel A.K., da Silva S.S. (Eds.). *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass- techniques, applications and commercialization*. In Tech. pp. 119-155. ISBN 978-953-51-1119-1
- Van Dyk JS, Pletschke BI (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances* 30: 1458–1480.
- Wang X, Luo H, Yu W, et al. (2016) A thermostable *Gloeophyllum trabeum* xylanase with potential for the brewing industry. *Food Chemistry* 199: 516–523.
- Yegin S (2017) Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with application potential in the food industry. *Food Chemistry* 221: 67-75.
- Zhang Y.H.P., Lynd L.R. (2004). *Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems*
- Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems
- Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems
- Zhang YHP, Lynd LR (2004) *Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems*. *Biotechnology and Bioengineering* 88(7): 797-824.

8. Paratuberkuloza u zwierząt wolno żyjących

Paratuberculosis in the wild animals

Didkowska Anna⁽¹⁾, Orłowska Blanka⁽¹⁾, Żygowska Marta⁽²⁾, Wadowska Iza⁽³⁾

⁽¹⁾ Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

⁽²⁾ studentka VI roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

⁽³⁾ Katedra Nauk Morfologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Opiekun naukowy: dr hab. Krzysztof Anusz, prof. SGGW

Didkowska Anna: anna.didkowska@wp.pl

Słowa kluczowe: choroba Johnego, MAP, przeżuwacze, dzikie zwierzęta

Streszczenie

Paratuberkuloza (choroba Johnego) to choroba objawiająca się przewlekłym zapaleniem jelit spowodowanym przez bakterie gram-dodatnie *Mycobacterium paratuberculosis* ssp. *avium* (MAP). Choroba powoduje istotne straty ekonomiczne w hodowli bydła na całym świecie. Mimo iż za główny jej rezerwuuar uważa się domowe przeżuwacze to choroba jest stwierdzana także u zwierząt wolno żyjących (np. jelenie, kozice górskie, króliki, lisy). Artykuł ma na celu zwrócenie uwagi, że zwierzęta wolno żyjące mogą przyczyniać się do pojawiania się ognisk choroby u zwierząt gospodarskich wykorzystywanych w produkcji żywności, jak i odwrotnie. Należy zaznaczyć, iż sprawowanie nadzoru nad występowaniem zoonoz w środowisku należy do istotnych zadań ochrony zdrowia publicznego. Pomimo tego, że paratuberkuloza nie jest typową zoonozą to w ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień o zależności między chorobą Johnego, a chorobą Leśniowskiego-Crohna u ludzi. Dodatkowo, istotnym problemem mogą być wyniki fałszywie dodatnie w badaniach w kierunku gruźlicy spowodowane zakażeniem MAP. Zasadnym byłoby równoległe prowadzenie diagnostyki w kierunku paratuberkulozy przy badaniu zwierząt wolno żyjących pod kątem gruźlicy.

1. Wstęp

Paratuberkuloza (choroba Johnego) to choroba objawiająca się przewlekłym zapaleniem jelit prowadzącym do enteropatii białkogubnej. Jest ona spowodowana przez gram-dodatnie bakterie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Głównym rezerwuarem patogenu są gospodarskie i dzikie przeżuwacze. Paratuberkuloza najczęściej opisywana jest u bydła, kóz, świń, psów i naczelnych. Choroba powoduje znaczne straty ekonomiczne wśród hodowców, w szczególności bydła mlecznego (Rossi i in. 2017). Ze względu na ograniczone możliwości diagnostyczne i brak skutecznego leczenia, choroba jest trudna do monitorowania i kontrolowania. W ostatnich latach coraz więcej mówi się o zależności między chorobą Johnego u zwierząt, a chorobą Leśniowskiego-Crohna u ludzi (Feller i in. 2007). Niecałkowicie poznany mechanizm powoduje, że choroba stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia publicznego, co potwierdza, notowany w szczególności w krajach rozwiniętych wzrost częstotliwości zachorowań. (Mishina i in. 1996). Dodatkowo, według niektórych badaczy bakterie omawianego gatunku mogą przyczyniać się do rozwoju cukrzycy typu I u ludzi (Dow 2006). Ostatnio pojawia się coraz więcej doniesień jeszcze bardziej zwracających uwagę na MAP, ponieważ okazuje się, że ich oporność cieplna jest wyższa niż do tej pory sądzono. Bakterie te okazują się być bardziej odporne niż *Coxiella burnetti* czy *Mycobacterium bovis*, które mogą być skutecznie eliminowane przy pomocy standardowej pasteryzacji krótkotrwałej wysoką temperaturą. (HTST - z ang. High Temperature Short Time, Grant i in. 1996).

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* to małe, kwasooporne, gram-dodatnie, względnie-tlenowe, wewnątrzkomórkowe bakterie, które należą do rodziny *Mycobacteriaceae* i rodzaju *Mycobacterium*. MAP przynależą do *Mycobacterium avium* complex (MAC), który to

należy do grupy prątków niegruźliczych wywołujących mykobakteriozy. Podobnie jak u innych prątków ich ściana komórkowa zbudowana jest w większości z lipidów, co zapewnia im oporność m.in. na wysuszenie czy niską temperaturę. Te cechy pozwalają MAP na stosunkowo długie przeżycie w środowisku - przykładowo w glebie prątka te mogą przeżyć nawet 11 miesięcy (Grewal i in. 2006). Cechami charakterystycznymi pozwalającymi odróżnić MAP od innych prątków jest brak zdolności do produkcji mykobaktyny, a także posiadanie sekwencji insercyjnej IS900, która pojawia się w 14-18 kopiach w genomie MAP (Collins i in. 1989). Na detekcji tego fragmentu opiera się diagnostyka za pomocą PCR (z ang. *polymerase chain reaction*). Na podstawie analizy molekularnej *M. a. paratuberculosis* dzieli się na 3 główne grupy: typ owczy (typ S z ang. sheep lub typ I), typ bydłocy (typ C z ang. cattle lub typ II) oraz typ pośredni (typ I z ang. intermediate lub typ III, Pavlik 1999). Wśród zwierząt wolno żyjących najczęściej izolowany był typ II, czyli bydłocy (Carta 2012).

2. Opis zagadnienia

U zwierząt wolno żyjących, podobnie jak u gospodarskich, najczęstszą drogą transmisji choroby jest droga fekalno-oralna. Jednak opisane są również inne możliwe drogi przenoszenia choroby - śródmaciczna, a także transmisja przez mleko i siarę (Lambeth i in. 2004). Warto zaznaczyć, iż wydalanie prątków MAP przez gatunki zwierząt dzikich jest niższe niż wydalanie ich przez bydło z objawami klinicznymi (Daniels i in. 2003). Oznacza to, że zwierzęta wolno żyjące nie miałyby istotnego wpływu na szerzenie się choroby w stadach, w których choroba już występuje. Mogłoby natomiast wprowadzić patogen do stad wolnych od paratuberkulozy. Do zakażenia dochodzi zwykle u osobników w młodym wieku, ale rozwój choroby powoli. Dorosłe osobniki są mniej wrażliwe na zakażenie. Po spożyciu skażonego pokarmu lub wody, prątka dostają się do kępek Peyera zlokalizowanych w dolnym odcinku jelita cienkiego. Wewnątrzkomórkowe patogeny dostają się do makrofagów i komórek tkanki limfatycznej, gdzie namnażają się i ostatecznie wywołują chroniczne ziarniniakowe zapalenie jelit, które zaburza procesy wchłaniania i przyswajania składników pokarmowych, prowadząc do kacheksji typowej dla zaawansowanych infekcji. Proces ten może trwać miesiące lub lata i zwykle towarzyszy mu spadek odporności komórkowej, wzrost poziomu przeciwciał w surowicy i bakteriemia z rozprzestrzenianiem się zakażenia poza przewód pokarmowy. Wydalanie z kałem rozpoczyna się, zanim pojawią się objawy kliniczne, a zwierzęta z podkliniczną paratuberkulozą są także istotnymi wektorami w rozprzestrzenianiu się MAP.

Choroba Johnego stanowi istotny problem ekonomiczny wśród hodowców bydła mlecznego, a częstotliwość jej występowania rośnie. MAP powoduje chroniczne zapalenie żołądka i jelit u krów, nie dając przy tym specyficznych objawów. Zwierzęta, przy zachowanym apetycie, są wychudzone oraz występuje u nich biegunka (nie stwierdza się jej u małych przeżuwaczy). Z powodu braku wystarczająco skutecznych, tanich metod leczenia tej choroby u domowych przeżuwaczy, opracowano szczepionkę dla bydła (Juste 2011). Jednakże u zwierząt szczepionych, wyniki w testach do diagnostyki gruźlicy były fałszywie dodatnie, co spowodowało, że wprowadzenie w życie tego pomysłu okazało się niemożliwe.

Z powodu trudności w diagnostyce i prewencji paratuberkulozy należałoby wziąć pod rozwagę możliwość zakażenia się zwierząt gospodarskich od zwierząt wolno żyjących, których rola w transmisji wielu chorób zakaźnych jest wciąż nie do końca poznana. Brak kontroli nad chorobą Johnego wśród zwierząt wolno żyjących może przyczyniać się do spotęgowania trudności w walce z chorobą i jej eliminacji ze środowiska. Możliwości międzygatunkowej transmisji zostały udowodnione poprzez eksperymentalne zakażenie królików szczepem bydłocym *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. (Morkesh i Bulter 1990). Wypasanie przeżuwaczy, na pastwiskach zanieczyszczonych odchodami zakażonych zwierząt, jest najczęstszą drogą transmisji choroby zarówno wewnątrzgatunkowej jak i międzygatunkowej.

Bydło, owce i kozy są często wypasane na pastwiskach, znajdujących się w pobliżu lasów, z których często korzystają również zwierzęta wolno żyjące. W szczególności dzieje się tak na terenach znajdujących się w pobliżu lasów. Współdzieleniu takich pastwisk może towarzyszyć przyjmowanie pokarmu zanieczyszczonego odchodami innych gatunków zwierząt, co umożliwia transmisję *M. a. paratuberculosis* pomiędzy zwierzętami dzikimi, a gospodarskimi. Udowodniono, że bydło w czasie przyjmowania pokarmu nie unika fragmentów pastwisk zanieczyszczonych

odchodami królików (Danieles i in. 2001). Z powodu wysokiej oporności komórek bakterii na czynniki środowiskowe może on pozostawać w glebie nawet około roku. Nie należy zapominać, że zwierzęta zakażone subklinicznie mogą przez całe życie wydalac patogen z kałem, przyczyniając się do rozprzestrzenienia prątków w środowisku.

3. Przegląd literatury

Paratuberkuloza została opisana u 178 gatunków zwierząt wolno żyjących, głównie przeżuwaczy, ale także zającowatych czy mięsożernych. Została ona stwierdzana u osobników faktycznie wolno żyjących jak i tych trzymanyh w zagrodach zamkniętych np. ogrodach zoologicznych. (Carta i in. 2012). Sugeruje się, że pojedyncze przypadki choroby nie mają większego znaczenia dla poszczególnych populacji zwierząt wolno żyjących i sytuacji epizootycznej dotyczącej paratuberkulozy u zwierząt gospodarskich. Zwierzęta, które mogą mieć wpływ na szerzenie się choroby to przede wszystkim osobniki tych gatunków, które mogą pełnić rolę rezerwuaru patogenu. Rezerwuar jest to środowisko wraz z warunkami naturalnymi, na ograniczonym terenie, w którym krąży dany drobnoustrój wywołując określoną chorobę. Pomimo, iż paratuberkuloza została opisana u bardzo wielu gatunków zwierząt wolno żyjących, to jako faktyczny rezerwuar uznaje się tylko pięć z nich, z czego cztery gatunki należą do podrzędu przeżuwaczy. Izolacja bakterii od osobników danego gatunku nie jest nigdy równoznaczna z określeniem go jako rezerwuaru choroby. Ocena kolonizacji tkanek i występowania ewentualnych objawów klinicznych stwarza dopiero możliwość określenia roli danego gatunku zwierzęcia wolno żyjącego w epidemiologii paratuberkulozy. Jako rezerwuar MAP u dzikich przeżuwaczy opisano Mulaka Białoogonowego (*Odocoileus virginianus*) w USA, jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus*), a także sarnę europejską (*Capreolus capreolus*) w Alpach i daniela zwyczajnego (*Dama dama*) w Hiszpanii (Carta i in., 2012). Dodatkowo za rezerwuar tego prątka w Szkocji są dzikie króliki (*Oryctolagus cuniculus*, Greig i in. 1999).

Pomimo iż paratuberkuloza jest kojarzona głównie z przeżuwaczami to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* zostało wyizolowane między innymi od łasicy pospolitej (*Musela nivalis*), borsuków (*Meles meles*), myszarki zaroślowej (*Apodemus sylvaticus*), szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*), zająca szaraka (*Lepus europaeus*), kawki zwyczajnej (*Coloelus monedula*) czy gawrona (*Corvus frugilegus*, Beard i in. 2001).

U zwierząt wolno żyjących kliniczna paratuberkuloza stwierdzana była bardzo rzadko. Jednak objawy kliniczne mogą pojawiać się znacznie wcześniej niż ma to miejsce u bydła, bo nawet w wieku kilku miesięcy (Mackintosh i in. 2008). Objawy u dzikich przeżuwaczy są podobne jak u bydła, przykładowo u Mulaka Białoogonowego (*Odocoileus virginianus*) stwierdzono biegunkę i wychudzenie (Quist i in. 2002). U zwierząt z innych podrzędów ssaków nie notuje się klasycznych objawów paratuberkulozy (Daniels i in. 2003).

Diagnostyka paratuberkulozy dostarcza wielu problemów zarówno u zwierząt gospodarskich jak i wolno żyjących. Jest to choroba trudna do zdiagnozowania na podstawie objawów klinicznych. Połączenie kilku metod diagnostyki laboratoryjnej pozwala na zwiększenie czułości w wykrywaniu tej choroby. W przypadku diagnostyki *post mortem* zmiany anatomopatologiczne są dość specyficzne, aczkolwiek często ich nasilenie nie jest skorelowane z objawami klinicznymi. W czasie sekcji zwłok można zaobserwować wyraźne zgrubienie i pofałdowanie jelit oraz powiększone węzły chłonne tej okolicy. Histopatologicznie stwierdza się rozlane ziarniniakowe zapalenie jelit charakteryzujące się postępującą akumulacją nabłonkowych makrofagów i komórek olbrzymich w błonie śluzowej i podśluzowej jelit.

Obecnie najbardziej czułą metodą diagnostyki laboratoryjnej przyżyciowej jest wykonanie posiewu bakteryjnego z kału. W przypadku badań *post mortem* posiew wykonuje się z wycinków jelit lub węzłów chłonnych. Ważne jest zoptymalizowanie protokołu hodowli w celu wykrycia wszystkich zainfekowanych zwierząt, niezależnie od rodzaju szczepu zakażającego zwierzę. Wymagania dotyczące podłoża dla poszczególnych szczepów MAP różnią się. Typy I/III rosną lepiej na podłożu LJm (z ang. Löwenstein-Jensen with mycobactin), natomiast szczepy typu II wykazują lepszy wzrost na podłożu HEYMm-SP (z ang. Herrold's egg yolk medium with sodium pyruvate and mycobactin, de Juan i in. 2006). Z tego powodu, jeśli nie ma możliwości wykonania posiewu na obu rodzajach podłoża, u zwierząt wolno żyjących uzasadnionym jest użycie do hodowli podłoża HEYMm-SP.

Pomimo iż izolacja jest uważana za złoty standard w diagnostyce tej choroby, to czas oczekiwania na wynik takiego badania jest długi- nawet 8 tygodni, gdyż prątki charakteryzują się powolnym wzrostem. Szybszą, ale mniej czułą metodą jest wykonanie badania PCR z kału.

Do diagnostyki przyżyciowej dostępne są także testy serologiczne - immunodyfuzja w żelu agarowym, odczyn wiązania dopełniacza oraz test immunoenzymatyczny ELISA wykrywający specyficzne przeciwciała w surowicy krwi. Jednak pobranie krwi od zwierząt wolno żyjących wymaga ich immobilizacji, więc ta metoda możliwa jest głównie u zwierząt w ogrodach zoologicznych. U zwierząt gospodarskich można zastosować także test śródskórny z joniną.

Paratuberkuloza znajduje się w załączniku 3. "Ustawy z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt", co oznacza, że podlega ona obowiązkowi rejestracji. Z kolei inna choroba powodowana również przez prątki - gruźlica, znajduje się w załączniku 2. tej ustawy i podlega obowiązkowi zwalczania. W diagnostyce gruźlicy (zarówno w testach alergicznych jak i testach serologicznych) zwierzęta zakażone MAP mogą dawać wyniki fałszywie dodatnie. Większość badań przyżyciowych gruźlicy opartych jest na wykrywaniu odpowiedzi immunologicznej zakażonych zwierząt na niektóre antygeny, które są częściowo tożsame z *M. avium* i *Mycobacterium tuberculosis* complex (Aagaard i in. 2003), co może tłumaczyć wyniki fałszywie dodatnie. Przykładowo stwierdzono, że zakażone MAP u fermowych jeleni może wpływać na wynik testu tuberkulinowego. (Fernández-de-Mera i in. 2009). Jest to istotne gdyż gruźlica jest chorobą powodującą istotne straty ekonomiczne, a także groźną zoonozą, więc prowadzony jest jej stały monitoring.

Fałszywie dodatnie wyniki badań w kierunku gruźlicy mogą prowadzić do niepotrzebnych eliminacji zwierząt. Taka sytuacja może mieć szczególne znaczenie dla gatunków chronionych np. żubr (*Bison bonasus*), u których można by podjąć próbę leczenia paratuberkulozy, pomimo wiążących się z terapią trudności. W przypadku stwierdzenia gruźlicy zwierzęta są poddawane eliminacji, dlatego postawienie trafnej diagnozy ma w tym przypadku kluczowe znaczenie. Badanie na paratuberkulozę nie wykluczy wyników fałszywie dodatnich w kierunku gruźlicy, ale w przypadku wyników dodatnich w kierunku obu chorób można wziąć pod uwagę bardziej rozszerzony kompleks badań w kierunku gruźlicy.

4. Podsumowanie

Epidemiologia MAP jest nie do końca zrozumiała, w szczególności w odniesieniu do roli zwierząt wolno żyjących jako rezerwuaru tych bakterii oraz ich potencjalnej roli w chorobie Leśniowskiego-Crohna. Wiele istotnych problemów związanych z chorobą jest wciąż nie rozwiązanych i wymagają one dalszych badań. Dane na temat paratuberkulozy u zwierząt wolno żyjących są niepełne, ale można zauważyć, że MAP występuje niemal na całym świecie wśród bardzo wielu gatunków dzikich kręgowców, włączając w to zarówno ssaki przeżuujące jak i te z innych podgromad. Nie potwierdzono istotnego wpływu choroby Johnego na dynamikę populacji zwierząt wolno żyjących, szczególnie iż kliniczna paratuberkuloza jest stwierdzana sporadycznie. Jednak na niektórych terenach trzeba brać pod uwagę pewne gatunki jako możliwy rezerwuar MAP. W takim przypadku możliwa jest transmisja międzygatunkowa i kontrolowanie choroby wśród zwierząt gospodarskich może sprawić trudności. Na obszarach, na których wśród zwierząt wolno żyjących zostały stwierdzone rezerwuary paratuberkulozy należałoby podjąć działania, które ograniczyłyby możliwości kontaktu zwierząt gospodarskich z dzikimi, na przykład poprzez grodzenie wysokimi siatkami pastwisk.

Podstawowym problemem w kontekście zwierząt wolno żyjących, u których występuje paratuberkuloza jest możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich w kierunku gruźlicy. O ile badania monitoringowe w kierunku paratuberkulozy u zwierząt wolno żyjących nie są kluczowe (poza nielicznymi lokalnymi wyjątkami), to zasadne byłoby wykonywanie posiewów w kierunku MAP u zwierząt wolno żyjących, które badane są w kierunku gruźlicy.

5. Literatura

Aagaard C, Govaerts M, Meng Okkels L (2003) Genomic approach to identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 41(8):3719-28.

- Beard PM, Rhind SM, Buxton D i in. (2001) Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(4):1517-21.
- Boadella M, Lyashchenko K, Greenwald R i in (2011) Serological tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Eurasian wild boar. *Journal of Veterinary, Diagnostic Investigation* 23:77–83.
- Carta T, Álvarez J, Pérez de la Lastra JM i in. (2013) Wildlife and paratuberculosis: a review. *Research in Veterinary Science*. 94(2): 191-197.
- Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW (1989) Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 51: 175–178.
- Daniels MJ, Hutchings MR, Beard PM i in. (2003) Do non-ruminant wildlife pose a risk of paratuberculosis to domestic livestock and vice versa in Scotland? *Epidemiology and Infection* 130(3):553-559.
- de Juan L, Alvarez J, Romero B i in. (2006) Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9):5927-32.
- Dow CT (2006) Paratuberculosis and Type I diabetes: is this the trigger? *Medical Hypotheses* 67(4):782-785.
- Feller M, Huwiler K, Stephan R i in. (2010) *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 7: 607-613
- Grant IR, Ball HJ, Neill SD i in. (1996) Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cow's milk at pasteurization temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 631-636.
- Greig A, Stevenson K, Henderson D i in. (1999) Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1746–1751.
- Grewal SK, Rajeev S, Sreevatsan S i in. (2006) Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure. *Applied Environmental Microbiology* 72(1): 565-574.
- Juste RA (2012) Current strategies for eradication of paratuberculosis and issues in public health. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 148(1-2):16-22.
- Lambeth C, Reddacliff L, Windsor P i in. (2004) Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep. *Australian Veterinary Journal* 82(8): 504-508.
- Mackintosh CG, Labes RE, Thompson BR (2008) Efficacy, immune responses and side-effects of vaccines against Johne's disease in young red deer (*Cervus elaphus*) experimentally challenged with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *The New Zealand Veterinary Journal* 2. 56(1):1-9.
- Mishina D, Katsel P, Brown ST i in. (1996) On the etiology of Crohn disease. *Proceedings of the National Academy Science* 93(18): 9816-9820.
- Mokresh AH, Butler DG (1990) Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Canadian Journal of Veterinary Science* 54(3):313-319.
- Pavlik I, Horvathova A, Dvorska L, i in. (1999) Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*, 38: 155–167.
- Quist CF, Nettles VF, Manning EJ (2002) Paratuberculosis in key deer (*Odocoileus virginianus clavium*). *Journal of Wildlife Disease* 38(4):729-37.
- Rossi G, Grohn YT, Schukken YH i in. (2017) The effect of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 100: 7446-7754.

9. Rola *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* w etiologii choroby Leśniowskiego-Crohna

The role of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in the etiology of Crohn's disease

Didkowska Anna⁽¹⁾, Orłowska Blanka⁽¹⁾, Żygowska Marta⁽²⁾, Wadowska Iza⁽³⁾

⁽¹⁾ Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

⁽²⁾ Studentka VI roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

⁽³⁾ Katedra Nauk Morfologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Opiekun naukowy: dr hab. Krzysztof Anusz, prof. SGGW

Didkowska Anna: anna.didkowska@wp.pl

Słowa kluczowe: MAP, IBD, choroba Leśniowskiego-Crohna, paratuberkuloza, choroba Johnego

Streszczenie

Choroba Leśniowskiego-Crohna (L-C) to choroba zaliczana do nieswoistych zapaleń jelit (ang. Inflammatory Bowel Disease - IBD), której dokładna etiologia nie została jak dotąd poznana. Charakteryzuje się ona przewlekłym zapaleniem ściany przewodu pokarmowego, dotyczy najczęściej końcowego odcinka jelita cienkiego oraz początkowego odcinka jelita grubego. Częstotliwość jej występowania w krajach rozwiniętych wciąż rośnie. Choroba L-C wykazuje wiele podobieństw do choroby Johnego stwierdzanej głównie u przeżuwaczy. Z tego powodu zakażenie czynnikiem etiologicznym paratuberkulozy - *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) jest brane pod uwagę jako jedno z możliwych uwarunkowań zwiększających prawdopodobieństwo zachorowania na chorobę L-C. MAP to bakteria wewnątrzkomórkowa należąca do prątków niegruźliczych (ang. Mycobacteria other than tuberculosis - MOTT), która występuje bardzo powszechnie w środowisku. Dodatkowo jest ona oporna na pasteryzację, więc ludzie podlegają narażeniu na częsty kontakt z tymi prątkami, także poprzez żywność. MAP był częściej izolowany od pacjentów z potwierdzoną chorobą L-C niż od osób zdrowych. Jednak taki związek nie wyczerpuje zagadnienia etiopatogeny i nie jest wystarczający do potwierdzenia MAP jako czynnika etiologicznego. Artykuł ma na celu zestawienie najnowszych danych na temat powiązań pomiędzy paratuberkulozą, a chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz zwrócenie uwagi na potrzebę prowadzenia dalszych badań, w celu uzyskania dowodów pozwalających na potwierdzenie bądź odrzucenie hipotezy o MAP jako czynnika etiologicznym.

1. Wstęp

Choroba Leśniowskiego-Crohna została opisana na początku XX wieku. Pierwszy opis został stworzony przez polskiego lekarza Antoniego Leśniowskiego w 1904 roku. W 1932 roku bardziej szczegółowe dane na temat choroby opracował wraz ze swoim zespołem Burrill Bernard Crohn. Czynnikiem etiologicznym choroby jest *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), czyli bakteria należąca do grupy prątków niegruźliczych (ang. Mycobacteria other than tuberculosis - MOTT). Podobnie jak w przypadku innych prątków, jej komórka posiada grubą, hydrofobową ścianę komórkową, która wykazuje oporność na odbarwianie kwaśnym alkoholem. Te cechy sprawiają, że bakteria może bardzo długo, nawet kilka lat, przetrwać w środowisku. Genom MAP zawiera specyficzną gatunkowo sekwencję insercyjną IS900, która używana jest do odróżnienia MAP od innych prątków za pomocą testu PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) lub hybrydyzacji *in situ* (Green i in. 1989).

MAP jest bakterią szeroko rozpowszechnioną wśród bydła mlecznego oraz czynnikiem etiologicznym choroby Johnego u zwierząt. Do zakażenia MAP dochodzi u zwierząt zwykle w młodym wieku. Mogą one wydalac prątki okresowo przez całe życie, nie wykazując przy tym

objawów klinicznych. U zwierząt, u których rozwija się kliniczna forma choroby brak jest specyficznych objawów, więc choroba nie jest łatwa do rozpoznania. Stwierdza się przewlekłą, wyniszczającą biegunkę, w wyniku której następuje znaczny spadek masy ciała. Apetyt jest zwykle zachowany. Utrudnieniem w diagnostyce choroby w stadzie jest fakt, że MAP podobnie jak inne prątki nie wywołuje epizoozji, przy której wszystkie zakażone zwierzęta wykazują objawy kliniczne. Choroba Johnego jest także stwierdzana u zwierząt wolno żyjących, a niektóre gatunki z nich mogą pełnić rolę rezerwuaru MAP. U zwierząt najczęstszą drogą transmisji choroby jest droga fekalno-oralna, a także śródmaciczna oraz poprzez mleko i siarę. Po spożyciu przez zwierzę zakażonego prątkami pokarmu lub wody, patogeny dostają się do kępek Peyera. Są to skupiska tkanki limfatycznej zlokalizowanych w błonie śluzowej i podśluzowej jelita cienkiego, wchodzące w skład GALT (ang. gut-associated lymphoid tissue). Wewnątrzkomórkowe patogeny namnażają się następnie w makrofagach i komórkach tkanki limfatycznej prowadząc do powstania chronicznego ziarniniakowego zapalenia jelit.

Ludzie są w dużym stopniu narażeni na kontakt z MAP ze względu na zdolność prątków do długiego przeżycia w środowisku. Części płynne z obornika wywożonego na pola przedostają się do wód gruntowych przez co ludzie mogą zakażać się MAP poprzez zanieczyszczoną wodę. Dodatkowo bakteria jest oporna na standardową pasteryzację, co stwarza ryzyko spożycia jej wraz z żywnością, szczególnie z produktami mlecznymi. Bakterie mogą być wydalane z mlekiem, ale duże znaczenie ma w tym przypadku także higiena doju. MAP są wydalane przez przeżuwacze głównie z kałem, więc brak zachowania zasad higieny przez pracowników ferm podczas doju może skutkować przedostaniem się patogenu do mleka i skażeniem wytwarzanych z niego produktów mlecznych.

Pomiędzy chorobą Johnego u zwierząt, której czynnikiem etiologicznym jest MAP, a chorobą Leśniowskiego-Crohna wykazano wiele podobieństw, dotyczących zarówno patogenezы (osłabienie tzw. połączeń ścisłych pomiędzy komórkami nabłonka w błonie śluzowej jelita prowadzące do osłabienia bariery jelitowej), objawów klinicznych jak i zmian anatomopatologicznych. Etiopatogeneza choroby L-C nie została do tej pory dokładnie wyjaśniona, a ze względu na liczne korelacje niektórzy badacze zaczęli zwracać uwagę na możliwość roli MAP w etiologii choroby L-C. Pierwsze podejrzenia dotyczące wspólnej etiologii tych dwóch chorób pojawiły się już na początku XX wieku. Wyizolowanie MAP od pacjentów z IBD udało się jednak dopiero w latach 80. XX wieku (Feller i in. 2010), lecz wciąż brak jest jednak wystarczających danych do poznania pełnej etiologii choroby L-C. Objawy kliniczne, głównie z przewodu pokarmowego, pojawiają się jedynie u części zakażonych osób, co utrudnia wyjaśnienie znaczenia roli MAP w chorobie L-C. Uzyskanie pełniejszego obrazu etiopatogenezy pozwoliłoby na rozwój metod diagnostyki (opracowanie badań przesiewowych), podjęcie środków prewencyjnych (opracowanie nowych metod przetwarzania żywności) i być może umożliwiłoby opracowanie schematu leczenia tej choroby.

2. Opis zagadnienia

Biorąc pod uwagę znaczne podobieństwa pomiędzy chorobą Johnego, a chorobą L-C od dawna przypuszczano, że MAP może być czynnikiem etiologicznym choroby Leśniowskiego-Crohna. Obecnie MAP jest wykrywany u 50-100% pacjentów z chorobą L-C (Naser i in. 2004, Mendoza i in. 2010). Diagnostyka opiera się na wykryciu DNA MAP za pomocą PCR (specyficzna sekwencja insercyjna IS900) lub izolacji żywych MAP z próbki krwi obwodowej. Istotnym jest, iż MAP był także izolowany u osób, u których nie występuje choroba L-C. Fakt, że MAP można znaleźć u osób bez objawów klinicznych choroby Leśniowskiego-Crohna (Abubakar i in., 2008), nie wyklucza jednak roli MAP w etiologii tej choroby. Dla porównania większość bydła narażonego na działanie MAP staje się podklinicznie zakażona, a tylko u około 10% rozwija się później choroba Johnego. Jest to typowy przebieg przewlekłych chorób bakteryjnych, w których uwarunkowania genetyczne, stres środowiskowy i status immunologiczny osobnika mają wpływ na rozwój postaci klinicznej choroby. Podobne przykłady można znaleźć w medycynie ludzkiej. Do rodziny *Mycobacteriaceae* należy prątek gruźlicy, który również powoduje objawy kliniczne tylko u części zakażonych osób. Obecnie uznaje się, że zakażonych *Mycobacterium tuberculosis* jest około 1/3 populacji, a kliniczna gruźlica rozwija się tylko u 5-10% zakażonych ludzi. (Stewart i in. 2003),

głównie dzieci, osób starszych, niedożywionych, bezdomnych czy u osób z dysfunkcjami układu immunologicznego.

Choroba L-C kiedyś zaliczana była do chorób autoimmunologicznych. Obecnie uważa się, że jest ona wynikiem interakcji pomiędzy współistniejącymi czynnikami środowiskowymi, genetycznymi oraz długotrwałym narażeniem na antygeny w środowisku i żywności (Baumgart i in. 2012). Nie jest jasne czy pozostające w środowisku antygeny wywołują patologiczną reakcję na prawidłową mikroflorę czy jest to reakcja na patogeny. Objawy kliniczne choroby L-C to przede wszystkim ból brzucha, biegunka, zaparcia, krwawienia z przewodu pokarmowego oraz liczne objawy ogólnoustrojowe. Ich nasilenie jest zależne od lokalizacji, wielkości oraz stopnia zaawansowania zmian w przewodzie pokarmowym. Wśród objawów klinicznych wspólnych dla choroby Johnego i choroby L-C można wymienić także znaczną utratę masy ciała oraz okresowo nawracająca biegunkę. Zmiany anatomopatologiczne (zgrubienie ściany jelit, owrzodzenie błony śluzowej, powiększenie okolicznych węzłów chłonnych) w przypadku obu chorób lokalizują się przede wszystkim w końcowym odcinku jelita cienkiego i początkowym odcinku jelita grubego. W obrazie histopatologicznym choroba L-C charakteryzuje się występowaniem ziarniniaków z komórek olbrzymich i nabłonkowatych. Podobnie w chorobie Johnego notowane jest zapalenie o charakterze ziarniniakowym. Dodatkową korelacją pomiędzy obiema chorobami może być wzrost częstości ich występowania w ostatnich latach (Molodecky i in. 2012; Hermon-Taylor i in. 2009).

3. Przegląd literatury

Zakażenie MAP u ludzi zaczyna się poprzez spożycie zanieczyszczonej wody lub żywności. Pomimo, iż opublikowano liczne doniesienia o ponadprzeciętnie wysokiej liczbie przypadków choroby L-C na obszarach rolniczych, osoby pracujące w gospodarstwach rolniczych nie są bardziej narażone na zakażenie (McNees, i in., 2015).

MAP zostało wyizolowane nie tylko od pacjentów z chorobą L-C (Kirkwood i in., 2009), ale także od osób chorych na AIDS (Richter i in., 2002). Brak jest dokładnych informacji na temat mechanizmów odpowiedzi immunologicznej człowieka na te prątki, natomiast u pacjentów wykrywane były specyficzne przeciwciała przeciwko MAP. Dodatkowo przeciwciała przeciwko MAP zostały wykryte u pacjentów z cukrzycą typu 1 oraz stwardnieniem rozsianym (łac. *Sclerosis multiplex*, Cossu i in., 2011; Cossu i in. 2013). Te doniesienia literaturowe pokazują, że ludzie są narażeni na zakażenie MAP i bakteria ta może wywoływać u nich odpowiedź immunologiczną.

W przypadku choroby L-C badania i przeprowadzone metaanalizy pokazują większą częstotliwość detekcji przeciwciał anty-MAP u pacjentów z chorobą L-C niż u grupy kontrolnej (Abubakar i in., 2008). Należy podkreślić, że wiele kontrowersji związanych z rolą MAP w chorobie L-C wynika z niedopracowanych metod, aby możliwe było dokładne wrywanie i izolowanie MAP u ludzi (Naser i in., 2014). Zaobserwowane rozbieżności wynikają z faktu że metody, które zostały zaprojektowane do wykrywania MAP u zwierząt potencjalnie chorych na paratuberkulozę nie są do końca skuteczne przy wykrywaniu tego patogenu u ludzi. W związku z tym istnieje potrzeba opracowania bardziej zoptymalizowanych metodologii, aby możliwe było dokładne wykrywać i izolować MAP u pacjentów z chorobą L-C. Trudność w wykryciu MAP może być również związana z innymi ograniczeniami niż metody i schematy diagnostyczne. Znaczenie ma tutaj etap choroby, a także wcześniejsze leczenie antybiotykami. Wykrycie DNA MAP nie musi być równoznaczne z obecnością żywych bakterii. Mogą być to pozostałości po ekspozycji środowiskowej na MAP, na którą organizm zareagował skuteczną odpowiedzią immunologiczną. W związku z tym, zaleca się, aby wykrycie DNA MAP było uzupełnione hodowlą komórkową. Izolacja w przypadku prątków jest uważana za złoty standard i daje możliwości podjęcia dalszych, dokładniejszych analiz molekularnych. Problemem może okazać się długotrwały wzrost tych bakterii, a więc i długie oczekiwanie na wynik badania. Przyszłe badania nad występowaniem MAP u pacjentów z chorobą L-C powinny uwzględnić wszystkie te czynniki, wpływające na przebieg i wynik diagnostyki oraz możliwe metody detekcji, tak aby skutecznie weryfikować i potwierdzać wyniki. W celu dalszego wyjaśnienia roli MAP w chorobie L-C korzystnym byłaby jednoczesna ocena różnych próbek biologicznych (krew, biopsje i kał). Być może pozwoliłoby to odpowiedzieć na pytanie czy wykrywanie DNA MAP w kale lub

w biopsji może być związane z jej obecnością we krwi, co przyczyniłoby się do odpowiedzi na pytanie czy tego badania można by użyć jako markeru aktywnej infekcji.

Nie należy zapominać, że brak wykrycia MAP u pacjentów z objawami klinicznymi nie musi być wynikiem fałszywie ujemnym. Choroba L-C to syndrom o złożonej etiologii i u niektórych pacjentów MAP może nie odgrywać żadnej roli w pojawieniu się choroby.

Choroba L-C może występować jako pojedyncze przypadki, ale zdarza się, że występuje na danym terenie u większej ilości osób w podobnym czasie (McNees, i in., 2015). Takie "epidemie" choroby Leśniowskiego-Crohna u osób niespokrewnionych dowodzą, że dziedziczna skłonność do choroby nie jest bezwzględnie konieczna do jej rozwoju. To potwierdzałoby teorię o obecności czynnika etiologicznego w środowisku. Częste zachorowania na chorobę L-C obserwowano również w grupach osób spokrewnionych, ale czas wystąpienia choroby sugeruje ekspozycję na czynniki zakaźne (McNees, i in., 2015).

Jeden z dowodów potwierdzających rolę MAP w etiologii choroby L-C mogłaby stanowić reakcja na leki stosowane w leczeniu mykobakterioz. Leczenie pacjentów tradycyjnymi lekami przeciwgruźliczymi (izoniazyd, etambutol, rifampicyna) było oceniane podczas trwających pięć lat badań. Pacjenci byli poddawani dwuletniej terapii, a następnie trzyletniej obserwacji, która nie wykazała stałej poprawy (Thomas i in. 1998). Istnieją jednakże dane, które potwierdzają remisję choroby L-C po zastosowaniu leczenia specyficznego dla MAP. Przeprowadzona metaanaliza badań na temat skuteczności terapii wykazała korzyści z leczenia nitroimidazolami i makrolidami (klofazymina) w grupie kontrolnej w porównaniu z grupą otrzymującą placebo (Feller i in. 2010). Choroba Johnego u zwierząt gospodarskich zazwyczaj nie jest poddawana leczeniu, w związku z czym zwierzęta są kierowane na ubój.

W badaniach nad rolą MAP w etiologii choroby Leśniowskiego-Crohna należałoby wziąć pod uwagę powszechne występowanie bakterii w żywności i wodzie, co może prowadzić do powtarzającej się ekspozycji na patogen. Natomiast przy ocenie efektów leczenia należałoby wziąć pod uwagę możliwość ponownej, niezależnej infekcji.

4. Podsumowanie

Ludzie są w dużym stopniu narażeni na kontakt z powszechnie występującymi w środowisku MAP, co zostało udowodnione. Brak jest jednak wystarczających dowodów na to, że MAP jest czynnikiem etiologicznym choroby L-C, ponieważ bakterię tę izoluje się również od zdrowych osób z grupy kontrolnej czy od pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. W związku z tym, uznaje się, że samo zarażenie MAP nie jest wystarczające do wywołania choroby L-C, a obecność MAP u zdrowych osób może wskazywać na szerokie rozpowszechnienie MAP w łańcuchu żywnościowym. Choroba ta ma zróżnicowany przebieg oraz bardzo różna jest odpowiedź pacjentów na jej leczenie. To powoduje, że bywa określana mianem "syndromu", również dlatego że nie ma ona jednego czynnika etiologicznego i wynika raczej z jednoczesnego działania wielu czynników zarówno przyczynowych jak i wyzwalających. MAP można zatem uznać za czynnik ryzyka rozwoju choroby L-C, porównywalny z innymi czynnikami ryzyka, takimi jak genetyczne polimorfizmy (różnice w DNA populacji) lub specyficzne czynniki środowiskowe (Rosenfeld i Bressler, 2010).

W przyszłości należałoby opracować metody zapobiegania ekspozycji ludzi na MAP, szczególnie dotyczące żywności. Istnieją jednak obawy, iż zastosowanie bardziej rygorystycznych obróbek cieplnych spowoduje zmianę cech organoleptycznych mleka. Obecnie opracowano jednak inne alternatywne, nowoczesne metody eliminacji patogenów z żywności. Przykładowo, promieniowanie UV może być użyte do dezaktywacji prątków w systemach wody pitnej (Hayes i in. 2008).

Jako kluczowy, najważniejszy element kontroli rozprzestrzeniania się MAP wymienia się wprowadzenie skutecznego programu monitoringu choroby Johnego u bydła mlecznego. Pozwoliłoby to nie tylko na ograniczenie kontaktu z potencjalnym czynnikiem zoonotycznym, ale przede wszystkim na ograniczenie znacznych strat ekonomicznych jakie przynosi hodowcom paratuberkuloza. Opracowanie biomarkerów w celu identyfikacji bydła subklinicznie zakażonego MAP, oddzielnie lub w połączeniu ze stosowaniem szczepionki, może zapobiec dalszemu występowaniu skażonych produktów spożywczych w łańcuchach żywnościowych ludzi i zwierząt

(De Buck J i in. 2014), a tym samym ograniczać straty i niebezpieczeństwo wynikające z narażenia na choroby wywoływane przez MAP.

5. Literatura

- Aagaard C, Govaerts M, Meng Okkels L (2003) Genomic approach to identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 41(8):3719-28.
- Abubakar I, Myhill D, Aliyu SH i in. (2008) Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. *Inflammatory Bowel Disease* 14, 401–410.
- McNees AL, Markesich D, Zayyani NR i in. (2015) *Mycobacterium paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease, *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 9(12): 1523–1534.
- Baumgart DC, Sandborn WJ (2012) Crohn's disease. *The Lancet* 380:1590–1605.
- Cossu A, Rosu V, Paccagnini D i in. (2011). MAP3738cand MptD are specific tags of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in type I diabetes mellitus. *Clinical Immunology* 141, 49–57.
- Cossu D, Masala S, Frau J i in. (2013) Anti *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis heat shock protein 70 antibodies in the sera of Sardinian patients with multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 335, 131–133.
- De Buck J, Shaykhtudinov R, Barkema HW (2014): Metabolomic profiling in cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *PLoS One*. 9: e111872.
- Feller M, Huwiler K, Schoepfer A i in. (2010) Long-term antibiotic treatment for Crohn's disease: systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clinical Infectious Diseases* 50:473–480.
- Green EP, Tizard ML, Moss MT i in. (1989) Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Research* 17(22):9063-9073.
- Hayes SL, Sivaganesan M, White KM i in. (2008) Assessing the effectiveness of low-pressure ultraviolet light for inactivating *Mycobacterium avium* complex (MAC) micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*. 47:386–392.
- Hermon-Taylor J. (2009) *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, Crohn's disease and the Doomsday scenario. *Gut Pathogens* 1:15.
- Kirkwood CD, Wagner J, Boniface K (2009) *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in children with early-onset Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Disease* 15(11):1643-1655.
- Mendoza JL, San-Pedro A, Culebras E, i in. (2010) High prevalence of viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology* 16:4558–4563.
- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM i in. (2012) Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*: 142:46–54.
- Naser SA, Ghobrial G, Romero C i in. (2004) Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet*. 364:1039–1044.
- Naser SA, Sagramsingh SR, Naser AS i in. (2014) *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World Journal of Gastroenterology* 20(23):7403-15.
- Richter E, Wessling J, Luger N i in. (2002) *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in a patient with HIV, *Emerging Infectious Diseases* 8: 729–731.
- Rosenfeld G., Bressler B. (2010) *Mycobacterium avium* paratuberculosis and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective. *Canadian Journal of Gastroenterology* 24L 619–624.
- Stewart GR, Robertson BD, Young DB (2003) Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature Reviews Microbiology* 1:97–105.
- Thomas GA, Swift GL, Green JT i in. (1998) Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study. *Gut* 42:497–500.

10. Charakterystyka, znaczenie i zastosowanie jonów miedzi w aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Characteristic, importance and application of copper ions in antimicrobial activity

Monika Drózd⁽¹⁾, Dominik Straszak⁽²⁾, Gabriela Widelska⁽³⁾, Aleksandra Dymek⁽⁴⁾, Jacek Skup⁽⁵⁾,
Monika Pitucha⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾ Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾ Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁵⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Zdrowia Publicznego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab.n.farm. Monika Pitucha

Monika Drózd: monika.drozd@umlub.pl

Słowa klucze: miedź, związki kompleksowe, aktywność biologiczna, aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Abstrakt

Miedź jest metalem, którego wszechstronność jest dobrodziejstwem wielu aspektów funkcjonowania naszego świata od zarania dziejów. Jest niezbędnym składnikiem diety wszystkich organizmów żywych a jej charakter działania pomaga m.in. ograniczyć rozwój patologicznych mikroorganizmów. W ostatnich latach coraz większym zainteresowaniem badaczy cieszy się chemia związków koordynacyjnych, która również wykorzystuje jony miedzi o różnej wartościowości do tworzenia nowych struktur o lepszej aktywności w porównaniu z samym ligandem. Jony miedzi zdają się wykazywać niewątpliwą potencjał, który może zaowocować nowym, skutecznym i bezpiecznym środkiem o charakterze przeciwdrobnoustrojowym, dlatego dualizm działania związków koordynacyjnych zbudowanych z jonów metalu i liganda o tożsamym charakterze aktywności jest coraz częściej obieranym kierunkiem poszukiwań. Potwierdzeniem tych hipotez są dotychczas opublikowane już wyniki badań naukowych.

1. Wstęp

Statystyki dotyczące liczby zgonów ludności na całym świecie, w wyniku przebytego zakażenia bakteriami opornymi na działanie dotychczas odkrytych antybiotyków i chemioterapeutyków, jest wprost zatrważająca. Zjawisko nabywania oporności przez bakterie oraz ich zdolności do mutacji, spędza sen z powiek naukowcom i zmusza ich ośrodki naukowe do poszukiwania coraz to nowych broni do walki o ludzkie życie, które jest przecież wartością nadrzędną. Oczywiście jest potrzeba poszukiwania nowych grup leków, lecz nie zapominajmy o możliwości udoskonalania znanych już środków leczniczych, o udokumentowanym działaniu farmakologicznym. Magia współpracy między różnymi dziedzinami nauk ścisłych, czerpanie natchnienia z obserwacji zachowania bakterii i wirusów na organizmach żywych pod wpływem różnych czynników i dostępność najwyższej klasy sprzętu do prowadzenia badań daje ogromne możliwości do stworzenia narzędzia do walki dla lekarzy o życie (Markiewicz i Kwiatkowski 2001). Miedź w stanie czystym jest to miękkie ciało stałe o bardzo charakterystycznej barwie czerwono-brązowej. Osobliwą właściwością dla niej jest bardzo dobre przewodnictwo cieplne i elektryczne. Wyjątkową łatwość w przyjmowaniu i oddawaniu elektronów pierwiastek ten zawdzięcza wysokiemu potencjałowi elektrochemicznemu. Miedź jest niezbędnym minerałem do prawidłowego funkcjonowania wszystkich organizmów żywych, jak również i roślin, dlatego też nazywana jest też pierwiastkiem mineralnym. Odpowiedni poziom w ustroju organizmów jest konieczny dla wzrostu i rozwoju kości, serca, tkanki łącznej oraz mózgu. Bierze również udział w powstawaniu krwinek

czerwonych, uwalnianiu i syntezie enzymów, absorpcji żelaza. Miedź wpływa na odbudowę uszkodzonych tkanek, pobudza układ odpornościowy organizmu, wspomaga gojenie się ran oraz neutralizuje i zmniejsza powstawanie wolnych rodników, które jak wykazano ostatnimi czasy wpływają bardzo negatywnie na funkcjonowanie ustroju poprzez prawdopodobieństwo powodowania poważnych uszkodzeń komórki (Bonnie, Marc et al. 2007). Miedź jest pierwiastkiem, który ma również niewyobrażalne znaczenie już w życiu płodowym młodego organizmu. Jak się okazało płód gromadzi miedź od swojej matki już w trzecim trymestrze, natomiast zdrowy noworodek bezpośrednio po narodzinach ma czterokrotnie wyższe stężenie tego pierwiastka w swoim organizmie w porównaniu z dorosłą osobą (Ralph i McArdle 2001). Niedobory miedzi w ciąży mogą być przyczyną niskiej masy urodzeniowej noworodka, jego problemów neurologicznych oraz słabych mięśni. W przypadku organizmu dojrzałego miedź gromadzona jest w wątrobie, natomiast jak się szacuje na niedobory tegoż pierwiastka cierpi około 20% populacji. Poważniejsze niedobory miedzi mogą przyczyniać się do rozwoju osteoporozy, reumatoidalnego zapalenia stawów, zapalenia stawów i kości a nawet do chorób układu krążenia oraz jaka jelita grubego (Yamada i Inaba 2004). Niewielkie niedobory miedzi są przyczyną obniżenia odporności organizmu na infekcje, powodują zmęczenie, osłabienie funkcji poznawczych mózgu oraz problemy z prokreacją. Zgodnie z aktualnymi wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dzienne zapotrzebowanie dorosłego organizmu na miedź wynosi 1,3mg, natomiast dla dzieci w wieku 1-4 lata wynosi 0,3-0,4mg (5). Miedź jako minerał można znaleźć w codziennie spożywanym pożywieniu, jednakże jego największe zawartości znajdziemy w owocach morza (głównie mięczaki), podrobach (wątróbka), pełnych ziarnach, orzechach, rodzynekach, roślinach strączkowych (soczewica i fasola), czekoladzie, czerwonym mięsie, jarmużu oraz w owocach (głównie orzechy kokosowe, jabłka oraz papaja) (6).

2. Zastosowanie praktyczne miedzi

Warto sięgnąć do historii tego pierwiastka, gdyż był on już znany w XVIII wieku, kiedy to odkryto, że ziarna nasączone siarczanem miedzi bardzo skutecznie hamowały rozwój grzybów na ziarnach, co stało się od wtedy bardzo popularnym zabiegiem zapobiegania śnieci kłosów pszenicy. Niedalej później w XIXw. Francuski naukowiec Millardet zaobserwował, że pędzlowanie krzaków winogron również siarczanem miedzi skutecznie zapobiegało rozwojowi grzybów na tej roślinie. Rozwinięto tę tezę i wykorzystywano miedź jako dezynfektant zapobiegający gniciu zapasów plonów oraz jako zapobiegacz gniciu kopyt u owiec i bydła. Analizując odkrycia i obserwacje zarówno uczonych, jak również i prostych ludzi postanowiono pogłębić temat potencjalnego działania przeciwbakteryjnego miedzi. Została ona coraz powszechniej używana w przemyśle i rolnictwie: produkcja miedzianych inkubatorów w biotechnologii, które miały na celu ograniczenie rozwoju zanieczyszczeń, pokrywanie kadłubów oraz dna łodzi miedzią, jako profilaktyka przed ich obrastaniem i ogłonowaniem, produkcja farb z dodatkiem miedzi w przemyśle stocznioowym, które znacznie redukowały rozwój bakterii. Pierwiastek ten spełnia również kluczowe role w medycynie. W 1992r. Sagripani opatentował budowę bronchoskopów pokrytych chlorkiem miedzi (II). Jak doniosły badania inaktywuje on *Bacillus subtilis* ze skutecznością równą dezynfektantowi i substancji sterylizujących, ale co najważniejsze jest niemutagenny, bezpieczny dla personelu, nie kancerogenny (w przeciwieństwie do formaldehydu). Nie wpływa on również negatywnie na samopoczucie personelu (w przeciwieństwie do aldehydu glutaralowego), gdyż poziom stężenia miedzi na powierzchni pozostawał niezmiennie poniżej poziomu w surowicy ludzkiej, czyli poniżej 1,1mg/l. Z nowoczesnych zastosowań miedzi znajdujemy ją na powierzchni przyrządów kuchennych, jako składnik płynów do płukania ust – zwiększa zapobieganie powstawania płytki nazębnej oraz w kostkarkach do lodu typu IceWand, gdzie hamuje osadzanie się śluzu, czyli zapobiega rozprzestrzenianiu się bakterii. W kwestii mechanizmu działania tegoż pierwiastka najbardziej prawdopodobną jest hipoteza, iż elektrochemiczny potencjał miedzi umożliwia wolnemu jej jonowi oddziaływanie na białka bakteryjne, czego następstwem jest hamowanie ich aktywności i nadanie miedzi właśnie przeciwbakteryjnego charakteru. Miedź na przestrzeni lat stała się coraz większym obiektem zainteresowań badaczy. Jednymi z poważniejszych odkryć w tej dziedzinie była teza, iż jony miedzi (II) mogą wchodzić w reakcję z lipidami, powodują peroksydację i w następstwie otwarcie kanałów w błonie komórkowej, co powoduje obniżenie integralności komórek. Następnie

badania nad *Escherichia coli*, której struktura została uprzednio uszkodzona właśnie przez jony miedzi (II) potwierdzają uszkodzenia łańcucha oddechowego przynajmniej w jednym miejscu, co spowodowało osłabienie metabolizmu bakterii. Udowodniono również, iż miedź w równie skuteczny sposób jak żelazo może generować rodniki tlenu poprzez reakcję Fentona. Przełomem okazał się jednakże rok 1983, kiedy to postanowiono zbadać w środowisku szpitalnym zależność pomiędzy materiałem z jakiego stworzono klamki do drzwi a jego działaniem przeciwbakteryjnym. Do badania użyto klamek utworzonych ze stali nierdzewnej, mosiądzu, miedzi i aluminium. W przypadku stali nierdzewnej i aluminium zaobserwowano, iż w ciągu ośmiu dni doszło do rozwoju wszystkich gatunków mikroorganizmów, które pozostały na klamkach nawet do trzech tygodni po zakończeniu badania, natomiast w przypadku klamek utworzonych z miedzi i mosiądzu, który jest stopem miedzi i cynku (10-45%) udowodniono, że rozwój mikroorganizmów był niewielki bądź nawet żaden, gdyż miedź była zdolna do natychmiastowej autodezynfekcji, natomiast mosiądz potrzebował do tego procesu jednej godziny. Najczęściej izolowane bakterie pochodzące z sal szpitalnych oraz od hospitalizowanych pacjentów to: *Pseudomonas aeruginosa* (33,9%), *Staphylococcus aureus* (30,0%), *Acinetobacter baumannii* (26,1%) oraz *Enterobacter* (4,3%). W przypadku *Acinetobacter Baumannii* niestety obserwuje się tendencję wzrostową na przestrzeni lat. Miedź ma w swoich zasługach dużą ilość udowodnionych sukcesów. *Staphylococcus aureus*, czyli znana na całym świecie superbakteria MRSA powoduje jedne z najcięższych do wyleczenia zakażeń. W Stanach Zjednoczonych zajmuje nadal drugie miejsce spośród bakterii opornych na antybiotyki, które są powszechne na Oddziałach Intensywnej Opieki Medycznej (OIOM). Łatwo przenoszona jest nieświadomie przez personel medyczny oraz pacjentów poprzez kontakt z bardzo zanieczyszczonym nią sprzętem i wśród zakażonych nią pacjentów. Jest o tyle kłopotliwa, iż jest metacyklinooporna oraz oporna na antybiotyki B-laktamowe, natomiast w organizmie człowieka może powodować infekcje skórne, kości, krwi oraz ciężkie, zagrażające życiu zapalenia płuc. Przebadano żywotność MRSA na trzech różnych metalach, które okazały się być przełomowe. Na stali nierdzewnej bakteria *Staphylococcus aureus* utrzymała się do 72 godzin, na złotym mosiądzu natomiast do 90 minut. Sytuacja na miedzi wyglądała zupełnie inaczej, mianowicie do 1,5 godziny obserwowano 99% początkowej ilości bakterii, do 3 godzin było jej już 80%, natomiast wystarczyło 4,5 godziny, aby ilość bakterii zmniejszyła się prawie o połowę, gdzie zaobserwowano już tylko 55% początkowej ilości bakterii. W 2002 roku zauważono również, iż powietrze jest najczęściej rozprzestrzeniającym bakterie nośnikiem, dlatego też opracowano innowacyjną metodę ekspozycji powierzchni na bakterie, czyli aerozol z dodatkiem miedzi. Zgłębiając temat charakteru miedzi zaobserwowano również, że wilgotność ma istotny wpływ na jej mechanizm działania przeciwbakteryjnego. Mianowicie przebadano obecność bakterii *Enterococcus faecalis* na powierzchni stali nierdzewnej, stali nierdzewnej z dodatkiem miedzi oraz czystej miedzi przy zmianie warunków wilgotności. Pierwszym eksperymentem była wilgotność rzędu 0% po 96 godzinach, gdzie na stali nierdzewnej przeżyło 75% bakterii, na mieszaninie stali nierdzewnej z miedzią 65%, natomiast na samej miedzi tylko 35% bakterii. Drugim przypadkiem była wilgotność rzędu 100% po 24h po aplikacji bakterii, gdzie w przypadku stali nierdzewnej przeżyło już tylko 40% bakterii, natomiast na czystej miedzi już 0%. Wnioskiem, który nasuwa się po analizie tych wyników jest fakt, iż mechanizmy przeciwbakteryjne miedzi zależą w sposób znaczący od wilgotności. Przy wysokiej wilgotności powierzchnia bakterii jest dużo bardziej uwodniona, dzięki czemu jony miedzi (II) są łatwiej transportowane do ściany komórki, co ułatwia absorpcję. Wchłonięcie wystarczającej ilości miedzi indukuje nieodwracalne uszkodzenia w układzie enzymatycznym bakterii, co wywołuje u niej śmierć. Mutagenność i oporność bakterii na działanie antybiotyków rośnie z każdym dniem, stąd usilne poszukiwania nowych rozwiązań i związków o dodatkowym działaniu przeciwbakteryjnym.

3. Zastosowanie jonów miedzi do tworzenia połączeń koordynacyjnych

Sama miedź jako pierwiastek wykazuje ewidentnie działanie przeciwbakteryjne, stąd też dobrym krokiem byłoby sprawdzenie czy utworzenie kompleksów miedzi z ligandami o udowodnionym działaniu przeciwdrobnoustrojowym spowoduje spotęgowanie tego działania. Przykładem takich ligandów mogą być pochodne tiosemikarbazydów, które wykazują właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwzapalne, przeciwgrybiczne, przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe,

przeciwcukrzycowe, przeciwbólowe oraz przeciwpadaczkowe. Spotęgowanie tych działań dało nadzieję na odnalezienie struktur o ciekawych aktywnościach i sile działania.

Zespół Moamen i Nashwa zaprezentowali w swojej pracy metody syntezy i charakterystykę utworzonych kompleksów m.in. Cu(II) z pochodnymi tiosemikarbazydów 5-bromo-2-hydroksybenzaldehydem oraz 2-hydroksybenzaldehydem. Związki kompleksowe w przypadku jonów miedzi (II) były tworzone poprzez zmieszanie gorącego etanolowego roztworu liganda (0,002mola) z gorącym etanolowym roztworem soli CuCl₂ (0,002mola). Całość ogrzewano przez 3-4 godziny w temperaturze 70-80 stopni Celsjusza. W wyniku reakcji uzyskano brązowe kryształki osadu, których strukturę potwierdzono badaniami IR. Kompleksy były stabilne na powietrzu, nierozpuszczalne w wodzie i popularnych rozpuszczalnikach organicznych, ale bardzo dobrze rozpuszczały się w DMSO i DMF. Badania mikrobiologiczne otrzymanych struktur potwierdziły, że związki kompleksowe tworzone w stosunku molowym 2:1 (M:L) wykazywały większe działanie biologiczne (przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne) w porównaniu z działaniem samego liganda (Moamen i Nashwa 2012).

Zespół Xu, Daxu, Xiaoying i in. utworzyli w wyniku reakcji CuCl₂*2H₂O z 1-(2-karboksybenzoylo)tiosemikarbazydem oraz imidazolem kompleks [Cu₃L₂(Py)₆(HIm)]H₂O₂. Kompleksy te są podejrzewane o ciekawy charakter działania, mianowicie zdają się być stabilne w organizmach żywych i wykazywać w badaniach *in vitro* cytotoksyczne działanie przeciwko komórkom Erlicha. Drugim mechanizmem działania jest udział w wiązaniu jonów miedzi (II) z zasadami azotowymi DNA lub RNA. Otrzymane kompleksy również były stabilne na powietrzu, o lekko krystalicznej strukturze i rozpuszczalne tylko w DMSO, DMF oraz Py (Xu, Daxu et al. 1997).

Kolejną próbą było utworzenie kompleksów miedzi z grupą związków o potencjalnej wiodącej aktywności przeciwrzucicznej. W wyniku reakcji w alkoholowym roztworze w stosunku molowym 1:1 (M:L) utworzono z powodzeniem kompleksy z udziałem liganda N-etylo-2-izonikotionylodhydrazidem karbotioamidu. Szeroką badań nad związkiem (IR, UV-Vis, MS, analiza termiczna) potwierdził utworzenie wiązań koordynacyjnych między atomem miedzi a ligandem z dobrą wydajnością (ok. 95%). Jednakże w przypadku tych kompleksów w wyniku analiz pod kątem działania przeciwko dwóm bakteriom G(+) *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* oraz G(-) *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* wykazano niższe działanie hamujące rozrost tych bakterii niż w przypadku próby kontrolnej przy użyciu ampicyliny. Autorzy zauważyli jednak, iż utworzone związki kompleksowe powodują redukcję biofilmów bakterii (Orif, Abdel-Rahman et al. 2015).

Podsumowując przegląd literatury najczęściej stosowanym stosunkiem molowym liganda (tiosemikarbazydu) do metalu jest 2:1, roztwór ma charakter alkoholowy i jest utrzymywany w temperaturze 40-60 stopni Celsjusza przez około 3-4 godziny. Osady są przesączane pod ciśnieniem, następnie przemywane etanolem (najczęściej) i pozostawiane do wyschnięcia. Kompleksy miedzi z tiosemikarbazydami są otrzymywane z dość wysokimi wydajnościami (80-95%). Tiosemikarbazydy są dobrym ligandem, ze względu na dwukleszczową naturę i łatwość tworzenia wiązania koordynacyjnego przez przede wszystkim atomy azotu i siarki. Kompleksy dość ciężko lub wcale nie rozpuszczają się w wodzie, alkoholu, chloroformie oraz popularnych odczynnikach organicznych, natomiast bardzo dobrze w DMSO oraz DMF. Nie jest jednak pewnym, iż w myśl zasady, że wiązania chelatujące powodują, że aktywność ligandów ulega wzmocnieniu i powoduje powstanie silnego środka bakteriobójczego jest adekwatna w przypadku wszystkich ligandów pochodnych tiosemikarbazydów (Parmar i Kumar 2009). Zdecydowana jednak większość wykazuje wzmocnienie swojego działania, a podstawą jest jednak fakt, iż kompleksy miedzi wykazują najwyższą stabilność spośród innych popularnych metali (Chandra i Gupta 2001). Wartymi uwagi są związki heterocykliczne, które w swojej strukturze, oprócz atomów węgla mogą zawierać inne heteroatomy, m.in. azotu, tlenu, siarki, fosforu itp. Związki te są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie i wykazują aktywność biologiczną. Występują w cząsteczkach licznych barwników naturalnych, alkaloidach, aminokwasach, witaminach, enzymach, nukleoproteinach i antybiotykach. Z medycznego punktu widzenia największe znaczenie mają pięcio- i sześcioczłonowe pierścienie heterocykliczne.

4. Podsumowanie:

Miedź jest bardzo ważnym pierwiastkiem dla zdrowia i życia wszystkich organizmów żywych oraz roślin. Jej szerokie a przede wszystkim skuteczne i szybkie działanie przeciwdrobnoustrojowe jest z powodzeniem wykorzystywane do tworzenia wiązań kompleksowych z ligandami innych struktur. Łatwość tworzenia połączeń koordynacyjnych jest kolejną korzyścią przemawiającą na korzyść wykorzystania tychże struktur. Jedynym warunkiem jest podobny kierunek działania jonów miedzi i odpowiedniego liganda, ażeby móc myśleć o pogłębieniu aktywności na podstawie dualizmu ich działań. Wiele badań prowadzonych w ośrodkach na całym świecie prowadzi badania w tym kierunku i co ciekawe coraz częściej można spotkać się z doniesieniami, które potwierdzają, że utworzone związki koordynacyjne z jonami miedzi, jako atomem centralnym wykazują dużo skuteczniejsze działanie biologiczne w porównaniu do aktywności samych ligandów. Bakteriooporność wydaje się stale rosnąć, z prognoz dotyczących jej rozwoju jasno wynika, że w przeciągu kilkudziesięciu lat zabraknie nam skutecznych antybiotyków oraz chemioterapeutyków do walki z ciągle mutującymi się drobnoustrojami. Nadużywanie antybiotyków przez pacjentów w obecnych czasach również nie pomaga w zwalczaniu tego zjawiska. Tylko nieustanne poszukiwania nowych struktur dają nam nadzieję na „spokojne jutro”.

5. Literatura:

- Bonnie Ransom Stern, Marc Solioz, Daniel Krewski, Peter Aggett et al. (2007) *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* Vol. 10 (3):157-222.
- Chandra S, Gupta L, (2009) *Synthesis, Spectroscopic, and Antimicrobial Studies of the Bivalent Nickel, and Copper Complexes of Thiosemicarbazide*. *Chem. Pharm. Bull.* 57 (6): 603—606.
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/copper.pdf
<http://luskiewnik.strefa.pl/biochemia/cuprum.htm>
- Markiewicz Z, Kwiatkowski Z, (2001) *Bakterie antybiotyki lekooporność*.
- Moamen S, Nashwa M. (2012) Spectral, thermal and biological studiem of Mn(II) and Cu(II) complexes with two thiosemicarbazide derivatives. *Spectrochimica Acta Part A* 92: 336-346.
- Orif M, Abdel-Rhman M. (2015) Synthesis, spectra and structural studiem on some New isonicotinic thiosemicarbazide complexes and its biological activity. *Polyhedron* 98: 162-179.
- Parmar S, Kumar Y. (2009) Synthesis, spectroscopic, and antimicrobial studies of the bivalent nickel, and copper complexes of thiosemicarbazide. *Chem. Pharm. Bull* 57: 603-606.
- Ralph A, McArdle H. (2001) Copper metabolism and copper requirements in the pregnant mother, her fetus, and children : a critical review; International Copper Association.
- Xu S, Daxu W, Xiaoying H et al. (1997) Copper complexes derived from 1-(2carboxybenzoyl)thiosemiacarbazide (H3L):syntheses, characterization and crystal structure of [Cu₃L₂(Py)₆](HIm)(H₂O)₂. *Polyhedron* 16: 1477-1482.
- Yamada S, Inaba M. (2004) Osteoporosis and mineral intake. *Clin. Calcium*, 14(12): 96-99.

11. Metody spektroskopowe oznaczania struktury związków kompleksowych z jonami metali

Spectroscopic methods for determining the structure of complex compounds with metal ions

Monika Drózd⁽¹⁾, Dominik Straszak⁽²⁾, Gabriela Widelska⁽³⁾, Aleksandra Dymek⁽⁴⁾, Jacek Skup⁽⁵⁾,
Monika Pitucha⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾ Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾ Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁵⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Zdrowia Publicznego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab.n.farm. Monika Pitucha

Monika Drózd: monika.drozd@umlub.pl

Słowa klucze: metody spektroskopowe, związki kompleksowe, struktura organiczna, widma, jony metali

Abstrakt

Chemia koordynacyjna w ostatnich czasach zdobywa coraz większe zainteresowanie naukowców. Coraz większa ilość ośrodków badawczych na całym świecie widzi potencjał w zgłębianiu wiedzy na temat związków kompleksowych zawierających w swojej strukturze jony różnych metali. Ligandy, które są używane do tworzenia nowych związków powinny wykazywać aktywność biologiczną. Czasem jest to podobny charakter działania w stosunku do aktywności samego metalu, czasem odmienny, dzięki czemu możemy spodziewać się otrzymać nowe substancje o głównym, silnym działaniu, spotęgowanym jednakowym działaniem ligandu i metalu, bądź substancje, które będą miały jednocześnie różne aktywności, co będzie skutkiem połączenia różnych kierunków działań ligandu i metalu. Lekooporność w naszych czasach rośnie w zatrważającym tempie, dlatego ważnym jest, ażeby zwrócić uwagę na poszukiwanie coraz to nowych substancji o nowych kierunkach działania. Kolejną możliwością z której wielu badaczy korzysta każdego dnia jest próba modyfikacji substancji o znanym kierunku działania, zmiana ich struktury poprzez dodanie innych grup funkcyjnych, przeobrażenie ich w zupełnie inną strukturę, bądź połączenie z innym związkiem, bądź jego fragmentem. Wprawny chemik jest w stanie w krótkim czasie przygotować przemyślany plan syntezy, ażeby otrzymać pożądaną strukturę, jednakże w teorii wszystko odbywa się łatwo i prawidłowo. Jednym z najważniejszych etapów w pracy każdego naukowca jest potwierdzenie czy synteza, którą przeprowadził rzeczywiście doprowadziła do uzyskania zaplanowanego w teorii związku oraz czy warto inwestować czas i kolejne nakłady finansowe na następne etapy np. badania aktywności biologicznej owych substancji chemicznych - in vitro bądź in vivo. Niejednokrotnie otrzymany na drodze syntezy związek chemiczny okazuje się mieć nieprawidłową strukturę, bądź być niedoczyszczony w procesie krystalizacji bądź dysocjacji. Każdą taką sytuację w dzisiejszych czasach można bardzo szybko wyeliminować i rozwiązać poprzez „podejrzenie” czy synteza przebiegła w pomyślny dla badacza sposób. Dlatego właśnie do potwierdzenia, że otrzymana w wyniku syntezy struktura rzeczywiście jest tym, za co ją się uważa używane są szeroko pojęte metody spektroskopowe. Ogromnym plusem jest ich szeroki wybór, dzięki któremu możemy scharakteryzować właściwie każdy element składowy, będący zaledwie częścią bądź też całą strukturę.

1. Wstęp

Na wstępie warto przybliżyć czym są związki kompleksowe a są nimi struktury, które powstają w wyniku połączenia dwóch lub więcej niezależnych cząsteczek. Owe cząsteczki łączą się ze sobą za pomocą wiązania koordynacyjnego, zwanego również wiązaniem donorowo-akceptorowym, które charakteryzuje fakt, iż jedna składowa posiada wolny orbital a druga wolną parę elektronową. Patrząc przez pryzmat geometrii tak powstały kompleks składa się z atomu centralnego, który posiada przyłączone w uporządkowany sposób inne atomy, bądź grupy atomów, które nazywane są ligandami. Metal, który zazwyczaj dysponuje minimum jednym wolnym orbitalem, który będzie odpowiedni do utworzenia wiązania koordynacyjnego nazywany jest atomem centralnym. Ligandami natomiast nazywane są cząsteczki, jony lub atomy, które posiadają wolną parę elektronową, która będzie odpowiednia do utworzenia właśnie wiązania koordynacyjnego z atomem centralnym (McNaught i Wilkinson 2005).

Do oznaczania struktury związków organicznych używamy nie tylko chemii teoretycznej, ale również możemy wykorzystywać metody fizyczne. Najszerze zastosowanie po dziś dzień znalazły niepodważalnie metody, które swoim działaniem wykorzystują zjawiska związane z oddziaływaniem promieniowania elektromagnetycznego z materią. Promieniowanie to obejmuje zakresy rozpoczynając od fal radiowych a kończąc na promieniowaniu gamma. Rozróżniamy dwa typy widm – adsorpcyjne, kiedy energia stanu końcowego cząsteczki jest większa od energii stanu początkowego i zmiana energii jest dodatnia a samo promieniowanie jest pochłaniane przez układ, czyli cząsteczkę. Drugim typem widm jest widmo emisyjne, gdzie energia stanu końcowego jest niższa od energii stanu początkowego a różnica energii jest ujemna, czyli promieniowanie jest emitowane przez naszą cząsteczkę (Kazicyna i Kupletska 1974). Charakteryzowanie promieniowania elektromagnetycznego możemy wyrazić za pomocą długości fali lub częstotliwości, natomiast obie te wartości są ze sobą połączone zależnością:

$$v=c/\lambda$$

częstotliwość v [s^{-1}]; prędkość światła c [m/s]; długość fali λ [nm]

Powstające pomiędzy różnymi poziomami energii jej różnice nazywane są energią przejścia. Odpowiednie wielkości energii, które odpowiadają odpowiedniemu typowi promieniowania powodują oddziaływania z materią i wywołują zmiany stanów energetycznych elektronów atomów, co możemy wizualnie obserwować na widmach spektroskopowych, czyli graficznym zobrazowaniu tych zmian. Istnieje kilka typów promieniowania: gamma, rentgenowskie, nadfioletowe i widzialne, podczerwień, mikrofałe i fale radiowe, dlatego w zależności od badanej struktury należy użyć różnych przyrządów i różnych technik eksperymentalnych. W przypadku widm absorpcyjnych bez względu na zakres długości fal do zarejestrowania widma potrzebujemy próbki badanej substancji, źródło promieniowania, układ dyspersyjny, który pozwoli na wydzielenia z widma promieniowania monochromatycznego, detektora, dzięki któremu możliwe będzie zmierzenie natężenia promieniowania przechodzącego przez próbkę oraz urządzenia rejestrującego.

Pojęcie identyfikacji substancji jest rozumiane jako ustalenie liczby i sposobu powiązania ze sobą poszczególnych atomów, ich rodzaju, lecz uwzględniając jedynie trwałe elementy stereochemiczne, które mają bezpośredni wpływ na kształt cząsteczek i ich właściwości fizykochemiczne w normalnych warunkach. Dzięki temu możliwe będzie rozróżnienie izomerów E i Z, izomerów R i S związków optycznie czynnych. Nie będzie możliwe natomiast ustalenie m.in. kątów walencyjnych oraz długości wiązań. Jest to pośrednio związane z tym, iż do identyfikacji związków chemicznych nie ma potrzeby wykorzystania takich informacji.

Spektroskopia jest dziedziną nauki o teoretycznych oddziaływaniach pomiędzy materią, która jest zbiorem cząsteczek oraz atomów a oddziaływaniem elektromagnetycznym. Oddziaływanie to jest zaburzeniem falowym pola elektromagnetycznego, które rozchodzi się w próżni z prędkością ok. $3 \cdot 10^8$ m/s. Promieniowanie wykazuje naturę dualistyczną. Uwzględnia się jego falowy charakter, gdyż charakteryzują go takie wielkości jak długość fali, częstość oraz liczba falowa, jednakże traktuje się je jako wiązkę fotonów, czyli cząstek, które mają określoną energię i którym można przypisać pewną masę związaną z przenoszoną przez nie energią.

Nauka wiele zyskała dzięki pojawieniu się metod spektroskopowych. Pierwszy kompleks karbonowy został bowiem zsyntetyzowany w 1915r. przez badacza Czugaiewa na kilka lat przed jego śmiercią, w wyniku reakcji hydrazyny z kompleksami izocyjankowymi platyny, jednakże Czugaiew nie był w stanie potwierdzić struktury otrzymanego przez siebie związku, ze względu na brak fizycznych metod badawczych w tamtych czasach. Dopiero w roku 1973 udało się potwierdzić hipotezę Czugaiewa a propos utworzonej przez niego soli – kompleksu karbonowego, którego struktura została zidentyfikowana dzięki wykorzystaniu metod NMR oraz RSA (Starodub et al. 2017).

Na wielki podziw zasługuje zdobywca Nagrody Nobla z 1913r. Alfred Werner i grupa jego studentów, którzy dokonali syntezy dużej ilości związków kompleksowych, w fazie stałej oraz w roztworach. W tamtych czasach metody spektrofotometryczne również nie były dostępne, dlatego postanowili oni udowodnić swoją teorię dokonując pomiarów przewodnictwa dla swoich serii o kolejno zmienianym składzie. Dzięki tej teorii udało im się potwierdzić przestrzenny rozkład atomów i grup stosując metodę „liczenia izomerów”. Wszystko to były to pierwsze kroki i pierwsze potrzeby zdobywania coraz głębszej i bardziej rozległej wiedzy na temat struktury i budowy związków, którymi się zajmowali uczeni z tamtych lat (Stasicka i Stochel 2014).

2. Metody spektroskopowe oznaczania związków kompleksowych

Podstawowymi metodami badania struktury utworzonych związków koordynacyjnych są spektroskopia w podczerwieni (IR), spektroskopia ramanowska, spektroskopia mas oraz krystalografia.

Spektroskopia IR

Jest to jedna z najlepszych metod oznaczania grup funkcyjnych oraz poszczególnych fragmentów badanej substancji z tego względu, iż grupy funkcyjne oraz inne charakterystyczne ugrupowania atomów potrafią absorbować promieniowanie podczerwone w stosunkowo wąskich obszarach promieniowania elektromagnetycznego. Każdej grupie odpowiada również kilka charakterystycznych dla niej liczb falowych. Dla grup funkcyjnych takich jak: OH, C=O oraz NH₂ charakterystyczne wartości przypadają na zakres powyżej 1500cm⁻¹. Jednoznacznym dowodem nieobecności tychże ugrupowań w badanej substancji jest brak pasm absorpcji przypisanych wymienionym grupom. Dodatkowo metoda ta jest jedną z najbardziej znaczących metod badania występowania wiązania wodorowego wewnątrzcząsteczkowego, jak również i międzycząsteczkowego. Podczerwień obejmuje część widma promieniowania elektromagnetycznego w zakresie pomiędzy promieniowaniem widzialnym a mikrofalowym. W chemii organicznej najważniejszą rolę odgrywa zakres między 4000 a 400 cm⁻¹. Największą wartością tej metody jest fakt, iż nie ma prawdopodobności sytuacji, gdy dwa różne związki wykazywałyby takie same widma IR. Wyjątkiem od tej sytuacji są tylko widma enancjomerów. Dlatego metoda ta daje pewność analizy struktury. Widmo w podczerwieni jest charakterystyczne dla całej struktury, ale również wszystkie ugrupowania wchodzące w skład badanego związku chemicznego będą wykazywały pasma charakterystyczne dla siebie. Obserwacja ich oraz porównanie z tabelami częstości grup pozwala poznać nam bliżej badaną strukturę. W teorii promieniowanie podczerwone o częstości mniejszej niż 100cm⁻¹ ulega absorpcji i przekształceniu przez strukturę organiczną w energię oscylacyjną. Długość fali promieniowania i ich częstość zależy od stałych siłowych, względnych mas atomowych oraz geometrii cząsteczki. Położenie pasm w widmie IR jest charakteryzowane liczbami falowymi. Istnieją dwa typy drgań cząsteczkowych, są nimi drgania rozciągające i zginające. W promieniowaniu podczerwonym obserwujemy tylko te drgania, które wywołują rytmiczne zmiany momentu dipolowego cząsteczki (Silverstein, Webster et al. 2005).

Spektroskopia Ramana

Jest metodą komplementarną do spektroskopii IR i odwrotnie. Obie dostarczają informacji o wibracjach cząsteczek. Metoda ramanowska jest to technika, która polega na pomiarze promieniowania tzw. rozproszenia Ramana, czyli nieelastycznego rozpraszania fotonów. Jak wiadomo światło rozproszone ma inne częstotliwości niż światło padające. Spektroskopia ta ma kilka podstawowych zalet przemawiających za jej stosowaniem, mianowicie możliwość użycia światła

widzialnego, co jest łatwiejsze do zastosowania w warunkach doświadczalnych. Dodatkowo niektóre cząsteczki dwuatomowe takie jak H_2 czy O_2 jako, że nie posiadają momentu dipolowego to nie są aktywne w podczerwieni, więc ich widma mogą być tylko badane metodą Ramana. Spektroskopia ta umożliwia również badanie ruchu cząsteczek, które wykonując m.in. ruchy obrotowe zmieniają swoje położenie, co równocześnie powoduje zmianę ich ukierunkowania względem padającego na nich światła. Obie metody komplementarne dostarczają informacji na temat budowy badanych cząsteczek, ich polaryzowalności oraz wiązaniach międzyatomowych.

Spektroskopia mas

Metoda ta opiera się na jonizacji badanego związku chemicznego, dzięki czemu powstałe jony rozdzielają się w zależności od stosunku ich masy do ich ładunku, natomiast liczba jonów odpowiadająca każdej powstałej jednostce masa:ładunek jest rejestrowana jako widmo. Metoda spektroskopii mas pozwala nam rejestrować masy cząsteczkowe badanego związku z dużą dokładnością do liczb całkowitych. Interpretacji wyników dokonujemy na podstawie wyników z dokładnością do 4 miejsca po przecinku.

Krystalografia

W przypadku tej metody badanie kryształów wymaga zazwyczaj promieniowania rentgenowskiego, ze względu na zbyt duże rozmiary badanych obiektów. Wynikiem badania krystalograficznego jest mapa gęstości elektronów w cząsteczce a nie częstości promieniowania atomów. Powodem tego jest fakt, iż pole elektromagnetyczne oddziałuje z materią poprzez promieniowanie elektromagnetyczne, dlatego elektrony oddziałują z tymże promieniowaniem dużo silniej niż jądra atomowe bądź protony, gdyż są od nich dużo lżejsze a ma to kluczowe znaczenie, gdyż intensywność rozproszonego promieniowania jest proporcjonalna do stosunku ładunku do masy. Ze względu na to, że prędkość elektronów jest wielokrotnie większa w stosunku do szybkości zmian pola elektrycznego nie obserwujemy pojedynczych elektronów, lecz rozkład elektronów uśredniony w czasie w atomie. Gęstość elektronów dobrze odwzorowuje kształt cząsteczki z powodu tego, że elektrony otaczają jądra atomowe i wiązania. Poziom szumów powodowanych przez cząsteczki powietrza czy wody powoduje, że rozpraszanie promieniowania przez każdą badaną cząsteczkę jest bardzo słabe, co powoduje, że jest również trudne do wykrycia. W kryształach cząsteczki w większości są uporządkowane w przestrzeni, dlatego rozproszone promieniowanie jest „zgodne w fazie”, więc mówi się tu o zachodzeniu konstruktywnej interferencji. Jeśli sygnał promieniowania w pewnych kierunkach ulega wzmocnieniu w wyniku interferencji, w innych miejscach musi się wygasić, dlatego obraz dyfrakcji kryształu nie jest ciągły, więc składa się z pojedynczych kropek. W idealnym wyobrażeniu w kryształach cząsteczki są ułożone w sposób regularny i tworzą w przestrzeni sieć trójwymiarową. Marzeniem wszystkich badaczy jest otrzymanie monokryształu, jednak w przypadku związków kompleksowych jest to zazwyczaj bardzo trudne i często zupełnie niezależne od sposobu prowadzenia syntezy bądź też oczyszczania osadów (krystalizacji).

3. Metodyka identyfikacji struktury

Pojedyncze metody oznaczania struktury związku chemicznego nigdy nie dadzą nam jednoznacznej odpowiedzi i tym samym pewności, że mamy do czynienia z daną substancją. Sposób identyfikacji zależy od wielu czynników niezależnych od siebie, lecz jako wiodące należałoby uznać minimum trzy, czyli stan skupienia substancji – ciecz, gaz czy ciało stałe. Drugim z nich jest pochodzenie substancji – naturalna, syntetyczna czy o niewiadomym pochodzeniu. I ostatnim czynnikiem są umiejętności osoby badającej, stopień zaawansowania w prowadzeniu i interpretacji oznaczeń struktury mogą okazać się tzw. „gwoździem do trumny” całego przedsięwzięcia. Ważnym czynnikiem jest również stan wyposażenia laboratorium ośrodka badawczego w którym prowadzone mają być oznaczenia. Musi on bowiem posiadać odpowiedni sprzęt, który jest dość kosztowny.

Pierwszym etapem przed dokonaniem oznaczeń jest określenie rozpuszczalności badanej substancji w typowych rozpuszczalnikach chemicznych. Następnie powinno się stwierdzić jednorodność próbki metodą TLC (w przypadku próbek o stanie skupienia stałym bądź ciekłym). Na tym etapie przydają się informacje z poprzedniej fazy a propos rozpuszczalności substancji badanej.

Następnie przydatnym krokiem jest wykonanie analizy elementarnej, żeby dowiedzieć się jakie atomy zawiera nasz związek. Ważna jest też znajomość tajników samej syntezy substancji, którą identyfikujemy. Przydatne są informacje na temat budowy reagentów, wydajności produktu, schematu prowadzenia syntezy, warunków syntezy, użytych katalizatorów, rozpuszczalników czy temperatury. Ważna jest też znajomość sposobów oczyszczenia bądź wyodrębnienia substancji, którą chcemy zidentyfikować. Ważna jest znajomość temperatury topnienia bądź wrzenia naszej substancji. Ażeby uznać, że dana struktura została zidentyfikowana to przynajmniej trzy metody spektroskopowe powinny potwierdzić postawioną przez badacza hipotezę – w przypadku, gdy mamy do czynienia ze strukturą już uprzednio opisaną w literaturze. Jeśli jest to nieznaną strukturą powinno się dążyć do ustalenia jak największej ilości informacji, które będą potwierdzały hipotezę. W przypadku, gdy mamy do czynienia z substancją zdolną do tworzenia monokryształów najlepszą metodą, którą należy wybrać jest wykonanie rentgenografii strukturalnej (Zieliński i Rajca 1995).

Ze względu na specyficzną budowę związków kompleksowych zbudowanych z ligandów i jonu metalu jedynymi metodami użytecznymi do ustalenia struktury są spektroskopia IR, spektroskopia Ramana, spektroskopia mas i krystalografia. Pierwsze dwie są podstawowymi metodami, które są ze sobą komplementarne, czyli uzupełniają się dając szerszy ogląd na budowę naszego związku. Spektroskopia mas powinna być wykonana w sposób niezależny od spektroskopii IR i Ramana, gdyż daje cenne informacje na temat masy naszej badanej struktury. Krystalografia, jeśli tylko istnieją dogodne warunki w postaci odpowiedniej budowy cząsteczki powinna być również wykonana, ażeby potwierdzić lub zburzyć postawioną przez badacza hipotezę.

4. Podsumowanie

W dzisiejszych czasach możemy cieszyć się znaczącym postępem nauki i technologii, które bardzo pomagają badaczom w ustaleniu z jakim związkiem przyszło im się mierzyć w swojej codziennej pracy zawodowej i naukowej. Ogromnym, niewątpliwym plusem jest odstępianie od obliczeń teoretycznych wykonywanych na kartkach papieru, bądź ogromnych tablicach znanych nam już tylko ze starych zdjęć. Ich miejsce zajęły komputery wyposażone w zaawansowane programy, które zautomatyzowały wszystkie obliczenia i proponowanie struktury oznaczanego związku. Ten krok w przód nie tylko spowodował ogromne oszczędności czasu badaczy, lecz również zminimalizował prawdopodobieństwo popełnienia błędu właściwie do zera. Koszt sprzętu i oprogramowania niezbędnego do obsługi jest wysoki, lecz korzyści z użytkowania w pełni rekompensują go. Dzięki dostępnym metodom spektrofotometrycznym mamy ogromne możliwości poszukiwań i potwierdzania stawianych sobie hipotez. Możemy oznaczać struktury zupełnie nam nieznane, jak również kontrolować prowadzone syntezy na każdym ich etapie. Związki koordynacyjne nie są najłatwiejszą grupą do oznaczania ich struktury, szczególnie, kiedy próbujemy ustalić ich budowę, której jak dotąd nikt jeszcze nie otrzymał i nie opisał w literaturze fachowej. Jednakże opisane powyżej metody powinny przynieść odpowiedź na nurtujące pytania.

5. Literatura:

- Kazicyna L.A, Kupletska N.B (1974) Metody spektroskopowe wyznaczania struktury związków organicznych: 9-11.
- McNaught A.D, Wilkinson A (2005) Kompendium terminologii chemicznej. IUPAC Recommendations: 623.
- Silverstein R, Webster F, Kiemle D (2007) Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych: 72-76.
- Starodub W, Starodub T, Oszczudłowski J (2017) Chemia związków koordynacyjnych: 164.
- Stasicka Z, Stochel G (2014) Podstawy i perspektywy chemii koordynacyjnej: 33-34.
- Zieliński W, Rajca A (1995) Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych: 520-523.

12. Procesy destrukcyjne zachodzące w tłuszczach roślinnych i wskaźniki jakości tłuszczów

Destruction processes in vegetable fats and indicators of fats quality

Gawrońska Monika⁽¹⁾, Szalińska Marta⁽¹⁾, Dzięcioł Małgorzata⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe Ligi Ochrony Przyrody, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

⁽²⁾ Instytut Technologii Chemicznej Organicznej, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Gawrońska Monika: gawronska.monika@gmail.com

Słowa kluczowe: oleje roślinne, jełczenie tłuszczów, kontrola jakości tłuszczów

Streszczenie

Omówiono skład i właściwości tłuszczów roślinnych, koncentrując się na procesach destrukcyjnych zachodzących podczas ich otrzymywania, przechowywania oraz użytkowania. Scharakteryzowano rodzaje jełczenia tłuszczów, wskazując rodzaje powstających w ich trakcie związków. Przedstawiono sposoby oceny jakości tłuszczów za pomocą wskaźników zalecanych przez normy (liczba jodowa, liczba kwasowa, liczba nadtlenkowa, liczba anizydynowa) oraz innych popularnych metod, takich jak próba Taufla – Thalara, próba Kreisa, próba z kwasem 2-tiobarbiturowym, wskaźnik Totox i inne, określając zastosowanie i przydatność każdej z nich.

1. Wstęp

Tłuszcze są substancjami nietrwałymi, łatwo ulegającymi procesom zepsucia pod wpływem różnych czynników. Ich jakość i właściwości są w dużym stopniu uzależnione od używanych surowców, sposobu otrzymywania, metod obróbki oraz warunków przechowywania. Pod wpływem wysokiej temperatury, obecności tlenu, światła, wody i innych czynników, tłuszcze łatwo ulegają procesom rozkładu. Psucie się tłuszczów jest również wynikiem procesów biochemicznych zachodzących pod wpływem enzymów. Wszystkie te procesy określa się mianem jełczenia. W ich efekcie dochodzi do pogorszenia właściwości smakowych i zapachowych tłuszczów oraz tworzenia związków szkodliwych, co łączy się z obniżeniem ich jakości. Charakterystycznymi procesami powodującymi pogorszenie jakości olejów roślinnych są utlenianie, hydroliza i polimeryzacja. Ze względu na złożoność zmian zachodzących podczas tych procesów, nie ma jednej uniwersalnej metody, na podstawie której można określić jakość olejów roślinnych. W kontroli jakości tłuszczów wykorzystywane są różne specyficzne metody, na podstawie których można określić rodzaj oraz stopień zachodzących w nich zmian.

2. Opis zagadnienia

Tłuszcze roślinne są szeroko używane zarówno w przemyśle spożywczym, jak i do wyrobu produktów kosmetycznych. Na skutek procesów destrukcyjnych zachodzących podczas produkcji, przetwarzania, przechowywania i użytkowania tłuszczów, pogarszają się ich właściwości organoleptyczne i odżywcze, mogą się również tworzyć związki szkodliwe. Z tego względu niezbędna jest kontrola tłuszczów za pomocą metod, które pozwalają na jakościową i ilościową ocenę poszczególnych parametrów jakości.

3. Przegląd literatury

Skład i właściwości tłuszczów roślinnych

Z punktu widzenia budowy chemicznej tłuszcze są estrami glicerolu i wyższych kwasów tłuszczowych. Obecne w nich kwasy tłuszczowe mogą być nasycone lub nienasycone, a od ich rodzaju i stosunków ilościowych zależą właściwości fizyko-chemiczne tłuszczów oraz ich

konsystencja. Tłuszcze roślinne charakteryzują się obecnością nienasyconych kwasów tłuszczowych (kwas oleinowy, linolenowy, linolowy, arachidonowy, eikozapentaenowy, dokozaheksaenowy), co nadaje im płynną konsystencję. Tłuszcze zawierają w swoim składzie również wolne kwasy tłuszczowe, sterole, fosfolipidy, sole mineralne, witaminy, węglowodory i wiele innych. W świeżych tłuszczach roślinnych obecne są witaminy: A, C, E, PP, witaminy z grupy B i inne. Nadają one olejom właściwości odżywcze oraz antyoksydacyjne. Jednym z najważniejszych naturalnych składników o działaniu antyoksydacyjnym jest witamina E, będąca mieszaniną tokoferoli: α , β , γ , δ i ich nienasyconych analogów – tokotrienoli. Wśród nich najbardziej aktywny jest α -tokoferol. Wolne tokoferole i tokotrienole wykazują dużą wrażliwość na działanie tlenu oraz promieniowania UV. W procesie rafinacji olejów zniszczeniu ulega około 75% ilości witaminy E. Jej zawartość w olejach tłoczonych na zimno jest zdecydowanie większa i stanowi ona naturalną ochronę przed ich utlenianiem. Na szybkość procesów destrukcyjnych zachodzących w tłuszczach ma wpływ rodzaj kwasów tłuszczowych (zwłaszcza ilość wiązań nienasyconych), obecność antyoksydantów i prooksydantów (np. enzymów, metali, soli), oraz czynniki zewnętrzne (dostęp światła, tlenu, temperatura). Aby zapobiegać procesom jęlczenia tłuszczów, należy przechowywać je w chłodnych i suchych warunkach, bez dostępu światła słonecznego. Na skalę przemysłową można również zapobiegać temu procesowi poprzez dodatek antyoksydantów, pakowanie w atmosferze modyfikowanej i stosowanie antyseptycznych opakowań. Niestety w trakcie wszystkich procesów, w których tłuszcze są ogrzewane do wysokiej temperatury (tłoczenie na gorąco, rafinacja, smażenie) następują intensywne zmiany w ich składzie (Sikorski i Staroszczyk 2017; Zin 2008; Rutkowska i Żbikowska 2007).

Procesy destrukcyjne zachodzące w tłuszczach

Utlnianie

Najczęstszym powodem pogorszenia jakości tłuszczów są procesy utleniania, podczas których tlen atmosferyczny zostaje przyłączony do kwasów tłuszczowych w miejscu występowania wiązań nienasyconych, z utworzeniem wodoronadtlenków. Procesy te mogą być katalizowane przez enzymy, np. lipooksygenazy, lub przebiegać na drodze chemicznej. Utlnianie musi zostać zapoczątkowane, np. pod wpływem światła (fotosensybilizacja), podwyższonej temperatury, działania enzymów lub jonów metali (kobaltu, żelaza, chromu, miedzi) będących katalizatorami reakcji. Autooksydacja charakteryzuje się łańcuchowym przebiegiem, podczas którego wyróżnić możemy okresy: inicjacji, propagacji oraz terminacji. Inicjacja rozpoczyna się w momencie pojawienia się inicjatora zdolnego do odłączenia protonu z cząsteczki kwasu tłuszczowego, a następnie wytworzenia wolnego rodnika. Podczas propagacji utworzone wolne rodniki zaczynają reagować z tlenem atmosferycznym tworząc wolne rodniki nadtlenkowe. Utworzone rodniki nadtlenkowe biorą udział w reakcji z cząsteczkami kwasów tłuszczowych, w wyniku czego powstają nowe wolne rodniki oraz wodoronadtlenki. Następnie powstałe wodoronadtlenki rozpadają się na wolne rodniki, które biorą udział w etapie inicjacji autooksydacji. Jednocześnie powstają inne, tzw. wtórne produkty utleniania, do których zaliczyć można ketony, aldehydy, ketokwasy, hydroksykwasy, węglowodory, alkohole czy etery. Związki te nadają tłuszczom nieprzyjemny zapach i smak. Ostatnim etapem autooksydacji jest terminacja, podczas której następuje wygaszanie wolnych rodników. Reakcja autooksydacji trwa aż do momentu wyczerpania się tlenu atmosferycznego lub zastosowania przeciwutleniacza, który jest w stanie zatrzymać reakcję. Jednymi z najbardziej niebezpiecznych produktów utleniania olejów roślinnych są oksyfitorole, których jest więcej w olejach rafinowanych niż w tłoczonych na zimno, a ich ilość rośnie intensywnie podczas smażenia. Procesom utleniania można w pewnym stopniu zapobiegać poprzez zastosowanie przeciwutleniaczy, takich jak naturalne oraz syntetyczne tokoferole, butylohydroksyanizol, galusany, kwas mlekowy (Grajek 2007; Zin 2008; Sikorski i Staroszczyk 2017; Cichosz i Czeczot 2011).

Hydroliza

Proces hydrolizy nazywany jest również lipolizą lub jęlczeniem hydrolitycznym. Polega on na rozpadzie cząsteczki tłuszczu pod wpływem wody oraz enzymów, jakimi są lipazy. Sprzyja jej podwyższona temperatura i obecność tzw. promotorów, którymi mogą być różne związki o charakterze

zasadowym lub kwasowym. W wyniku hydrolizy tłuszczów powstają wolne kwasy tłuszczowe, diacyloglicerole, monoacyloglicerole, w skrajnych przypadkach również glicerol. Procesy te powodują wzrost kwasowości tłuszczu, wpływają również na powstawanie ich nieprzyjemnego smaku i zapachu. Powstałe wolne kwasy tłuszczowe są mniej odporne na utlenianie, dlatego też takie tłuszcze jeszcze szybciej ulegają jęczeniu. Rozpad tłuszczów podczas procesu hydrolizy można spowolnić poprzez stosowanie niskich temperatur (Zin 2008).

Polimeryzacja

Procesy polimeryzacji zachodzą podczas ogrzewania tłuszczów, szczególnie jeśli ogrzewanie to jest długotrwałe, kilkukrotne lub bardzo intensywne, np. w czasie smażenia oraz pieczenia. Polimeryzacja jest procesem o złożonym mechanizmie, przebiegającym z udziałem wolnych rodników. Pod wpływem podwyższonej temperatury tworzą się głównie dimery, ale również w mniejszej ilości oligomery. Produktami powstającymi w tym procesie są spolimeryzowane kwasy tłuszczowe oraz cykliczne mono-, di- i oligomery. Najbardziej podatne na proces polimeryzacji są kwasy tłuszczowe nienasycone, w przeciwieństwie do kwasów tłuszczowych nasyconych, które są bardziej stabilne. W wysokich temperaturach w miejscach wiązań podwójnych tworzą się wolne rodniki, które następnie łączą się tworząc wiązania pomiędzy cząsteczkami kwasów tłuszczowych różnych glicerydów. Tłuszcze spolimeryzowane wykazują niekorzystne działanie na organizmy żywe (Zin 2008).

Rodzaje jęczenia tłuszczów

Biorąc pod uwagę rodzaj powstających związków, procesy jęczenia tłuszczów można podzielić na pięć grup: zepsucie nadtlenkowe, hydrolityczne, ketonowe, aldehydowe oraz złojuwacenie (Stanisz i Muszalska 2009).

Zepsucie nadtlenkowe to proces, w trakcie którego zachodzi przyłączenie się atomów tlenu w miejscu nienasyconych wiązań kwasów tłuszczowych. W wyniku działania światła i tlenu z powietrza, w obecności katalizatorów, powstają liczne nadtlenki. Wskaźnikiem służącym określeniu ilości nadtlenków wytworzonych w tłuszczu jest liczba nadtlenkowa.

Zepsucie hydrolityczne polega na częściowej hydrolizie triacylogliceroli, w wyniku której powstają wolne kwasy tłuszczowe, nadające tłuszczom odczyn kwasowy. Na podstawie określenia zawartości wolnych kwasów tłuszczowych można ocenić, czy tłuszcz jest świeży. W tym celu oznacza się liczbę kwasową tłuszczu.

Zepsucie ketonowe jest charakterystyczne dla tłuszczów zawierających w cząsteczkach nasycone kwasy tłuszczowe. Po rozkładzie glicerydów na wolne kwasy tłuszczowe, kwasy te ulegają dalszemu przekształceniu w metyloketony oraz β -ketokwasy. Powstające produkty charakteryzują się intensywnym, nieprzyjemnym zapachem. Zepsucie ketonowe można wykryć za pomocą próby Taufla-Thalera.

Zepsucie aldehydowe prowadzi do przekształcenia uwolnionych kwasów tłuszczowych w aldehydy, najczęściej w epialdehydy, którego przedstawicielem jest aldehyd epihydrinowy. Podczas tego procesu tworzy się również toksyczny aldehyd malonowy. Do wykrycia tego rodzaju zmian służy wskaźnik TBA (wskazuje on obecność aldehydu malonowego), a także próba Kreisa (wskazuje na obecność aldehydu epihydrinowego).

Złojuwacenie jest procesem w którym zachodzi kondensacja i polimeryzacja nienasyconych wiązań kwasów tłuszczowych. W wyniku tych procesów podnosi się temperatura topnienia tłuszczu oraz jego średni ciężar cząsteczkowy.

Metody badania i oceny jakości tłuszczów roślinnych

Z uwagi na złożoność procesów destrukcyjnych zachodzących w tłuszczach, nie ma jednej uniwersalnej metody, która pozwoliłaby na jednoznaczną ocenę ich jakości. Opracowano wiele metod, na podstawie których można zbadać skład oraz zmiany zachodzące w tłuszczach. Wskaźnikiem określającym stopień nienasylenia tłuszczów jest liczba jodowa. Stopień hydrolizy wiązań estrowych można określić na podstawie pomiaru liczby kwasowej. Pierwotne produkty utleniania tłuszczów można ilościowo oznaczyć za pomocą liczby nadtlenkowej. Do metod pomiarowych wtórnych produktów utleniania należą: liczba anizydynowa, próba Taufila-Thalera, próba z kwasem 2-tiobarbiturowym, próba Kreisa, pomiar całkowitej zawartości związków karbonylowych. Miarą całkowitego utlenienia obejmującego pierwotne i wtórne produkty rozkładu jest wskaźnik Totox. Ponadto inne specyficzne produkty rozkładu tłuszczów mogą być oznaczane za pomocą różnych metod analizy instrumentalnej.

Liczba jodowa (LJ)

Wskaźnik ten określa zawartość związków nienasyconych w tłuszczach. Jest ona wyrażona liczbą gramów związanego chlorowca w przeliczeniu na jod. Wartość liczby jodowej podczas przechowywania tłuszczów maleje, co jest to spowodowane przyłączaniem się tlenu do nienasyconych wiązań kwasów tłuszczowych, przez co maleje liczba wolnych wiązań podwójnych, do których może być przyłączony jod. Tłuszcze roślinne charakteryzują się wysokimi liczbami jodowymi, z wyjątkiem oleju palmowego, kakaowego i kokosowego, w których przeważają nasycone kwasy tłuszczowe. Początkowo liczba ta określana była przy wykorzystaniu metody Hanuśa przy użyciu bromku jodu, natomiast obecnie zastąpiła ją metoda Wijsa, w której używa się chlorku jodu. Podstawą metody jest wysycenie podwójnych wiązań nienasyconych kwasów tłuszczowych przez chlorek jodu lub bromek jodu, związanie nadmiaru odczynnika jodkiem potasu w celu wydzielenia wolnego jodu, który następnie odmiareczkowiec się roztworem tiosiarczanu sodu w obecności skrobi (PN-EN ISO 3961:2013-10, Zin 2008).

Liczba kwasowa (LK)

Za pomocą liczby kwasowej można określić stopień zepsucia tłuszczu na skutek hydrolizy wiązań estrowych, na którą wpływ mają warunki przechowywania oraz upływający czas. W metodzie tej bada się obecność wolnych kwasów tłuszczowych występujących w tłuszczu. Zasada oznaczania polega na zobojętnianiu wolnych kwasów tłuszczowych występujących w próbce tłuszczu za pomocą alkoholowego 0,1-molowego roztworu wodorotlenku sodu lub potasu. Jako wskaźniki można stosować roztwory fenoloftaleiny, tymoloftaleiny lub błękitu alkalicznego 6B. Liczbę kwasową definiuje się jako liczbę mg wodorotlenku potasu potrzebną do zneutralizowania wolnych kwasów tłuszczowych zawartych w 1 g tłuszczu. Wysoka liczba kwasowa oznacza, że badany tłuszcz jest nieświeży i prawdopodobnie był źle przechowywany. Niska wartość liczby kwasowej, nawet sięgająca 0, świadczy o wysokiej świeżości oraz prawidłowym przechowywaniu tłuszczu. Dopuszczony stopień hydrolizy w olejach tłoczonych na zimno jest wyższy niż w przypadku olejów rafinowanych. W normie przedstawione są trzy metody oznaczania kwasowości tłuszczów: dwie miareczkowe i jedna potencjometryczna. Kwasowość wyraża się na ogół jako liczbę kwasową lub alternatywnie jako kwasowość obliczoną w sposób umowny, która jest wyrażona w procentach w przeliczeniu na kwas oleinowy. Metody opisane w normie mogą być stosowane do rafinowanych i surowych tłuszczów roślinnych oraz zwierzęcych (PN-EN ISO 660:2010, Zin 2008).

Liczba nadtlenkowa (LOO)

Liczba nadtlenkowa charakteryzuje stopień zepsucia tłuszczu spowodowany głównie tworzeniem się form nadtlenkowych, odnosi się więc do pierwotnego stopnia utleniania tłuszczu. Liczba nadtlenkowa jest miarą ilości tlenu związanego chemicznie z tłuszczem w formie nadtlenków i wyrażana jest w milirównoważnikach aktywnego tlenu na kilogram tłuszczu (mEqO_2/kg). Jej wysoka wartość świadczy o zepsuciu tłuszczu i jest to parametr dynamiczny, zmieniający się z czasem i warunkami przechowywania. Wzrost liczby nadtlenkowej i jednocześnie obniżanie się wartości

liczby jodowej świadczy o nieświeżości tłuszczu i zachodzących w nim procesach jęlczenia. Wyznaczanie liczby nadtlencowej jest jednym z najczęściej wykorzystywanych oznaczeń dotyczących określenia jakości tłuszczu podczas jego przechowywania. Zalecane maksymalne wartości różnią się w zależności od rodzaju tłuszczu, np. dla olejów rafinowanych: 5 mEqO₂/kg, olejów tłoczonych na zimno: 10 mEqO₂/kg., oliwy extra virgin: 20 mEqO₂/kg (Sikorski i Staroszczyk 2017; Kędzior 2003; Mitek i Leszczyński 2014). Najprostszą i najbardziej rozpowszechnioną metodą oznaczania liczby nadtlencowej jest miareczkowanie jodometryczne. Stosuje się ją do wszystkich zwierzęcych i roślinnych tłuszczów oraz olejów, kwasów tłuszczowych, a także ich mieszanin, wykazujących liczbę nadtlencową od 0 do 30 mEqO₂/kg. Zasada oznaczenia polega na ilościowym oznaczeniu jodu wydzielonego z jodku potasu w wyniku działania nadtlenców znajdujących się w tłuszczu. Uwolniony jod poddaje się miareczkowaniu roztworem tiosiarczenu sodu w obecności skrobi. Podczas miareczkowania wykorzystuje się roztwór jodku potasu, roztwór tiosiarczenu sodu oraz roztwór skrobi. Pewną niedogodnością jest szybkie utlenianie się jodku potasu pod wpływem światła słonecznego oraz tlenu, dlatego odczynnik ten musi być przygotowany każdorazowo przed miareczkowaniem. Metoda ta jest kosztowna, ze względu na wykorzystywane odczynniki, które są wrażliwe na utlenianie (PN-EN ISO 3960:2017-03).

Liczba anizydynowa (LAz)

Liczba ta jest miarą zawartości aldehydów, głównie aldehydów α i β -nienasyconych, będących wtórnymi produktami utleniania tłuszczów. Jest to wskaźnik bezwymiarowy, definiowany jako stukrotnie zwiększona wartość absorpcji roztworu, który przereagował z p-anizydyną (p-metoksyaniliną), zmierzona przy długości fali 350 nm w kuwecie 10 mm. Liczba anizydynowa jest liczbą bezwymiarową i jest podawana w odniesieniu do 1 g próbki w 100 ml mieszaniny rozpuszczalnika (izooktanu) i odczynnika anizydynowego, będącego roztworem p-anizydyny w lodowatym kwasie octowym. Uciążliwością związaną z przeprowadzeniem tego oznaczenia jest toksyczność i nietrwałość odczynnika anizydynowego, który wymaga przygotowania w dniu oznaczenia i unikania ekspozycji na światło. Dopuszczalna wartość LAz dla olejów i tłuszczów roślinnych wynosi 8 (Sikorski i Staroszczyk 2017, PN-EN ISO 6885:2016-04).

Próba Taufla-Thalera

Za pomocą tej próby można wykryć obecność metyloketonów powstających podczas psucia się tłuszczów. Zepsuciu ketonowemu ulegają kwasy tłuszczowe nie zawierające podwójnych wiązań. Oznaczenie polega na barwnej reakcji zachodzącej pomiędzy metyloketonami i aldehydem salicylowym, w obecności kwasu siarkowego(VI). Powstające różowo-karminowe zabarwienie wskazuje na obecność metyloketonów. Równolegle należy wykonać próbę kontrolną (Kędzior 2003).

Próba z kwasem 2-tiobarbiturowym

Próba z kwasem 2-tiobarbiturowym (TBA) jest popularną metodą wykrywania zepsucia ketonowego tłuszczów. Podczas utleniania lipidów dochodzi do degradacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co powoduje utworzenie się aldehydu malonowego (MA). Aldehyd ten daje reakcję barwną z kwasem 2-tiobarbiturowym przebiegającą z utworzeniem różowego kompleksu MA-TBA, którego maksimum absorpcji występuje przy 530 nm. Intensywność zabarwienia rośnie wraz ze wzrostem stopnia zepsucia tłuszczu. Ilość barwnego kompleksu mierzy się za pomocą spektrofotometru przy długości fali 530 nm. Negatywną stroną tego oznaczenia jest jego mała specyficzność spowodowana tworzeniem barwnych produktów w reakcji kwasu 2-tiobarbiturowego z wieloma innymi związkami, w tym innymi aldehydami oraz cukrami. Pomimo tego jest to metoda często używana do mierzenia stopnia utlenienia tłuszczów ze względu na prostotę wykonania oraz wysoką korelację uzyskiwanych wyników z wynikami oceny sensorycznej (Zin 2008; Barriuso 2013).

Próba Kreisa

Przy pomocy próby Kreisa można wykryć obecność aldehydu epihydrynowego. Aldehyd epihydrynowy powstaje w wyniku jęlczenia aldehydowego, któremu ulegają tłuszcze zawierające

liczne nienasycone kwasy tłuszczowe. W wyniku tego procesu tworzą się aldehydy, głównie aldehyd epihydrynowy, który w zjełczałym tłuszczu występuje najczęściej w formie acetalu. Zasada próby Kreisa polega na przeprowadzeniu aldehydu epihydrynowego z postaci acetalowej w stan wolny za pomocą stężonego kwasu solnego. Czysty aldehyd epihydrynowy reaguje z następnie z floroglucyną dając barwę czerwono-fioletową, lub z rezorcyną dając barwę fioletową. Intensywność wytwarzanej barwy rośnie wraz ze wzrostem zawartości aldehydu w roztworze i może być oceniana wizualnie lub oznaczana ilościowo metodą spektrofotometryczną (Zin 2008).

Pomiar całkowitej zawartości związków karbonylowych

Całkowitą zawartość związków karbonylowych można oznaczyć spektrofotometrycznie w postaci pochodnych - 2,4-dinitrofenylohydrazonów. Związki karbonylowe powstające podczas utleniania lipidów poddaje się reakcji z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (DNPH), a barwne produkty są analizowane spektrofotometrycznie. W różnych wariantach tej metody wykorzystuje się różne rozpuszczalniki, odczynniki, długości fali. Metoda ta jest mało specyficzna, ponieważ różne warunki prowadzenia badania mogą spowodować degradację wodoronadtlenków do pochodnych karbonylowych dając błędne wyniki. Dobrą korelację z innymi metodami otrzymano prowadząc oznaczenie przy zastosowaniu 1-butanolu jako rozpuszczalnika i mierząc absorbancję przy długości fali 420 nm (Endo 2003).

Wskaźnik Totox

Wskaźnik Totox jest miarą całkowitego utlenienia tłuszczów, obejmujący zarówno pierwotne i wtórne produkty utleniania. Wartość Totox jest równa sumie dwukrotnej wartości liczby nadtlenkowej oraz liczby p-anizydynowej:

$$\text{Totox} = (2 \cdot \text{LOO}) + \text{LAz}$$

Wskaźnik ten określa ilość zarówno wodoronadtlenków jak i ich produktów rozkładu, z tego względu umożliwia dobrą ocenę stopnia oksydacji tłuszczów (Sikorski i Staroszczyk 2017; Rutkowska i Żbikowska 2007; Buczek i Leśniak 2010).

Inne metody badań produktów rozkładu tłuszczów

Oprócz przedstawionych popularnych wskaźników jakości tłuszczów stosuje się wiele innych metod analizy specyficznych produktów rozkładu, przy zastosowaniu różnych metod analizy instrumentalnej. Do popularnych oznaczeń należy spektrofotometryczne oznaczanie zawartości wiązań sprzężonych dienów i trienów, przez pomiar absorbancji w zakresie odpowiednio 233 i 268 nm. Dieny sprzężone powstają w wyniku przegrupowania podwójnych wiązań w nienasyconych kwasach tłuszczowych posiadających dwa podwójne wiązania, a ich tworzenie jest charakterystyczne dla procesu oksydacji tłuszczów. Metoda spektroskopii w podczerwieni FT-IR w zakresie 700-4000 cm^{-1} umożliwia z kolei oznaczenie zawartości niekorzystnych dla zdrowia izomerów *trans*, powstających podczas wysokotemperaturowych procesów rafinacji, obróbki i użytkowania tłuszczów roślinnych. W identyfikacji i analizie ilościowej różnych wtórnych lotnych produktów destrukcji tłuszczów bardzo przydatna jest metoda chromatografii gazowej. W celu wyodrębnienia analitów z matrycy tłuszczowej stosuje się różne techniki: ekstrakcję cieczą, ekstrakcję do fazy stałej, technikę analizy fazy nadpowierzchniowej. Natomiast w analizie związków o większych masach cząsteczkowych, np. produktów polimeryzacji tłuszczów takich jak dimery i oligomery triacylogliceroli, stosuje się wysokosprawną chromatografię wykluczania (HPSEC) (Barriuso 2013, Sikorski i Staroszczyk 2017).

4. Podsumowanie

Ze względu na złożony charakter procesów destrukcyjnych zachodzących w tłuszczach, ocena ich jakości jest złożonym problemem, wymagającym stosowania różnych metod. Konsumentom powinni mieć świadomość, że ze względu na nietrwałość tłuszczów roślinnych, ich zakup

z niepewnych źródeł, gdy sposób produkcji i przechowywania jest poza kontrolą, może się wiązać z ryzykiem słabej jakości. Kontrola jakości jest niezbędnym elementem zapewnienia bezpieczeństwa stosowania w odniesieniu zarówno do olejów spożywczych jak i kosmetycznych.

5. Literatura

- Barriuso B, Astiasarán I, Ansorena D (2013) A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *Eur. Food Res. Technol.* 236: 1-15.
- Buczek B, Leśniak A (2010) Analiza właściwości i składu kwasów tłuszczowych handlowych olejów pochodzenia roślinnego, *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie*, 833: 19-30.
- Cichosz G, Czeczot A (2011) Stabilność oksydacyjna tłuszczów jadalnych – konsekwencje zdrowotne. *Bromat. Chem. Toksykol.* 44(1): 50–60.
- Endo Y, Tominaga M, Tagiri-Endo M, Kumozaki K, Kouzui H, Shiramasa H, Miyakoshi K (2003) A modified method to estimate total carbonyl compounds in frying oils using 1-butanol as a solvent. *J. Oleo Sci.* 52(7): 353-358.
- Grajek W, red. (2007) *Przeciwtłeniacze w żywności*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne. Warszawa.
- Kędzior R, red. (2003) *Badanie i ocena jakości produktów spożywczych*. Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Krakowie, Kraków 2003.
- Mitek M, Leszczyński K (2014) *Wybrane zagadnienia z technologii żywności pochodzenia roślinnego*. Wydawnictwo SGGW. Warszawa.
- PN-EN ISO 6885:2016-04. *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby anizydynowej*.
- PN-EN ISO 660:2010. *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby kwasowej i kwasowości*.
- PN-EN ISO 3960:2017-03. *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej. Jodometryczne (wizualne) oznaczanie punktu końcowego*.
- PN-EN ISO 3961:2013-10. *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby jodowej*.
- Rutkowska J, Żbikowska A (2007) Jakość wybranych olejów roślinnych dostępnych na polskim rynku. *Roczn. PZH* 58(3): 515-524.
- Sikorski E, Staroszczyk H, red. (2017) *Chemia żywności*. PWN. Warszawa.
- Stanisz B, Muszalska I, red. (2009) *Metody badania jakości surowców i produktów kosmetycznych*. Wydawnictwo Naukowe UAM. Poznań.
- Zin M, red. (2008) *Utrwalanie i przechowywanie żywności*, Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego. Rzeszów.

13. Regioselektywność metalacji wybranych pochodnych pirazolu

Regioselective metalation of selected pyrazole derivatives

Górska Agnieszka, Mańko Diana

Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Opiekun naukowy: dr hab. inż. Tomasz Kliś

Górska Agnieszka: agnieszka_gorska@sggw.pl

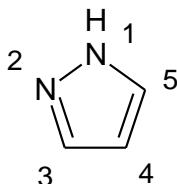
Słowa kluczowe: metalacja, pirazol, LDA, *n*-BuLi

Streszczenie

Związki organiczne, zawierające w swojej strukturze fragment pirazolowy znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach, m. in. w farmacji i przemyśle agrochemicznych. Coraz bardziej wzrasta zainteresowanie metodami syntetycznymi, analizowaniem różnych właściwości i poszukiwaniem możliwych zastosowań pochodnych pirazolu. Jednym ze sposobów funkcjonalizacji związków heterocyklicznych jest ich metalacja za pomocą organicznych związków litu połączonej z następczą reakcją z elektrofilem, w celu wprowadzenia nowej grupy funkcyjnej. Przy projektowaniu nowych związków niezbędna jest wiedza o selektywności tworzenia odpowiednich litopochodnych. Praca ta stanowi przegląd prac dotyczących selektywności metalacji pirazolu, oraz jego wybranych pochodnych: 1-metylopirazolu, benzylopirazoli oraz bis(1H-pirazoli-1-ilo)alkanów.

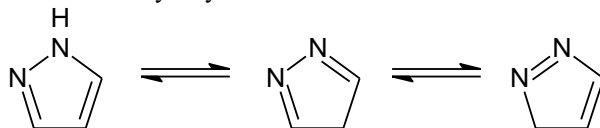
1. Wstęp

Pirazol jest organicznym heterocyklicznym związkiem o charakterze aromatycznym (Rys. 1). Składa się z pięciocłonowego pierścienia zawierającego 3 atomy węgla i dwa sąsiadujące ze sobą atomy azotu – jeden z nich (N2) jest połączony wiązaniem podwójnym z atomem węgla. Pirazol ma charakter aromatyczny, który zawdzięcza sprzężonym wiązaniom podwójnymi i sześciu zdelokalizowanym elektronom - cztery z nich to elektrony π , a pozostałe dwa pochodzą od wolnej pary elektronowej na atomie azotu -NH.



Rys. 1. Budowa niepodstawionej cząsteczki pirazolu.

Pirazol jest związkiem wykazującym tautomerię. Jego niepodstawiona cząsteczka może być reprezentowana przez trzy formy tautomeryczne (Rys. 2). Natomiast w przypadku pochodnych pirazoli, w których podstawnik znajduje się przy atomie węgla sąsiadującym z atomem azotu, możliwych jest 5 form tautomerycznych.

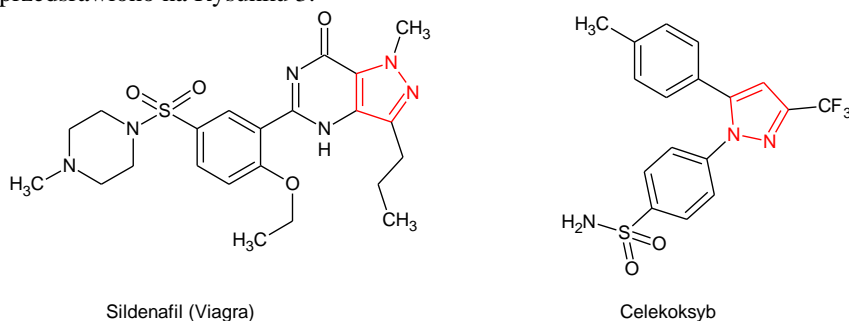


Rys. 2. Tautomeria cząsteczki pirazolu.

Fragment pirazolowy można znaleźć tylko w nielicznych związkach występujących w naturze. W dniu dzisiejszym znanych jest tylko kilka pochodnych, które zostały wyizolowane

z produktów naturalnych (Kumar i in. 2013). Pirazol otrzymuje się na drodze syntezy organicznej. Najbardziej znaną metodą jest reakcja 1,3-diketonów z pochodnymi hydrazyny.

Związki pirazolowe znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach chemii. Na przykład niektóre z nich wykazują właściwości fotochemiczne. Prowadzone są również badania nad fluorescencją kompleksów metali z pochodnymi pirazoli. Są używane jako ligandy kleszczowe typu skorpion („scorpionate ligands”) oraz ligandy do tworzenia organiczno-nieorganicznych polimerów koordynacyjnych MOF (metal-organic framework). Jednakże najciekawszym obszarem badań i zastosowania jest farmacja. Pochodne pirazolu posiadają szeroki zakres aktywności biologicznej, między innymi mają właściwości przeciwnowotworowe, antymikrobiologiczne, przeciwzapalne, antypiretyczne (obniżające temperaturę), analgetyczne, antywirusowe, przeciwjaskrowe, przeciwgruźlicze, blokowania kanałów jonowych (sodowych), antyoksydacyjne, antydepresyjne, antydiabetyczne (Samet i in. 2014). Przykładowe leki zawierające fragment pirazolowy przedstawiono na Rysunku 3.

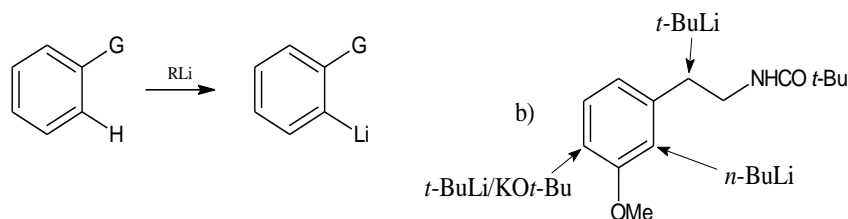


Rys. 3. Przykłady leków zawierających fragment pirazolowy.

2. Opis zagadnienia

Jedną z powszechnych metod stosowanych w syntezie organicznej jest reakcja metalacji z użyciem organicznych związków litu. W reakcji tej następuje tworzenie związków litoorganicznych, które z kolei ulegają reakcji z cząsteczką elektrofila dając nowe, podstawione produkty. Bardzo ważnym aspektem przy planowaniu syntezy jest znajomość selektywności z jaką zachodzi reakcja oraz możliwość jej kontroli. Dwie najczęściej używane metody tworzenia litopochodnych to deprotonacja oraz wymiana halogen-lit (Clayden 2002).

Pierwsza z nich – reakcja deprotonacji z utworzeniem związku litoorganicznego (wymiana wodór-lit), w związkach arylowych przebiega w pozycji *ortho* do tzw. grupy kierującej i nazywana jest reakcją *ortho*-metalacji (Rys 4). Pozwala na regioselektywne wytworzenie wielopodstawionych związków aromatycznych, często nieosiągalnych stosując klasyczne metody syntezy organicznej. W reakcji metalacji stosuje się silne zasady takie jak diizopropylamidek litu (LDA) czy *n*-butulolit (*n*-BuLi), które reagują ze względnie kwasowymi protonami pierścienia aromatycznego. W procesie wymiany H-Li następuje koordynacja użytej zasady RLi do grupy kierującej, deprotonacja i utworzenie związku arylolitowego, który może być stabilizowany przez koordynację litu do grupy kierującej. Następnie przeprowadza się reakcję z elektrofilem i hydrolizę, która prowadzi do powstania ostatecznego produktu. Gdy koordynacja litu do grupy kierującej nie jest możliwa to jedynym czynnikiem wpływającym na selektywność reakcji jest kwasowość protonów. Selektywność reakcji metalacji zależy też od użytej zasady, rozpuszczalnika i/lub obecności silnie koordynujących ligandów (TMEDA, PMDTA) lub innych dodatków takich jak KO*t*-Bu (tworzy z *n*-BuLi superzasadę). Koordynacja do grupy kierującej, lokalne efekty steryczne oraz efekty agregacyjne odgrywają ważną rolę. Czasami następuje również izomeryzacja litopochodnej do układu bardziej stabilnego (reakcja nosi nazwę „halogen-dance”), co może być wykorzystane np. w syntezie nietypowych bromo- i jodopirydyn



Rys. 4. Schemat reakcji wymiany H-Li (a), przykład kontrolowania selektywności reakcji metalacji (b).

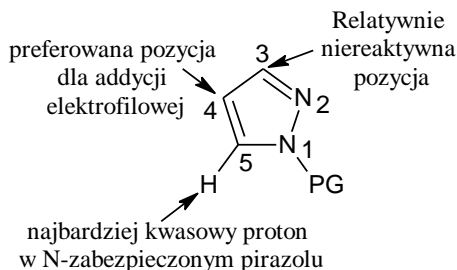
Reakcja wymiany H-Li nie może zostać wykorzystana w syntezie wielu związków. Ograniczeniem może być na przykład kinetyka samego procesu (np. proton nie jest wystarczająco kwasowy), bądź jej niewystarczająca selektywność. W takich sytuacjach najlepszą alternatywą są reakcje wymiany halogen – lit (Br-Li, I-Li). Zachodzą one bardzo szybko, tworzą niestabilny reagent litowy w niskich temperaturach, a także generują litopochodną w obecności elektrofila. Reakcje wymiany halogen – lit (X-Li) prowadzi się najczęściej przy użyciu silnych nukleofilu typu *n*-BuLi lub *t*-BuLi w rozpuszczalniku takim jak THF lub Et₂O oraz w niskiej temperaturze w celu ograniczenia reakcji sprzęgania powstającego arylo-litu z halogenkiem alkilu. Postulowane są cztery mechanizmy tej reakcji, halogenki arylowe reagują głównie według mechanizmu nukleofilowego z wytworzeniem tzw. „ate”-kompleksu (Rys. 5).



Rys. 5. Schemat reakcji wymiany halogen-lit.

3. Przegląd literatury

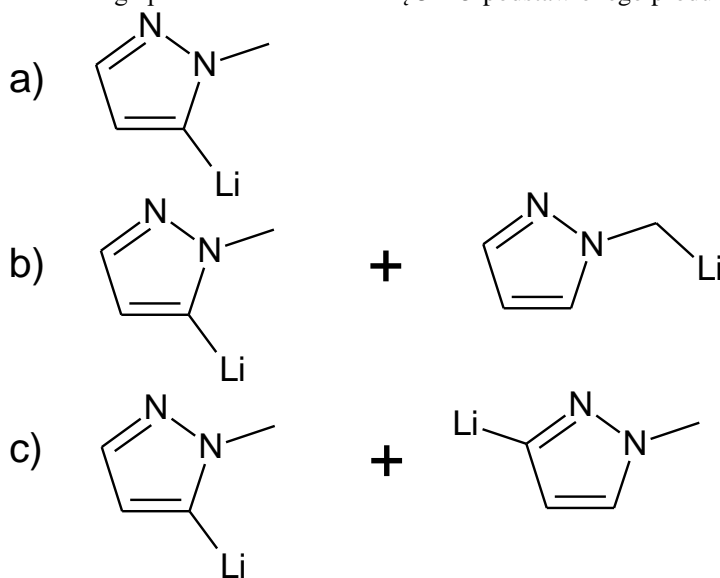
pKa niepodstawionego pirazolu wynosi odpowiednio dla N1 – 19,8 i dla C5 – 35,9. Anion na azocie może być łatwo wygenerowany przy użyciu takich zasad jak KOH, KOt-Bu lub NaH. Reakcje prowadzi się w polarnym rozpuszczalniku np. DMSO lub DMF. W większości przypadków w prosty sposób można przeprowadzić *N*-alkilowanie pirazoli z dużą wydajnością. Jednakże są pewne ograniczenia tej metody. Jeżeli do reakcji użyjemy niesymetrycznie podstawionych pirazoli to z powodu występowania zjawiska tautomerii, istnieje ryzyko otrzymania mieszaniny regioizomerów podstawionych w pozycji N1 i N2 (Roy, 2012). Istnieją również metody *N*-arylowania pirazoli (Cerrada i in. 1993).



Rys. 6. Reaktywność pierścienia pirazolu z grupą zabezpieczającą (PG) w pozycji N1.

Możliwość wprowadzenia podstawników w inne pozycje pierścienia pirazolowego jest ograniczona do związków, które mają *N*-podstawioną grupę w pierścieniu pirazolowym. Problem może stwarzać wybór odpowiedniej grupy, którą potem w łatwy sposób można byłoby odbezpieczyć (Katritzky i in. 1989). Wodór przy atomie C5 pirazolu jest najbardziej kwasowy w *N*-zabezpieczonych pirazolach. Łatwo ulega deprotonacji w reakcjach metalacji (Rys. 6). Najczęściej do reakcji używa się *n*-BuLi lub LDA w -70°C . Wymiana halogen-lit prowadzona *in situ* jest najpowszechniejszą i bezproblemową metodą syntezy 4-litopirazoli. Metalacja w pozycji C3 *N*-podstawionych pirazoli jest utrudniona ze względu na elektronegatywność spowodowaną obecnością wolnej pary elektronowej na atomie N2 (Takeuchi i in. 1978). Co więcej, halogenowanie w pozycji C3 przy niepodstawionej pozycji C4 jest mocno utrudnione – preferowana jest elektrofilowa substytucja atomu węgla C4. Jedną z metod wprowadzania podstawnika w pozycji C3 jest cyklizacja pirazolu posiadającego już docelową grupę w odpowiedniej pozycji. Często stosowanym rozwiązaniem jest reakcja Suzuki (Kristensen i in. 2010) i jej modyfikacje. Innym sposobem jest użycie SEM lub THP jako grupy zabezpieczającej dla N1, wprowadzenie podstawnika w pozycję C5, następnie po odbezpieczeniu następuje przegrupowanie (z powodu tautomerii) i otrzymuje się produkt 3-podstawiony (Gerard i in. 2006).

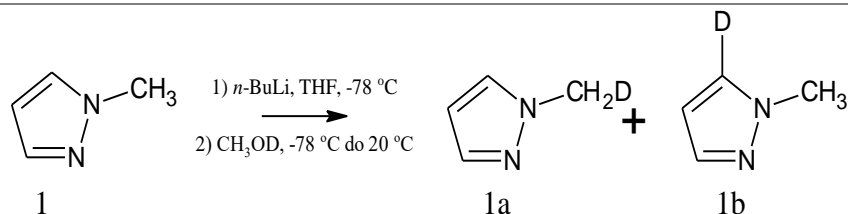
Selektywność reakcji metalacji zmienia się w przypadku podstawionych pirazoli. Jeżeli w pozycji N1 jest podstawnik alkilowy, obserwuje się również reakcję w egzocyklicznej pozycji α . Przeprowadzono badania nad regioselektywnością reakcji w przypadku 1-metylopirazolu. Ivachtchenko i in. udowodnili, że przebieg reakcji zależy od czasu, temperatury, rozpuszczalnika i elektrofila, a jako produkty otrzymuje się odpowiednio: produkt 5-podstawiony, mieszaninę α - i 5-podstawionego produktu lub mieszaninę 3- i 5-podstawionego produktu (Rys. 7).



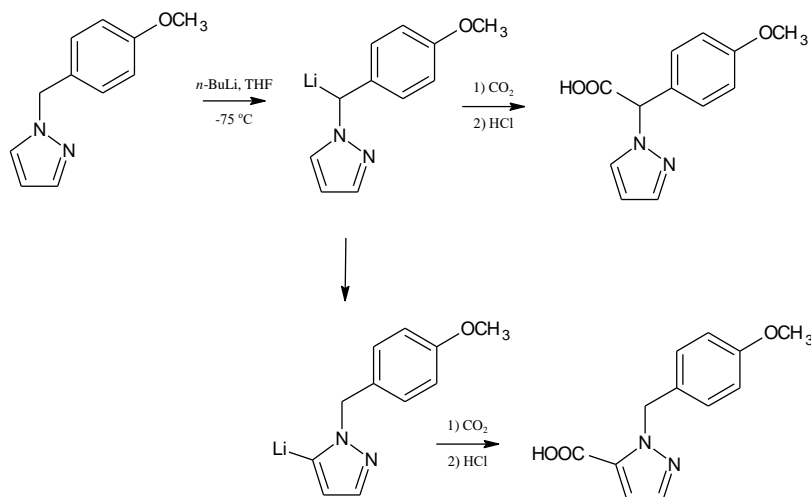
Rys. 7. 5-litopochodna (a), mieszanina 5-litopochodnej i α -litopochodnej (b), mieszanina 5-litopochodnej i 3-litopochodnej

Badania również wykazały, że selektywność reakcji 1-metylopirazolu może być kontrolowana kinetycznie lub termodynamicznie (Balle, i in.2006), dając produkt podstawiony w pozycji 5- lub w grupie metylowej (Tab. 1). Początkowo tworzy się litopochodna w pozycji α , która jest niestabilna i następuje izomeryzacja do pozycji 5.

Tabela 1. Reakcja metalacji 1-metylopirazolu, jako elektrofila użyto CH₃OD.



Czas reakcji/min.	Konwersja/%	Wydajność otrzymanych produktów/%	
		1a	1b
0,25	63	59	41
2	68	49	51
10	74	19	81
60	92	7	93



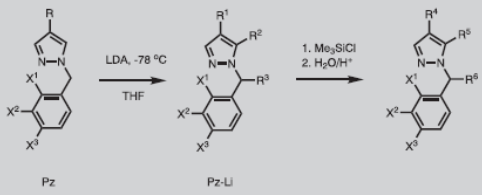
Rys. 8. Selektywność metalacji (*p*-metoksybenzyl)pirazolu.

Istnieją tylko nieliczne doniesienia odnośnie metalacji benzylopirazoli. Badane były reakcje 1-benzylopirazolu oraz (*p*-metoksybenzyl)pirazolu (Ondi i in. 2006). Metalacji ulega początkowo pozycja α , po czym następuje przegrupowanie do pozycji 5- pierścienia pirazolu (Rys. 8). Kolejną reakcją, o której warto wspomnieć jest poddanie (*p*-metoksybenzyl)pirazolu działaniu 2 moli LDA, reakcja była prowadzona *in situ* i po dodaniu jako elektrofila 2 moli chlorku trimetylosililu otrzymano dwupodstawiony produkt w pozycji α .

Prace te zostały rozszerzone na badanie selektywności metalacji 1-benzylopirazoli z atomem bromu w pozycji *orto*-, *meta*- i *para*- pierścienia benzyloвого i/lub z atomem bromu w pozycji

4- pierścienia pirazolowego (Górska i in. 2017). Dowiedziono, że pozycja atomu bromu w pierścieniu benzylovym oraz czas reakcji wpływa na selektywność powstających produktów. Potwierdzono to prowadząc reakcje metodą sekwencyjną oraz *in situ*, używając 2 lub 1 mola LDA. Jako elektrofila użyto 2 lub 1 mol chlorku trimetylosililu lub izocyjanianu *t*-butyłu.

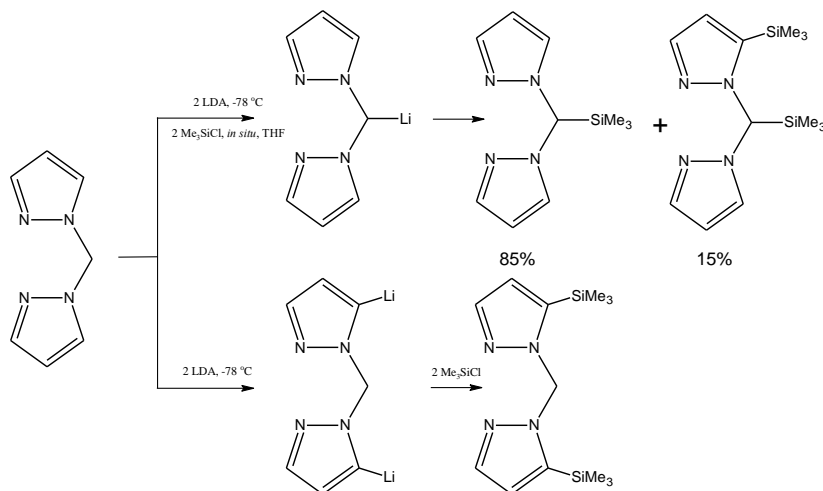
Tab. 2. Selektywność reakcji deprotonacji - silylowania 1-beznylopirazoli (Górska, 2017).



Pz	Conditions	Pz-li	Products	NMR yield (%)
1: R = X ¹ = X ² = X ³ = H	1:1	1a-li R ² = Li 1b-li	1a R ⁴ = R ⁶ = X ¹ = X ² = X ³ = H, R ⁵ = SiMe ₃ 1b R ⁴ = X ¹ = X ² = X ³ = H, R ⁵ = R ⁶ = SiMe ₃	36 7
		1c-li R ³ = Li	1c R ⁴ = R ⁵ = X ¹ = X ² = X ³ = H, R ⁶ = SiMe ₃	29
2: R = Br, X ¹ = X ² = X ³ = H	1:1	2a-li R ² = Li	2a R ⁴ = Br, X ¹ = X ² = X ³ = R ⁶ = H, R ⁵ = SiMe ₃	71
2	1:1 <i>in situ</i>	2b-li R ³ = Li	2b R ⁴ = Br, X ¹ = X ² = X ³ = R ⁵ = H, R ⁶ = SiMe ₃	55
2	1:2 (2 eq. LDA, 2 eq. Me ₃ SiCl)	2a-li 2c-li R ² = R ³ = Li	2a 2c R ⁴ = Br, X ¹ = X ² = X ³ = H, R ⁵ = R ⁶ = SiMe ₃	33 67
3: X ¹ = Br, R = X ² = X ³ = H	1:1	3-li R ³ = Li	3a X ¹ = Br, R ⁴ = R ⁵ = X ² = X ³ = H, R ⁶ = SiMe ₃	47
4: X ² = Br, R = X ¹ = X ³ = H	1:1	4-li R ³ = Li	4a X ² = Br, R ⁴ = R ⁵ = X ¹ = X ³ = H, R ⁶ = SiMe ₃	100
5: X ³ = Br, R = X ¹ = X ² = H	1:1	5-li R ³ = Li	5a X ³ = Br, R ⁴ = R ⁵ = X ¹ = X ² = H, R ⁶ = SiMe ₃	100
6: X ¹ = R = Br, X ² = X ³ = H	1:1	6a-li R ³ = Li 6b-li R ² = Li	6a R ⁴ = X ¹ = Br, X ² = X ³ = H, R ⁶ = SiMe ₃ 6b R ⁴ = X ¹ = Br, X ² = X ³ = H, R ⁵ = SiMe ₃	23 49
7: X ² = R = Br, X ¹ = X ³ = H	1:1	7a-li R ² = Li	7a R ⁴ = X ² = Br, X ¹ = X ³ = H, R ⁵ = SiMe ₃	66
8: X ³ = R = Br, X ¹ = X ² = H	1:1	8a-li R ² = Li	8a R ⁴ = X ³ = Br, X ¹ = X ² = H, R ⁵ = SiMe ₃	80

Osobną grupą związków są bis-(1H-pirazol-1-ilo)alkany. Mechanizm metalacji bis-(1H-pirazol-1-ilo)alkanów ściśle zależy od tego czy reakcja jest prowadzona *in situ* czy sekwencyjnie (Durka i in. 2014). Początkowo powstaje produkt z atomem litu w pozycji α , który następnie ulega przegrupowaniu do pozycji 5- pierścienia pirazolowego, następnie przebiega druga deprotonacja w pozycji α i kolejna izomeryzacja do pozycji 5- drugiego pierścienia pirazolowego. Kinetycznie kontrolowany produkt α -substytucji może być wydzielony kiedy reakcja prowadzona jest *in situ* i jako elektrofila użyje się chlorku trimetylosililu (Rys. 9). Przeprowadzono również reakcje metalacji bis-(1H-5-bromo-pirazol-1-ilo)metanu, bis-(1H-5-bromo-pirazol-1-ilo)etanu, bis-(1H-5-bromo-pirazol-1-ilo)propanu, bis-(1H-5-bromo-pirazol-1-ilo)oktanu otrzymując di-litopochodne podstawione w pozycji 5- pierścienia pirazolowego.

Można sterować selektywnością metalacji bis-(1H-pirazol-1-ilo)metanu i otrzymać termodynamicznie stabilną litopochodną w egzocyklicznej pozycji α (Rys. 10). W przypadku gdy bis-(1H-pirazol-1-ilo)metan ma zablokowane pozycje 5-, metalacja zachodzi wyłącznie w pozycji α - (Otero i in. 1999).



Rys. 9. Metalacja sekwencyjna i *in situ* bis(1H-pirazol-1-ilo)metanu za pomocą 2 moli LDA.

4. Podsumowanie

1-Alkilopirazole ulegają reakcji metalacji w egzocyklicznej pozycji α lub w pozycji 5- pierścienia pirazolowego. Selektywność reakcji jest zależna od czasu, temperatury, rozpuszczalnika i użytego elektrofila. 1-Benzylpirazole są początkowo deprotonowane w pozycji benzylovej, po czym również następuje izomeryzacja do termodynamicznie stabilniejszej pozycji 5-. Jednak w przypadku 1-(bromobenzyl)pirazoli pozycja atomu bromu w pierścieniu aromatycznym może zmienić selektywność reakcji metalacji na korzyść powstawania stabilnej litopochodnej w pozycji benzylovej. Bis-(1H-pirazol-1-ilo)metan reaguje podobnie jak 1-benzylpirazole. Zablockowanie pozycji 5- w pirazolu pozwala na selektywną metalację w egzocyklicznej pozycji α .

5. Literatura

- Balle T, Begtrup M, Jaroszewski JW (2006) Organic & Biomolecular Chemistry. Regioselectivity in lithiation of 1-methylpyrazole: experimental, density functional theory and multinuclear NMR study 4: 1261-1267.
- Cerrada ML, Elguero J, de la Fuente J i in. (1993) Synthesis of p -Nitrophenylazoles by Phase Transfer Catalysis Without Solvent. Synthetic Communications 23 (14): 1947-1952.
- Clayden J, Organolithiums: Selectivity for Synthesis. Tetrahedron Organic Chemistry Series, Volume 23, Pergamon, 2002.
- Durka K, Górska A, Kliś T (2014) Formation of dilithiated bis-(1H-pyrazol-1-yl)alkanes and their application in the synthesis of diboronic acids. Tetrahedron Letters 55: 1234-1238.
- Gerard AL, Bouillon A, Mahatsekeke C i in (2006) Efficient and simple synthesis of 3-aryl-1H-pyrazoles. Tetrahedron Letters 47 (27): 4665-4669.
- Górska A, Kliś T, Serwatowski J (2017) Regioselective lithiation of 1-benzylpyrazole derivatives: Synthesis of amides derived from pyrazole. Applied Organometallic Chemistry DOI: 10.1002/aoc.4027.
- Ivachtchenko AV, Kravchenko DV, Zheludeva VI i in. (2004) Synthesis of Pinacol Esters of 1-Alkyl-1H-pyrazol-5-yl- and 1-Alkyl-1H-pyrazol-4-ylboronic Acids. Journal of Heterocyclic Chemistry 41 (6): 931-939.

- Katritzky AR, Lue P, Akutagawa K (1989) Formaldehyde: A Reagent for Simultaneous Protection of Heterocyclic NH and Activation of Alternative Locations to Electrophilic Attack. Part II. A New Synthetic Method for the 5(3)-Substitution of N-Unsubstituted Pyrazoles. *Tetrahedron* 45 (13): 4253-4262.
- Kristensen JL, Puschl A, Jensen M i in. (2010) *Journal of Medicinal Chemistry*. Exploring the Neuroleptic Substituent in OctoclothePIN: Potential Ligands for Positron Emission Tomography with Subnanomolar Affinity for α_1 -Adrenoceptors 53: 7021-7034.
- Kumar V, Kaur K, Gupta GK i in. (2013) Pyrazole containing natural products: Synthetic preview and biological significance. *European Journal of Medicinal Chemistry* 69: 735-753.
- Ondi L, Schlosser M (2006) Metalated 1-(p-Methoxybenzyl)pyrazole: A Structural Chameleon. *European Journal of Organometallic Chemistry* 2417-2422.
- Otero A, Fernandez-Baeza J, Tejada J i in. (1999) Syntheses and crystal structures of lithium and niobium complexes containing a new type of monoanionic "scorpionate" ligand. *Journal of Chemical Society Dalton Transactions* 1364-5447.
- Roy S, Roy S, Gribble GW (2012) Metalation of Pyrazoles and Indazoles, *Topics in Heterocyclic Chemistry book series*, 29: 155-260.
- Samet M, Kasimogullari R, Ok S (2014) A Short Review on Pyrazole Derivatives and their Applications. *Journal of Postdoctoral Research* 2 (4): 64-72.
- Takeuchi Y, Yeh HJC, Kirk kL i in. (1978) Adjacent Lone Pair (ALP) Effects in Heteroaromatic Systems. 1. Isotope Exchange of Ring Hydrogens in Alkylimidazoles. *Journal of Organometallic Chemistry*, 43 (18): 3565-3570.

14. Porównanie zawartości wybranych składników odżywczych w tuszach typowych ofiar kotów domowych, a rekomendacje FEDIAF i AAFCO

Comparison of chosen nutrient compositions of cats' victims and FEDIAF and AAFCO recommendations

Górska Agnieszka⁽¹⁾, Anna Krajewska⁽²⁾, Mańko Diana⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

⁽²⁾Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, Wydział Nauk o Zwierzętach, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Opiekun naukowy: dr hab. inż. Tomasz Kliś

Górska Agnieszka: agnieszka_gorska@sggw.pl

Słowa kluczowe: żywienie kotów, składniki odżywcze, dieta

Streszczenie

Wiedza na temat sposobu żywienia w naturze, rodzaju konsumowanej żywności oraz jej składu dostarcza ważnych informacji na temat odpowiedniego wyboru diety, która zapewni długie życie w zdrowiu. Dotyczy to nie tylko ludzi, ale również zwierząt. Dla wielu gatunków zwierząt przeprowadzono badania jakie pokarmy wybierają i spożywają w naturze, co pozwoliło poprawić ich sposób żywienia w innych warunkach niż naturalne. W pracy przedstawiono przegląd zebranej literatury dotyczącej sposobu żywienia wolnożyjących kotów domowych oraz porównanie tych danych z rekomendacjami FEDIAF (European Pet Food Industry Federation) i AAFCO (The Association of American Feed Control Officials) - dwóch głównych organizacji zajmujących się żywieniem zwierząt domowych. Przedstawiona w tym artykule analiza może posłużyć w przyszłości do zweryfikowania i modyfikacji norm żywieniowych, u kotów karmionych karmą komercyjną lub samodzielnie przygotowaną w domu.

1. Wstęp

Koty domowe są jednymi z najbardziej popularnych zwierząt towarzyszących na całym świecie, a ich domestykacja przebiegła ok. 9000-1000 lat temu na bliskim wschodzie (Driscoll i in. 2007). Właściciele posiadający zwierzęta zobowiązani są sprostać ich potrzebom. Koty domowe wykazują specyficzne i restrykcyjne wymagania pokarmowe. Niezbędne jest ich poznanie, aby przygotować pokarm o właściwym składzie, który w pełni pokryje zapotrzebowanie na składniki odżywcze, minerały i witaminy. Najlepszą drogą do tego jest porównanie proponowanego składu pożywienia do pokarmu, którym odżywiają się wolnożyjące koty. Niniejsze opracowanie ma na celu porównanie zawartości wybranych składników pokarmowych w tuszach zwierząt, które najczęściej padają ofiarą kotów. Zestawienie to zostanie przyszerzone do zaleceń żywieniowych FEDIAF i AAFCO. Przygotowany materiał ma na celu poszerzenie wiedzy na temat żywienia kotów oraz przysłużyć się poprawie dobrostanu zwierząt.

2. Opis zagadnienia

Zdrowe żywienie jest kluczowym elementem zapewnienia dobrego stanu zdrowia przez wiele lat. Prawidłowa dieta przekłada się na profilaktykę nie tylko chorób przewodu pokarmowego, ale i chorób ogólnoustrojowych (Ceregrzyn i in. 2013). Przykładem zaburzeń i chorób spowodowanych nieprawidłowym żywieniem jest otyłość, stłuszczenie wątroby i cukrzyca (Zoran 2002).

Anatomia i fizjologia organizmu kota domowego sprawia, że przynależy on do rzędu drapieżnych. Poniżej przedstawiono główne cechy kota jako mięsożercy.

Na czaszce osadzone są duże uszy z możliwością obrotu o 180°, bardzo czułe na dźwięki. Oczy kota są duże, skierowane do przodu. Rozszerzające się źrenice umożliwiają lepsze widzenie

w słabym świetle i polowanie nocą. 30 zębów stałych odpowiada wzorowi zębowemu drapieznika - 12 zębów siecznych o powierzchni ułatwiającej odrywanie kawałków mięsa, cztery ostre kły oraz 14 zębów policzkowych o ostrych, tnących brzegach (Ceregrzyn i in. 2013). Kot nie może poruszać zuchwą na boki, więc długie przeżuwanie roślinnego pokarmu nie jest możliwe. Liczne wibrysy (włosy czuciowe) są pomocne przy polowaniu i lokalizacji miejsca zadania śmiertelnego ciosu ofierze. Łapy kota zakończone są ostrymi pazurami. Kościec jest elastyczny, co umożliwia kotu polowanie na małe i zwinne ofiary. Poza tym krótki przewód pokarmowy i brak wielu enzymów odpowiedzialnych za trawienie węglowodanów uniemożliwia pełne wykorzystywanie pokarmu roślinnego. W ślinie brak jest enzymu α -amylazy – odpowiedzialnego za pierwszy etap trawienia dużych ilości skrobi. Występują natomiast aktywne substancje odpowiedzialne za odkażanie pokarmu (Barszcz i Dzierżęcka 2010).

W żołądku występuje wyjątkowo kwaśne środowisko o wartości pH ok. 2, co umożliwia ponowne odkażenie pokarmu - niewiele patogenów jest w stanie przeżyć w takim środowisku. Żołądek jest mały, co skutkuje przyjmowaniem niewielkich i częstych posiłków. Jak u każdego drapieznika jelito cienkie jest krótkie w stosunku do długości ciała (około 0,8-1,3 m). Jest to przystosowanie do trawienia określonego rodzaju pokarmu - utrudnione jest trawienie węglowodanów (Sawosz-Chwalibóg 2012). W jelicie grubym bytuje specyficzna flora bakteryjna, która przyczynia się do fermentacji niestrawionych do tej pory składników pokarmowych. Flora bakteryjna jelit jest dość uboga, natomiast gatunki bakterii i grzybów, w niej występujące powinny być zachowane w równowadze, aby proces trawienia przebiegał bez problemów. Koty zazwyczaj trzymają się jednego terytorium, na którym bytują określone gatunki ptaków i gryzoni, więc również ich pokarm raczej należy do monotonnych (Sawosz-Chwalibóg 2012). Szybkie i częste zmiany pokarmu mogą spowodować problemy z zachowaniem równowagi wśród mikroorganizmów przewodu pokarmowego, a w konsekwencji biegunki i zaburzenia wchłaniania (Barszcz i Dzierżęcka 2010).

W organizmie kota nie są produkowane niektóre enzymy (wcale lub na wystarczającym poziomie), które umożliwiają syntezę lub odzyskiwanie substancji biologicznie czynnych z dostępnych składników, dlatego gotowe produkty muszą być dostarczane z pokarmem. Przykładem jest tauryna - z powodu niskiej aktywności dwóch kluczowych enzymów (dioksygenazy cysteinowej i dekarboksylazy kwasu cysteinosulfonowego) dla syntezy tauryny endogenna jej produkcja jest ograniczona. Tauryna jest niezwykle ważnym aminokwasem dla kotów, biorącym udział w funkcjonowaniu wielu narządów i jej niedobór może zaburzać metabolizm organizmu i prowadzić do poważnych wielonarządowych chorób. (Kulasek G i in. 2004).

Przykładem innego aminokwasu egzogenego (takiego, który trzeba dostarczać z pokarmem) jest arginina - kot nie ma zdolności jej syntezy z powodu ograniczonej aktywności enzymów w jelitach biorących udział w reakcji syntezy cytruliny (syntaza pirolino-5karboksylatu, aminotranferaza ornityny).

Z powodu wysokiej aktywności karboksylazy pikolinowej, która przekształca tryptofan w kwas glutaminowy, niemożliwe jest uzyskanie niacyny (wit. B3) z tryptofanu. Ponadto podaż tryptofanu bywa niska - występuje on w ograniczonej ilości w kolagenie - jednym z najczęściej występujących białek w tuszy zwierząt. Kolejnym składnikiem, który musi być dostarczany z pokarmem jest retinol (wit. A). Z powodu braku dioksygenazy karotenowej niemożliwe jest przekształcenie karotenoidów w retinol. Koty nie mają zdolności do efektywnej syntezy kwasu arachidonowego z kwasu linolowego z powodu niskiej aktywności enzymów katalizujących ten proces - Δ -6-desaturazy i Δ -8-desaturazy. Natomiast synteza cholekalcyferolu (wit. D3) jest ograniczana przez wysoką aktywność reduktazy 7-dehydrocholesterolu, enzymu który limituje dostępność prekursora dla witamin z grupy D (Zoran 2002).

Pomimo tych braków koty w swoim metabolizmie wykazują wiele przystosowań, które ułatwiają im funkcjonowanie. Brak amylazy ślinowej, niska aktywność amylazy trzustkowej i jelitowej oraz ograniczenie w syntezie enzymów wątrobowych biorących udział w metabolizmie cukrów prostych (glukokinaza wątrobowa, fruktokinaza wątrobowa) oraz brak funkcjonującego na języku receptora Tas1R2, odpowiadającego za odczuwanie słodkiego smaku są rekompensowane przez adaptacje do pozyskiwania energii z innych składników - białek i tłuszczu (Zoran 2002).

Głównym celem wyboru pokarmu przez kota jest pokrycie zapotrzebowania na energię. Po przekroczeniu zapotrzebowania na energię koty interesują się pokarmem raczej kierując się instynktem (polowanie) niż głodem (Ceregrzyn i in. 2013).

Poza węglowodanami energia może być produkowana w procesie glukoneogenezy z aminokwasów glukogennych (np. glicyna, alanina, arginina, asparagina, cysteina) dostarczonych z białkiem. Białka dostarczają do 50% energii w diecie kota. Tłuszcze są najlepszym źródłem energii w diecie, ze względu na większą gęstość kaloryczną od pozostałych związków (białek i węglowodanów) - 1g tłuszczu dostarcza więcej energii, niż 1g białka czy 1g cukrów, a mechanizm produkowania energii z tłuszczu jest również prostszy, niż z pozostałych związków (Ceregrzyn i in. 2013).

3. Przegląd literatury

To jakie zwierzęta padają ofiarą kotów w naturze zależy od regionu i występowania oraz dostępności danego gatunku. Przeprowadzono szereg badań w różnych regionach świata i opisano zwyczaje żywieniowe kotów. Biró i in. (2005) opisał procentowy udział poszczególnych ofiar w diecie kotów na terenie Węgier. Składa się na niego niemal 50% nornic, 20% myszy oraz inne drobne ssaki i ptaki. Inne prace opisują podobne preferencje żywieniowe. Plantinga i in. (2011) zebrali dane dotyczące ofiar kotów w naturze oraz ich procentowego udziału w diecie z 27 wyselekcjonowanych publikacji. Wynika z nich, że koty konsumują głównie małe ssaki (78%), ptaki (16%), gady/płazy (3,7%) oraz bęzkęgowce (1,2%). Ryby stanowią jedynie ok. 0,3% diety kotów. Głównymi konsumowanymi ssakami są króliki i szczury, choć istnieją znaczne różnice między poszczególnymi pracami. Na przykład u kotów mieszkających na wyspach zauważono duży udział ptaków w diecie (nawet ponad 80%), co jest spowodowane dużą ilością gniazd ptaków morskich na wybrzeżach (Hewson-Hughes i in. 2011). Malo i in. (2004) zauważył z kolei, że dziki kot (*Felis silvestris*) preferuje w diecie króliki, lecz gdy jest ich niewiele na obszarze, na którym żyje, jest w stanie z łatwością zmienić cel polowania na drobne gryzonie.

Koty polują na małe zwierzęta i przeważnie spożywają je w całości. Istnieje kilka metod, które pozwalają ustalić rodzaj zjedzonej przez kota ofiary oraz udział procentowy w diecie danego typu zwierzęcia. Takimi metodami są analiza składu zawartości jelit, analiza składu zawartości żołądka oraz analiza składu kału. Najwięcej danych zawiera artykuł przeglądowy, który zestawia dane zebrane z 6666 próbek z różnych kontynentów analizowanych powyższymi metodami (Plantinga i in. 2011). Zwierzęta padające ofiarą kotów zostały zgrupowane w kilka klas: szczury, myszy, nornice, inne gryzonie, owadożercy, króliki, inne małe ssaki, ptaki oraz gady i płazy (Tab.1). Analiza składu poszczególnych klas pochodzi ze źródeł literaturowych, które zawierają dane dla wolnożyjących zwierząt, którymi żywią się koty. Jedynie dane dla szurów pochodzą od zwierząt hodowlanych, co może tłumaczyć ich wysoką zawartość tłuszczu (inna aktywność fizyczna, dostępność pokarmu, rodzaj pokarmu).

Zmieszczone dane wyraźnie wskazują, że kot jest ścisłym mięsożercą. Wyliczone zapotrzebowanie energetyczne zaspokaja w 52% z białka, w 46% z tłuszczu i jedynie w 2% z pozostałych składników pożywienia. Analiza składu pożywienia kotów w naturze również uzasadnia niemal wszystkie rodzaje adaptacji metabolicznych związanych z trawieniem węglowodanów. Ewolucyjnie kot nie jest przystosowany do efektywnego wykorzystania węglowodanów, ponieważ w jego diecie prawie nie występują. Może to prowadzić do wniosku, że karmienie kotów jedną z wysokowęglowodanowych karm komercyjnych może być dużym wyzwaniem dla ich metabolizmu i prowadzić do negatywnego wpływu na zdrowie. Ilość węglowodanów nie jest ściśle określona w podanych wynikach i zawiera się w pozycji „pozostałe”, która zawiera m. in. cukry, skrobie, mono- i disacharydy, włókno, ale również rozpuszczalne w wodzie witaminy. Tkanki zwierzęce zawierają niewielkie ilości glukozy, glikogenu, glikoprotein, glikopeptydów i pentozy, ale nie zawierają skrobi. Jednak kot konsumuje całą ofiarę wraz z żołądkiem, w którego treści mogą znajdować się pewne niewielkie ilości skrobi, co może tłumaczyć dlaczego koty zachowały pewne ograniczone zdolności do jej trawienia. Według Livingstona (1914) masa treści żołądkowej u królika wynosi 10%, a wyliczona zawartość skrobi znajdującym się w niej wynosi 3g u królika o masie 1,5kg, co daje 0,2% masy ciała.

Tab. 1. Analiza składu tuszy zwierząt, które najczęściej padają ofiarą kotów.

Rodzaj tuszy	Zawartość w suchej masie [%]				
	Wilgotność [%]	Białko	Tłuszcz	Popiół	Pozostałe
Szczur	66,6	60,1	30,5	9,4	0,0
Mysz	66,9	59,1	24,5	11,3	5,1
Nornica	68,9	64,5	17,2	12,7	5,6
Inne gryzonie	68,9	65,5	22,1	12,4	0,0
Owadożercy	68,8	61,6	19,0	14,9	4,5
Królik	73,9	63,9	22,3	12,5	1,3
Inne ssaki	65,8	55,6	31,0	13,4	0,0
Ptaki	66,4	64,6	15,9	10,6	8,9
Gady/Plazy	75,2	65,7	9,0	15,2	10,1
Ryby	74,5	69,1	24,1	6,8	0,0
Bezkęgowce	65,3	62,3	20,0	4,8	12,9

Tab. 2. Analiza składu tuszy zwierząt padających ofiarą kotów w północnej i środkowej Kalifornii.

Rodzaj tuszy	Zawartość w suchej masie [%]					
	Wilgotność [%]	Białko	Tłuszcz	Popiół	Pozostałe	Tauryna
Mysz	67,67	62,78	11,54	13,31	10,04	1,19
Nornica	66,44	66,00	9,96	16,39	10,56	0,87
N. szczur*	71,41	63,88	8,76	14,46	10,22	0,42
Ś. Szczur*	69,16	62,43	8,83	13,60	9,99	0,57
Kret	67,18	65,31	9,89	20,34	10,45	1,04
Susel	67,79	50,91	21,65	15,19	8,14	0,52
Zięba	65,24	62,27	9,39	14,98	10,12	1,17
Gajówka	62,36	63,34	12,48	10,01	10,13	1,29

* N. szczur – szczur norweski, Ś. szczur – szczur śniady

Nieco odmienne wyniki (Tab.2) zaprezentował w swojej pracy Kremen i in. (2014). Zamieścił on analizę składu zwierząt padających ofiarą kotów w północnej i środkowej Kalifornii. W jego pracy znajdują się pierwsze dane dotyczące składu wolnożyjących szczurów, których brakowało w artykule przeglądowym Plantingi i in. (2014). Dodatkowo w pracy znajdują się obliczone wartości zawartości poszczególnych aminokwasów w tuszach badanych zwierząt, w tym m. in. zawartość tauryny (podanej jako przykład w Tab.2) – jednego z egzogennych aminokwasów dla kotów. Zawartość tłuszczu w tuszach w tych badaniach jest o wiele niższa niż we wcześniejszych pracach. Mogą na to wpływać zmiany sezonowe - przykładem są badania dotyczące różnicy składu ciała szczura w zależności od pory roku opisane przez Stewarta i Barnetta (1983). Innym czynnikiem wpływającym na skład jest wiek zwierzęcia. Wraz ze wzrostem skład procentowy ciała ulega zmianom - badania takie zostały przeprowadzone dla myszy, szczurów, królików, przepiórek i kurczaków (Kerr i in. 2014). Wraz z wiekiem zwierzęcia zmienia się również zawartość procentowa poszczególnych aminokwasów, w tym egzogennych dla kota (Kerr 2012). Innymi czynnikami warunkującymi skład są m. in. lokalizacja geograficzna, klimat, płeć, rodzaj spożywanego pokarmu, genetyka i inne. Dodatkowo skład zwierząt hodowlanych różni się znacząco od zwierząt wolnożyjących (Kerr i in.2014), co jest spowodowane aktywnością fizyczną oraz dostępem do pożywienia. Przykładem jest większa zawartość popiołu u zwierząt wolnożyjących – jedną z hipotez może być zwiększenie gęstości kości spowodowane większą aktywnością fizyczną tych zwierząt.

Pierwsze regulacje dotyczące karm komercyjnych dla zwierząt zostały ustanowione w 1958 r. – to tylko nieco ponad pół wieku doświadczeń, podczas których odnotowano kilka szokujących przypadków wycofywania karm z rynku z powodu nieprawidłowego składu lub skażenia produktów. Przykładowo w 1987 r. wycofano olbrzymią ilość karm z powodu śmierci tysięcy zwierząt

spowodowanych niedoborem tauryny w komercyjnych karmach. Dodatkowo testy suchych i mokrych karm – próby żywieniowe – trwają jedynie 6 miesięcy i nie są wystarczające, aby mieć pewność, że zapewnimy długotrwałe zdrowie naszych zwierząt. Dlatego też stosowanie się do zaleceń żywieniowych jest ważne, w celu zachowania dobrostanu zwierząt.

Tab. 3. Porównanie rekomendacji FEDIAF, AAFCO oraz wartości dla typowych ofiar, które koty spożywają w naturze.

[%]	FEDIAF	AAFCO	Zawartość w tuszach
Wilgotność	-	-	65,8-73,9
Białko	25	26	55,6-65,5
Tłuszcz	9	9	15,9-31,0
Popiół	-	-	9,4-14,9
Tauryna*	0,1	0,1	0,92***
Tauryna**	0,2	0,2	

* minimalna zawartość tauryny w suchej karmie

** minimalna zawartość tauryny w mokrej karmie

*** średnia wartość dla tuszek z rejonu Kalifornii (Kremen i in. 2014)

Dwie międzynarodowe organizacje zajmujące się obecnie żywieniem zwierząt towarzyszących ustaliły wymagane minima (lub maksima) zawartości składników odżywczych, witamin i minerałów, które są wytycznymi dla firm produkujących komercyjną karmę dla psów i kotów. Jeżeli te zalecenia nie będą przestrzegane, karma spowoduje kliniczne objawy wielu chorób będących efektem złego zbilansowania pożywienia. W Europie przewodnik został stworzony przez FEDIAF (2013), a w Stanach Zjednoczonych przez AAFCO (2014). Jak te wartości mają się do zaprezentowanego składu pożywienia, które koty konsumują w naturze? Powyższe wyniki (Tab.3) zestawiają rekomendacje obydwu organizacji oraz wartości dla małych ssaków i ptaków, które stanowią główne pożywienie kotów. Jako że gady, płazy, ryby i bezkręgowce stanowią znikomy udział w diecie kotów, dane dla nich zostały pominięte. Zarówno FEDIAF jak i AAFCO nie podają minimalnej zawartości wody, która powinna znajdować się w karmach, pomimo że wilgotność pokarmu znacząco wpływa na podaż wody u kotów. Koty spożywające suchą karmę konsumują ok. połowy ilości wody w porównaniu do kotów karmionych mokrą karmą (Zoran 2002). FEDIAF i AAFCO nie podaje również normy dla zawartości popiołu. Ustalona minimalna ilość białka, tłuszczu oraz tauryny jest niemal dwa razy niższa dla białka i tłuszczu i kilkukrotnie niższa dla tauryny. FEDIAF i AAFCO podają dwie minimalne wartości dla zawartości tauryny w karmie komercyjnej – wartość dla karmy suchej oraz karmy mokrej. Te różnice można łatwo wytłumaczyć. Puszki są sterylizowane przez długotrwałe autoklawowanie w wysokich temperaturach i w trakcie tego procesu powstają produkty reakcji Maillarda (Kim i in. 1996). Stymulują one rozwój bakterii, które powodują szybszy rozkład tauryny w przewodzie pokarmowym i zwiększają ilość tauryny wydalanej z kałem. Zwiększony rozkład w przewodzie pokarmowym powoduje mniejszą wchłanianiałość tauryny i zmniejszenie dostępnej puli tauryny w organizmie. Aminokwasy związane z produktami reakcji Maillarda są trudniej dostępne dla enzymów i ich absorpcja jest trudniejsza. Proces ekstruzji (sucha karma) również powoduje zmniejszenie biodostępności, ale w znacznie mniejszym stopniu.

Równie istotna jest zawartość minerałów w pożywieniu zarówno u ludzi jak i zwierząt. Poniżej (Tab.4) zaprezentowane jest zestawienie zawartości wybranych minerałów w typowych kocich ofiarach (Plantinga i in. 2011). Niektóre z wartości niewiele się różnią u różnych zwierząt (np. Mg), inne wykazują duże odchylenia (np. Fe).

Porównanie zawartości minerałów w tuszach oraz rekomendacji FEDIAF i AAFCO znajduje się w Tabeli 5. Ponownie nie uwzględniono danych dla płazów, gadów i bezkręgowców. Niemał wszystkie wartości ustalone jako minimum dla karm komercyjnych są niższe niż w tuszach zwierząt.

Niestety literatura nie zawiera badań dotyczących strawności i biodostępności poszczególnych składników odżywczych w diecie kotów składającej się z tusz. Sprawia to, że porównanie wartości rekomendowanych z typowymi wartościami drobnej zwierzyny, na którą polują koty staje się trudniejsze. Jedyne dane dotyczące strawności całych tuszek możemy znaleźć dla dzikich krewnych kota domowego – ocelotów i rysiów. W badaniach dotyczących ocelotów strawność białek i tłuszczu wyniosła odpowiednio 85-91% i 96-99% (Bennett i in. 2010), a w badaniach rysiów 82,0% i 92,3% (Powers i in.). Jeszcze trudniejsza jest ocena biodostępności mikroelementów, w literaturze nie ma badań na ten temat dla kota domowego, ani pokrewnych gatunków. Plantinga i in. (2011) sugeruje, że ich absorpcja z ciał ofiar jest niższa niż w suplementowanych karmach komercyjnych.

Tab. 4. Zawartość minerałów w tuszach zwierząt, które najczęściej padają ofiarą kotów.

Rodzaj tuszy	Zawartość [g/100g suchej masy]					Zawartość [mg/100g suchej masy]		
	Ca	P	Na	K	Mg	Fe	Cu	Zn
Szczur	2,6	1,5	0,50	1,03	0,11	18,1	0,78	7,3
Mysz	2,9	1,7	0,35	1,00	0,11	23,8	0,74	12,2
Nornica	2,9	2,7	0,43	1,20	0,04	33,2	1,37	10,6
Inne gryzonie	3,5	1,9	0,83	1,07	0,14	25,3	0,87	10,2
Owadożercy	3,4	1,7	0,42	1,05	0,14	50,0	1,18	12,0
Królik	2,4	1,7	0,54	0,94	0,16	30,2	1,60	8,6
Inne ssaki	2,8	1,8	0,50	1,00	0,13	30,2	1,18	9,8
Ptaki	3,0	2,1	0,38	0,66	0,10	49,6	1,26	11,5
Gady/Plazy	3,8	2,6	0,50	0,95	0,15	17,9	12,23	19,7
Bezkęgowce	0,1	1,0	0,51	1,33	0,10	7,8	2,21	25,7

Tab. 5. Porównanie zawartości minerałów w typowych ofiarach kotów oraz rekomendacji FEDIAF i AAFCO.

	FEDIAF	AAFCO	Zawartość w tuszach
Ca [g]	0,59	0,6	2,4-3,0
P [g]	0,50	0,5	1,5-2,7
Na [g]	0,08	0,2	0,35-0,54
K [g]	0,6	0,6	0,66-1,20
Mg [g]	0,04	0,04	0,04-0,16
Fe [mg]	8,00	8,0	18,1-49,6
Cu [mg]	0,50	0,5	0,74-1,37
Zn [mg]	7,50	7,5	7,3-12,2

4. Podsumowanie

W celu zapewnienia odpowiedniego odżywiania i zdrowia międzynarodowe organizacje ustaliły kryteria, które muszą spełniać karmy, aby u kota nie pojawiły się problemy zdrowotne. Przy porównaniu składu pokarmu spożywanego przez koty w naturze, do którego zostały one ewolucyjnie przystosowane oraz zaleceń FEDIAF i AAFCO widać duże rozbieżności. Ustalone wartości minimalne są nawet kilkukrotnie niższe niż u kocię ofiar. Wynika z tego, że potrzebne są dalsze prace nad ustaleniem składu optymalnej diety kotów oraz badania strawności i biodostępności różnych rodzajów pożywienia. Ponadto w przypadku suchych i mokrych karm dostępnych na rynku, należy mieć na uwadze, że testy karm komercyjnych trwają jedynie 6 miesięcy, które nie są wystarczające, aby mieć pewność, że zapewnimy długotrwałe zdrowie zwierząt domowych. Dodatkowo badania nad optymalnym składem karmy są potrzebne z powodu coraz bardziej popularnego sposobu żywienia kotów jakim jest samodzielne przygotowywanie pokarmu w domu.

Ten model ma imitować pokarm kotów pozyskiwany z natury, co wydaje się słusznym kierunkiem, jako że kot domowy przetrwał wieki polując i jedząc małe zwierzęta. Niewątpliwie najbardziej zbliżonym sposobem żywienia do naturalnego, jest podawanie kotom komercyjnie dostępnych całych tuszek gryzoni takich jak myszy, czy szczury oraz drobnych ptaków takich jak przepiórki czy jednodniowe kurczęta. Dane dotyczące składu tych zwierząt są dostępne w literaturze (Dierenfeld i in. 2002) i pozwalają zweryfikować zgodność składu z pokarmem kotów pozyskiwanym w naturze.

5. Literatura

- [AAFCO] Association of American Feed Control Officials (2014) Official publication.
- Barszcz K, Dzierżęcka M (2010) Osobliwości anatomiczne kota domowego (*Felis silvestris f. catus*) - na wybranych przykładach. Kosmos - problemy nauk biologicznych 59(1-2): 15-131.
- Bennett CL, Booth-Binczik SD, Steele SRE (2010) Nutritional composition and digestibility by ocelots (*Leopardus pardalis*) of whole animals and a commercial diet. Zoo Biology 29: 753–759.
- Biró Zs, Lanszki L, Szemethy L i in. (2005) Feeding habits of feral domestic cats (*Felis catus*), wild cats (*Felis silvestris*) and their hybrids: trophic niche overlap among cat groups in Hungary. Journal of Zoology 266: 187-196,
- Ceregrzyn M, Lechowski R, Barszczewska B (2013) Podstawy Żywienia Psów i Kotów. Elsevier Urban & Partner, 2013.
- Dierenfeld ES, Alcorn HL, Jacobsen KL (2002) Nutrient composition of whole vertebrate prey (excluding fish) fed in zoos. In AZA Nutrition Advisory Group Fact Sheet: A Review, pp. 1–20. Silver Spring, MD: American Zoo and Aquarium Association.
- Driscoll CA, Menotti-Raymond M, Roca AL i in. (2007) The Near Eastern origin of cat domestication. Science 317: 519–523.
- FEDIAF (2013). European Pet Food Industry (FEDIAF) Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs.
- Hewson-Hughes AK, Miller AT, Hall SR i in. (2011) Geometric analysis of macronutrient selection in the adult domestic cat, *Felis catus*.. Journal of Experimental Biology 214: 1039–1051.
- Kerr KR (2012) Nutritional Evaluation of Raw Meat and Whole Prey Diets for Domestic and Exotic Cats. Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Nutritional Sciences in the Graduate College of the University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Kerr KR, Kappen KL, Garner LM i in. (2014) Commercially Available Avian and Mammalian Whole Prey Diet Items Targeted for Consumption by Managed Exotic and Domestic Pet Felines: Macronutrient, Mineral, and Long-Chain Fatty Acid Composition. Zoo Biology 33: 327–335.
- Kim SW, Rogers QR, Morris JG (1996) Maillard reaction products in purified diets induce taurine depletion in cats which is reversed by antibiotics. Journal of Nutrition 126: 195–201.
- Livingston AE (1914) The relation of the gastro-intestinal tract and contents to the body weight in rabbits. The Journal of Experimental Medicine 19: 339–344.
- Malo AF, Lozano J, Huertas DL i in. (2004) A change of diet from rodents to rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Is the wildcat (*Felis silvestris*) a specialist predator?. Journal of Zoology 263: 401-407.
- Plantinga EA, Bosch G, Hendriks WH (2011) Estimation of the dietary nutrient profile of free-roaming feral cats: possible implications for nutrition of domestic cats. British Journal of Nutrition 106: S35-S48.
- Powers JG, Mautz WW, Pekins PJ (1989) Nutrient and energy assimilation of prey by bobcats. The Journal of Wildlife Management 53: 1004–1008.
- Sawosz-Chwalibóg E, Kosieradzka I (2012) Żywienie dzikich zwierząt Ssaki, Wydawnictwo SGGW, 2012.
- Stewart AP, Barnett SA (1983) Seasonal Changes in Body Weight and Composition of Australian Bush Rats, *Rattus fuscipes*, and Adaptation to Winter. Australian Journal of Zoology 31: 29-37.
- Zoran DL (2002) The carnivore connection to nutrition in cats. JAVMA 221(11): 1559-1567.

15. Biotechnologiczne zastosowanie egzopolisacharydów bakteryjnych

Biotechnological applications of bacterial exopolysaccharides

Kopycińska Magdalena, Lipa Paulina, Kozieł Marta

Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii,

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Monika Janczarek, prof. nadzw.

Kopycińska Magdalena: makopycinska@gmail.com

Słowa kluczowe: egzopolisacharydy bakteryjne, biotechnologia, przemysł

Streszczenie

Bakterie są organizmami zdolnymi do syntezy różnorodnych biopolimerów, w tym polisacharydów. Niektóre z nich, zwane egzopolisacharydami (EPS), są wydzielane przez mikroorganizmy do środowiska zewnętrznego. EPS może spełniać różnorodne biologiczne funkcje, jednakże podstawową rolą tego biopolimeru jest ochrona mikroorganizmu przed szkodliwym działaniem czynników środowiskowych gdyż tworzy on swoistą barierę pomiędzy komórką a jej środowiskiem zewnętrznym. W zależności od rodzaju bakterii, która go syntetyzuje, posiada on odmienną strukturę, skład chemiczny oraz właściwości. Do najbardziej znaczących egzopolisacharydów bakteryjnych wykorzystywanych w przemyśle należą m.in. gellan i alginian, ksantan, hialuronian, bursztynoglikan, a także glukany takie jak dekstran, celuloza i kurdlan. Ze względu na tak duże zainteresowanie tymi substancjami wciąż poszukuje się nowych egzopolisacharydów posiadających właściwości umożliwiające ich biotechnologiczne zastosowanie, jak również wprowadza się modyfikacje do biopolimerów już istniejących.

1. Wprowadzenie

Egzopolisacharydy: charakterystyka i rola biologiczna

Po raz pierwszy termin egzopolisacharyd (EPS) został użyty przez Sutherlanda (Sutherland 1972) do opisania wielocukrów o dużej masie cząsteczkowej produkowanych przez bakterie morskie. Egzopolisacharydy są to wysokocząsteczkowe polimery złożone z reszt cukrowych, które są wydzielane przez mikroorganizmy do otaczającego je środowiska zewnętrznego. Zdolność do produkcji EPS odnotowano u wielu drobnoustrojów, w tym u licznych gatunków bakterii, zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, archeonów, grzybów oraz niektórych alg. Egzopolisacharydy mogą występować w dwóch formach: ściśle związanej z komórką, tworząc otoczkę, albo w formie rozproszonego śluzu niezwiązanego z żadnym elementem komórki. Polisacharydy te uczestniczą w ochronie komórek przed niekorzystnymi warunkami środowiska, a także umożliwiają ich adhezję do powierzchni stałych. EPSy stanowią istotny składnik polimerów zewnątrzkomórkowych otaczających większość komórek bakteryjnych bytujących w środowiskach ekstremalnych, takich jak ekosystemy Antarktydy, słone jeziora, źródła geotermalne czy kominy hydrotermalne w dnie basenów oceanicznych. Biosynteza EPS jest jedną z najbardziej powszechnych strategii adaptacyjnych, które umożliwiają ekstremofilom skompensować negatywny wpływ skrajnych warunków środowiskowych (wysokie temperatury oraz zasolenie, niskie wartości pH czy silne promieniowanie). Ponadto, w swoim środowisku naturalnym większość bakterii występuje w formie agregatów, tworząc biofilm, którego strukturalna oraz funkcjonalna integralność opiera się w głównej mierze na macierzy zewnątrzkomórkowej złożonej z substancji o charakterze polimerów (Wingender i in. 1999). Uważa się, że EPS produkowany przez bakterie stanowi kluczowy składnik tej macierzy i pełni ważną rolę w funkcjonowaniu biofilmu (Tab. 1). Co ciekawe, odkryto również, że w populacji mikroorganizmów bytujących w lodzie morskim, EPS posiada właściwości krioprotekcyjne (Junge i in. 2004).

Wzrost zainteresowania naturalnymi polimerami spowodował, że w ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w odkrywaniu oraz wytwarzaniu nowych egzopolisacharydów bakteryjnych, posiadających innowacyjne znaczenie przemysłowe (Nicolaus i in. 2010). Dla ogromnej liczby tych

polimerów określona została biosynteza, struktura i skład chemiczny oraz wynikające z tego właściwości fizykochemiczne, które determinują możliwe zastosowanie tych biopolimerów w przemyśle.

Tab. 1. Funkcja polimerów zewnątrzkomórkowych w biofilmie (na podstawie Nwodo i in. 2012)

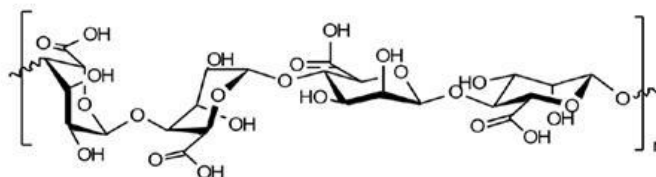
Proces	Przypisywana funkcja
Adhezja	Egzopolisacharydy stanowią zaopatrzenie w początkowych etapach tworzenia biofilmu – kolonizacji powierzchni biotycznych i abiotycznych
Agregacja komórek bakteryjnych	Umożliwiają tworzenie mostków pomiędzy bakteriami i agregowanie ich w jedną populację, co ułatwia rozpoznanie pomiędzy poszczególnymi komórkami
Zatrzymywanie wody	EPSy hydrofilowe posiadają wysoką zdolność retencyjną wody, co umożliwia wytworzenie uwodnionego środowiska otaczającego biofilm oraz zapewnia przetrwanie bakterii w warunkach deficytu wody
Kohezja biofilmu	Formy EPSów obdarzone ładunkiem tworzą sieć uwodnionych polimerów (macierz biofilmu), pośrednicząc tym samym w mechanicznej stabilności biofilmu (często połączone z kationami wielowartościowymi), determinując strukturę biofilmu oraz pozwalając na komunikację pomiędzy bakteriami
Źródło składników odżywczych	Egzopolisacharydy stanowią źródło węgla, azotu i fosforu oraz związki wykorzystywane przez bakterie tworzące biofilm
Bariera ochronna	EPSy nadają odporność na niespecyficzne oraz specyficzne linie obrony gospodarza podczas infekcji, zapewniają tolerancję na różnego rodzaju czynniki antymikrobiologiczne, chronią kompleks nitrogezy cyjanobakterii przed toksycznym działaniem tlenu oraz chronią biofilm przed niektórymi pierwotniakami
Sorpcja składników organicznych oraz jonów nieorganicznych	Egzopolisacharydy hydrofobowe oraz posiadające ładunek pośredniczą w akumulacji składników odżywczych z środowiska czy w sorpcji ksenobiotyków, a także wiążą jony metali ciężkich przyczyniając się do detoksyfikacji środowiska
Eksport składników komórkowych	Lipopolisacharydy pośredniczą w uwalnianiu do środowiska materiałów komórkowych i metabolitów
Równowaga energetyczna	EPSy magazynują nadmiar węgla, kiedy jego stosunek do azotu jest zaburzony

2. Znaczenie biotechnologiczne najważniejszych egzopolisacharydów bakteryjnych

2.1 Alginian

Alginian jest biopolimerem oryginalnie uzyskiwanym z wodorostów, ale w 1964 roku odkryto, że jest również syntetyzowany przez bakterie z rodzaju *Azotobacter* oraz *Pseudomonas*. Jest to liniowy polisacharyd złożony z bloków reszt kwasu mannuronowego (połączonych wiązaniem β -(1→4) glikozydowym) oraz bloków reszt kwasu guluronowego (połączonym wiązaniem α -(1→4) glikozydowym) (Rys. 1). Kopolimer ten ma charakter anionowy i znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym (nr E400), jako zagęstnik, emulgator oraz środek żelujący w wielu produktach, takich jak dżemy, soki czy galaretki (Tab. 2). Ponadto, alginian stosuje się przy produkcji kosmetyków (szampony, żele pod prysznic, pasty do zębów i mydła), w medycynie do produkcji opatrunków chirurgicznych i bandażu, jako czynniki wspomagające gojenie ran oraz czynniki umożliwiające kontrolowane uwalnianie leków oraz stomatologii do wytwarzania hydrokoloidowych, elastycznych mas wyciskowych (Moscovici 2015).

Alginian

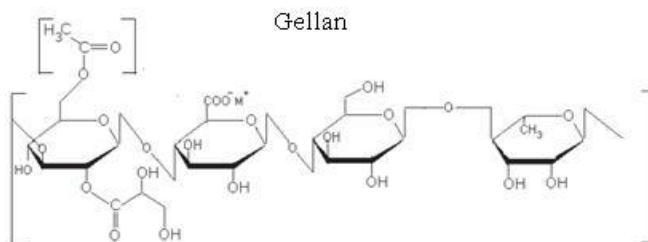


Rys. 1. Struktura chemiczna alginianu (Schmid i in. 2015).

2.2 Gellan

Gellan jest rozpuszczalnym w wodzie, anionowym polimerem odkrytym w 1978 roku u bakterii z rodzaju *Spingomonas*. Jest on liniowym heteropolisacharydem zbudowanym

z powtarzających się czterocukrowych podjednostek złożonych z α -ramnozy, dwóch reszt β -D-glukozy oraz kwasu glukuronowego, dodatkowo podstawionych resztami acetylowymi i glicerylowymi (Rys. 2) (Coleman i in. 2008).

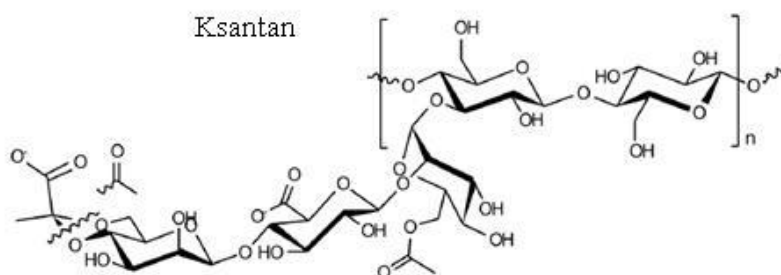


Rys. 2. Struktura chemiczna natywnej formy gellanu (Bajaj i in. 2007).

Gellan jest komercyjnie stosowany w hodowlach mikrobiologicznych przede wszystkim jako czynnik żelujący, stanowiący alternatywę dla powszechnie używanego agaru. Polisacharyd ten znalazł również zastosowanie w przemyśle spożywczym jako dodatek do żywności (nr E418), spełniając rolę emulgatora, stabilizatora oraz substancji zagęszczającej. Gellan można znaleźć w wielu produktach, takich jak napoje bezalkoholowe, produkty mleczne, mleczko sojowe, galaretki, dżemy, lody oraz sorbety (Tab. 2). Jest on również stosowany w przemyśle kosmetycznym do produkcji past do zębów, maseczek do twarzy oraz szamponów do włosów. W przemyśle farmaceutycznym polimer ten jest stosowany w kontrolowanym uwalnianiu leków oraz ich wchłanianiu w żołądku. Gellan wykorzystuje się także do kontrolowania biodostępności substancji czynnych zawartych w kroplach do oczu oraz jest czynnikiem wiążącym w tabletkach opartych na laktozie zawierających metronidazol czy paracetamol (Bajaj i in. 2007).

2.3 Ksantan

Ksantan, znany również pod nazwą guma ksantanowa został odkryty w 1950 roku i jest rozgałęzionym, anionowym heteropolisacharydem produkowanym przez bakterie *Xanthomonas*. Polisacharyd ten zbudowany jest z pięciocukrowych podjednostek złożonych z glukozy, mannozy oraz kwasu glukuronowego, modyfikowanych dodatkowo resztami kwasu octowego oraz pirogronowego (Rys. 3) (Born i in. 2002).



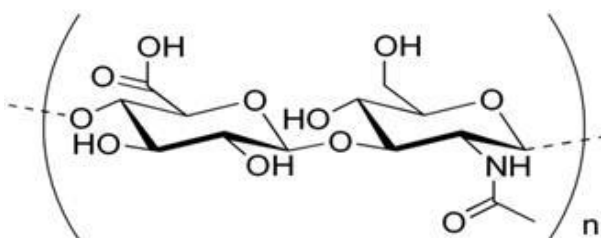
Rys. 3. Struktura chemiczna ksantanu (Schmid i in. 2015)

Po raz pierwszy ksantan został wykorzystany w przemyśle ropy naftowej do zwiększenia wydajności jej odzyskiwania i adsorpcji. Pod koniec lat 70-tych (USA) i na początku lat 80-tych (Europa) został zatwierdzony jako dodatek do żywności (o numerze E415). Ksantan w przemyśle spożywczym pełni rolę zagęstnika, emulgatora i stabilizatora przez co jest wykorzystywany do produkcji m. in. dżemów, galaretek, deserów twarogowych, kisielu, a także napojów mlecznych oraz sosów, słodczy i polew do ciast (Tab. 2.). Dzięki swoim właściwościom ksantan jest również stosowany w przemyśle farmaceutycznym w produkcji kremów i zawiesin oraz jako nośnik w kontrolowanym uwalnianiu leków (Morris i Harding 2009). W rolnictwie dodatek ksantanu do herbicydów, fungicydów oraz insektycydów poprawia ich płynność, równomiernie rozpraszając cząsteczki stałe w preparatach (DeAngelis 2012).

2.4 Hialuronian

Hialuronian, inaczej kwas hialuronowy jest anionowym, liniowym biopolimerem, odkrytym w 1934 roku. Należy on do glikozaminoglikanów i jest zbudowany z dwusacharydowych podjednostek, zawierających reszty kwasu D-glukuronowego oraz *N*-acetylo-D-glukozaminy połączone wiązaniami β -(1 \rightarrow 4) oraz β -(1 \rightarrow 3) glikozydowymi (Rys. 4) (Ruffing i Chen 2006). Produkowany jest on przez niektóre szczepy bakteryjne, jak na przykład *Pseudomonas aeruginosa* czy atenuowane szczepy bakterii *Streptococcus* z grupy A oraz C. W postaci soli sodowej polimer ten pełni niezwykle istotną rolę fizjologiczną u wszystkich organizmów żywych, w tym u człowieka. Po raz pierwszy kwas hialuronowy został wykorzystany w medycynie podczas zabiegu wymiany ciała szklistego w chirurgii oka (Necas i in. 2008). Ponadto, hialuronian stosowany jest także powszechnie w medycynie estetycznej jako wypełniacze do zabiegów wypełniania policzków, wygładzania zmarszczek czy spłycenia blizn. Znalazł on również zastosowanie w ortopedii (w leczeniu chorób zwyrodnieniowych stawów), okulistyce (jest składnikiem kropli do oczu, które wykorzystuje się w leczeniu np. tak zwanego zespołu suchego oka), a także laryngologii, proktologii oraz ginekologii ze względu na swoje bardzo dobre właściwości nawilżające oraz pozytywny wpływ na gojenie ran (Tab. 2).

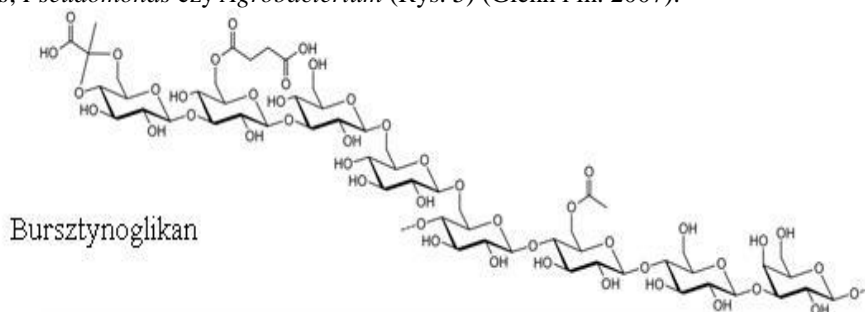
Kwas hialuronowy



Rys. 4. Struktura chemiczna kwasu hialuronowego (Schmid i in. 2015)

2.5 Bursztynoglikan

Bursztynoglikan jest rozgałęzionym egzopolisacharydem, zbudowanym z reszt glukozy oraz galaktozy (w stosunku molowym 7:1) połączonych wiązaniem β -glikozydowym, podstawionych dodatkowo resztami niecukrowymi, takimi jak reszty bursztynianowe, pirogronowe czy octanowe. Produkowany jest przez szereg bakterii glebowych, do których zaliczyć można *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* czy *Agrobacterium* (Rys. 5) (Glenn i in. 2007).

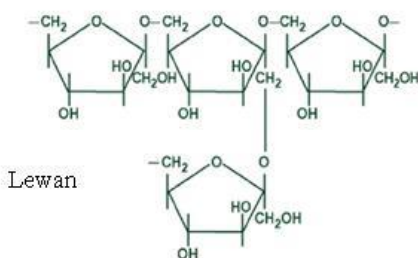


Rys. 5. Struktura chemiczna bursztynoglikanu (Schmid i in. 2015)

Modelowym organizmem produkującym bursztynoglikan jest *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* RM 1201. Polimer ten naturalnie pełni istotną funkcję w nawiązywaniu symbiozy pomiędzy *S. meliloti* a gospodarzem roślinnym – lucerną siewną (*Medicago sativa*). Bursztynoglikan znalazł zastosowanie w przemyśle spożywczym jako czynnik żelujący, a także ze względu na swój kwaśny charakter do produkcji środków czystości o niskiej wartości pH. Jest również używany w procesie wydobywania ropy naftowej (Tab. 2) (Sworn i Kerdvaid 2012).

2.6 Lewan

Lewan jest wysoce rozgałęzionym homopolisacharydem fruktozy, należącym do grupy fruktanów. Polymer ten jest syntetyzowany z sacharozy, dzięki enzymowi z grupy transferaz – sukrazie lewanu (EC 2.4.1.10). Lewan jest zewnątrzkomórkowo produkowany przez niektóre bakterie, w tym przez organizmy należące do rodzajów *Bacillus*, *Rahnella*, *Aerobacter*, *Erwinia*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* i *Zymomonas* (Rys. 6) (Bahl i in. 2010). Biopolimer ten znalazł zastosowanie przede wszystkim w przemyśle spożywczym jako stabilizator w produkcji słodczy oraz lodów, jako czynnik kapsułkujący oraz nośnik smaku i zapachu. Jest także składnikiem wielu preparatów kosmetycznych oraz farmaceutycznych (Kim i in. 2005). W medycynie, lewan wykorzystuje się ze względu na jego aktywność przeciwnowotworową oraz przeciwcukrzycową (Tab. 2). Przeciwnowotworowe właściwości lewanu są silnie skorelowane ze stopniem rozgałęzienia łańcucha polisacharydowego – im mniej rozgałęziony polymer, tym mniejszy hamujący wpływ na komórki rakowe (Dahech i in. 2011).



Rys. 6. Struktura chemiczna lewanu (Sonnenburg i in. 2010)

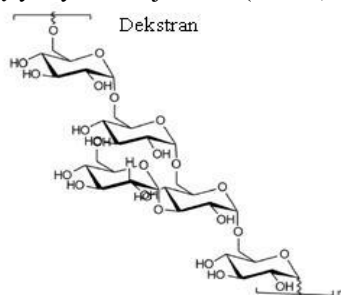
2.7 Glukany

2.7.1 α -glukany

2.7.1.1 Dekstran

Dekstran jest obojętnym biopolimerem zbudowanym z powtarzających się reszt D-glukozy połączonych wiązaniem α -(1 \rightarrow 6)-glikozydowym. Polymer ten należy do α -glukanów i syntetyzowany jest przez bakterie z rodzaju *Leuconostoc*, *Streptococcus* i *Lactobacillus* (Rys. 7) (Górska i in. 2007). Synteza tego polisacharydu odbywa się na zewnątrz komórki bakteryjnej przy udziale enzymu – dekstranosacharazy, która przeprowadza reakcję polimeryzacji glukozy, uzyskanej z sacharozy z uwolnieniem fruktozy do środowiska wzrostu.

Dekstran był pierwszym polisacharydem bakteryjnym produkowanym na skalę przemysłową i po raz pierwszy został użyty w 1953 roku w medycynie jako absorbent płynu wysiękowego w opatrunkach na trudno gojące się rany. Ponadto, jest również stosowany w zapobieganiu zakrzepicy oraz jako preparat krwiozastępczy. Frakcje tego biopolimeru o określonej masie cząsteczkowej, uzyskane w wyniku kontrolowanej reakcji hydrolizy, są również używane do produkcji złożeń do chromatografii żelowej (np. Sephadex®). Stosowany jest także w przemyśle spożywczym jako dodatek do żywności, na przykład do wyrobów cukierniczych jako środek zatrzymujący wilgoć oraz zapobiegający krystalizacji cukru (Tab. 2) (Patel i Prajapati 2013).

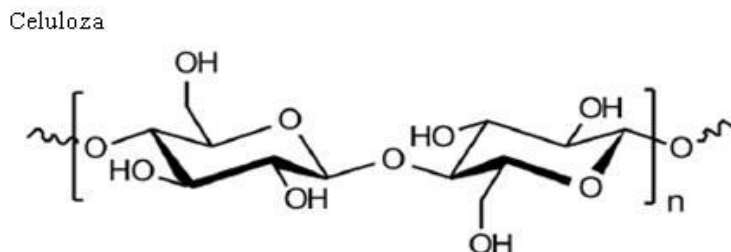


Rys. 7. Struktura chemiczna dekstranu (Schmid i in. 2015).

2.7.2 β -glukany

2.7.2.1 Celuloza

Celuloza jest nierozgałęzionym polimerem zbudowanym z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami β -(1 \rightarrow 4)-glikozydowymi (Rys. 8). Zdolność do syntezy celulozy została udokumentowana u wielu bakterii należących do rodzajów *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina* i *Salmonella* (Chawla i in. 2009). Po raz pierwszy polisacharyd ten opisano w 1931 roku, a trzy lata później scharakteryzowano go jako celulozę.

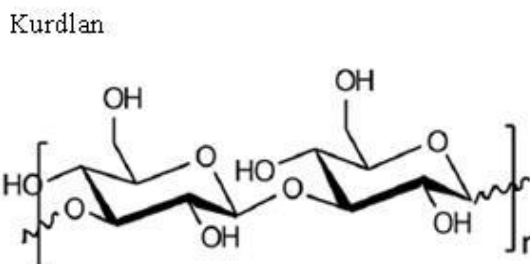


Rys. 8. Struktura chemiczna celulozy (Schmid i in. 2015).

Ze względu na swoją biokompatybilność oraz nietoksyczność, bakteryjna celuloza znalazła szerokie zastosowanie w medycynie. Powszechnie używana jest do produkcji opatrunków, a także stosowana jest jako tymczasowa sztuczna skóra przy gojeniu ran chirurgicznych oraz poparzeń, jako rusztowanie w inżynierii tkankowej, zamiennik tkanek miękkich oraz składnik sztucznych naczyń krwionośnych czy też jako substancja wypełniająca do produkcji tabletek i kapsulek (przemysł farmaceutyczny). Ponadto, celuloza ma szereg zastosowań w innych gałęziach przemysłu, jak na przykład w przemyśle papierniczym do produkcji papieru o bardzo wysokiej wytrzymałości oraz papieru elektronicznego, w przemyśle spożywczym do produkcji żywności dietetycznej oraz deserów, a także jako adsorbent w technikach separacyjnych (chromatografia cienkowarstwowa i kolumnowa), składnik organicznych diod elektroluminescencyjnych czy jako membrany akustyczne w wysokiej klasy słuchawkach (Tab. 2) (Patel i Prajapati 2013).

2.7.2.2 Kurdłan

Kurdłan podobnie jak celuloza należy do β -glukanów i jest zbudowany z reszt glukozy połączonych wiązaniami β -(1 \rightarrow 3)-glikozydowymi (Rys. 9). Kurdłan jest liniowym, obojętnym homopolisacharydem produkowanym przez *Alcaligenes faecalis* oraz przez szczepy *Agrobacterium* (*A. radiobacter*, *A. rhizogenes*) i *Rhizobium trifolii* (Turkiewicz i Czub 1997).



Rys. 9. Struktura chemiczna kurdłanu (Schmid i in. 2015)

Kurdłan znalazł wiele zastosowań przede wszystkim w przemyśle spożywczym jako czynnik żelujący przy produkcji wyrobów cukierniczych, deserów oraz zup. Ponadto, polisacharyd ten może być stosowany jako matryca do immobilizacji enzymów, a w połączeniu z azidotymidyną (AZT) wykazuje obiecującą, wysoką aktywność antyretrowirusową (lek przeciw AIDS) (Tab. 2) (Patel i Prajapati 2013).

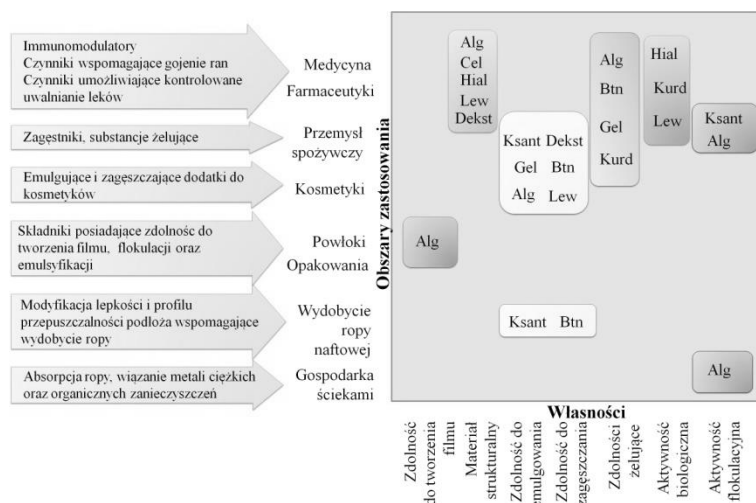
Tab. 2. Skład, synteza oraz zastosowanie egzopolisacharydów bakteryjnych (opracowanie własne).

Biopolimer	Skład	Producent	Zastosowanie
Alginian	Kwas guluronowy Kwas mannuronowy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>	Przemysł spożywczy Medycyna Przemysł kosmetyczny
Gellan	Glukoza Ramnoza Kwas glukuronowy	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Przemysł spożywczy Przemysł farmaceutyczny Przemysł kosmetyczny Podłoża mikrobiologiczne
Ksantan	Glukoza Mannoza Kwas glukuronowy	<i>Xanthomonas spp.</i>	Przemysł spożywczy Przemysł farmaceutyczny Przemysł kosmetyczny Przemysł naftowy Rolnictwo
Hialuronian	Kwas glukuronowy <i>N</i> -acetyloglukozamina	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> <i>Streptococcus equii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Medycyna Przemysł kosmetyczny
Bursztynoglikan	Glukoza Galaktoza	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Agrobacterium sp.</i>	Przemysł spożywczy Przemysł naftowy Przemysł kosmetyczny
Lewan	Fruktoza	<i>Aerobacter levanicum</i>	Przemysł spożywczy Medycyna Przemysł kosmetyczny
Dekstran	Glukoza	<i>Leuconostoc mesenteriodes</i>	Przemysł spożywczy Przemysł farmaceutyczny Chromatografia
Celuloza	Glukoza	<i>Acetobacter spp.</i>	Przemysł spożywczy Medycyna Przemysł farmaceutyczny Chromatografia Przemysł papierniczy
Kurdlan	Glukoza	<i>Rhizobium meliloti</i> <i>Agrobacterium radiobacter</i>	Przemysł spożywczy Przemysł farmaceutyczny

3. Podsumowanie

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie bakteryjnymi egzopolisacharydami ze względu na ich zróżnicowane własności takie jak wysoka lepkość, zdolności żelujące i zagęszczające, brak toksyczności, tworzenie biofilmu oraz stabilność w wysokim zakresie temperatury oraz pH. Dzięki tym cechom polimery te znalazły zastosowanie w rolnictwie ze względu na zdolność do zatrzymywania wody w glebie, w medycynie oraz farmacji m.in. jako immunomodulatory oraz czynniki wspomagające gojenie ran i czynniki umożliwiające kontrolowane uwalnianie leków, w przemyśle spożywczym jako zagęstniki i substancje żelujące, jak również jako emulgujące i zagęszczające dodatki do kosmetyków. Dzięki swojej lepkości są biopolimerami użytecznymi przy wydobyciu ropy naftowej, natomiast ze względu na silne powinowactwo do powierzchni pirytu EPS może być wykorzystywany w biolugowaniu. EPS znalazł zastosowanie także w bioremediacji ze względu na zdolność do adsorpcji ropy oraz obecność negatywnie naładowanych grup funkcyjnych wiążących metale ciężkie i organiczne zanieczyszczenia, co pozwala na ich usunięcie ze środowiska (Rys. 10). Zalety wynikające ze stosowania egzopolisacharydów skłoniły naukowców do szukania nowych polimerów bakteryjnych oraz modyfikacji już istniejących, w celu zwiększenia możliwości ich wykorzystania biotechnologicznego. Wzrost zainteresowania tymi polimerami, w najbliższych

latach przyczyni się zapewne do zwiększenia ilości produktów oraz technologii dostępnych na rynku, które oparte będą na egzopolisacharydach bakteryjnych.



Rys. 10. Korelacja pomiędzy własnościami najbardziej znaczących polisacharydów, a ich głównymi obszarami zastosowania. Skróty: Alg – alginian, Kurd – kurdlan, Gel – gellan, Hial – hialuronian, Lew – lewan, Btn – bursztynoglikan, Ksant – ksantan, Dekst – dekstran (na podstawie: Freitas i in. 2011; Nwodo i in. 2012; Patel i Prajapati 2013).

4. Bibliografia

- Bahl MA, Schultheis E, Hempel DC i in. (2010) Recovery and purification of the exopolysaccharide PS-EDIV from *Sphingomonas pituitosa* DSM 13101, *Carbohydrate Polymers*, 80: 1037–1041.
- Bajaj IB, Survase SA, Saudagar PS i in. (2007) Gellan gum: fermentative production, downstream processing and applications, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102: 150–156.
- Born K, Lagendorff V, Boulenguer P (2002) Xanthan. In: *Biopolymers*, Ed.: Steinbüchel A, Vandamme EJ, DeBaets S, Steinbüchel A, 5: 259–297, Weinheim:Wiley-VCH.
- Chawla PR, Bajaj IB, Shrikant AS i in. (2009) Microbial cellulose: fermentative production and applications, *Food Technology and Biotechnology*, 47: 107–124.
- Coleman RJ, Patel YN, Harding NE (2008) Identification and organization of genes for diutan polysaccharide synthesis from *Sphingomonas* sp. ATCC 53159, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 263–274.
- Dahech I, Belghith KS, Hamden K i in. (2011) Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats, *International Journal of Biological Macromolecules*, 49: 742–746.
- DeAngelis PL (2012) Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: Today and tomorrow, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94: 295–305.
- Freitas F, Alves VD, Reis MAM (2011) Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications, *Trends in Biotechnology*, 29(8): 388–398.
- Glenn SA, Gurich N, Feeney MA i in. (2007) The ExpR/Sin quorum-sensing system controls succinoglycan production in *Sinorhizobium meliloti*, *Journal of Bacteriology*, 189: 7077–7088.
- Górska S, Grycko P, Rybka J i in. (2007) Egzopolisacharydy bakterii kwasu mlekowego – biosynteza i struktura, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 61: 805–818.
- Junge K, Eicken H, Deming JW (2004) Bacterial activity at –2 to –20°C in Arctic wintertime Sea Ice, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1): 550–557
- Kim KH, Chung CB, Kim YH i in. (2005) Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*, *Journal of Cosmetic Science*, 56: 395–406.
- Morris G, Harding S (2009) Polysaccharides, Microbial, In *Encyclopedia of Microbiology*, Ed.: Schaechter M, 482–494, Brazil: Elsevier.

- Moscovici M (2015) Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides, *Frontiers in Microbiology*, 6:1012 doi:10.3389/fmicb.2015.01012
- Necas J, Bartosikova L, Brauner P i in. (2008) Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Veterinarni Medicina*, 53: 397–411.
- Nicolaus B, Kambourova M, Oner ET (2010) Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology, *Environmental Technology*, 31(10): 1145– 1158.
- Nwodo UU, Green E, Okoh AI (2012) Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11): 14002–14015.
- Patel A, Prajapati JB (2013) Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria, *Advances in Dairy Research*, 1:2
- Ruffing A, Chen RR (2006) Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis, *Microbial Cell Factories*, 5: 25.
- Schmid J, Sieber V, Rehm B (2015) Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies, *Frontiers in Microbiology*, 6:496 doi: 10.3389/fmicb.2015.00496
- Sonnenburg ED, Zheng H, Joglekar P i in. (2010) Specificity of Polysaccharide Use in Intestinal Bacteroides Species Determines Diet-Induced Microbiota Alterations, *Cell*, 141(7): 1241-1252.
- Sutherland W (1972) Bacterial exopolysaccharides, *Advances in Microbial Physiology*, 8: 143–213.
- Sworn G, Kerdvaid EA (2012) Comparison of the Rheological Properties of Succinoglycan with Xanthan Gum, In: *Gums and Stabilisers for the Food Industry 16*, Ed: Williams PA, Phillips GO, str. 89-98, Royal Society of Chemistry, Great Britain.
- Turkiewicz M, Czub W (1997) Kurdlan - struktura, właściwości, wykorzystanie, *Biotechnologia*, 38: 16-26.
- Wingender J, Neu TR, Flemming H-C (1999) What are bacterial extracellular polymer substances? In: *Microbial Extracellular Polymer Substance*, Ed.: Wingender J, Neu TR, Flemming H-C, str. 1–19, Springer, Berlin, Germany.

16. Charakterystyka czynników Nod: struktura, synteza, rola w symbiozie

The characteristic of Nod factors: structure, synthesis and role in symbiosis

Magdalena Kopycińska, Marta Kozieł, Paulina Lipa

Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii,

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Monika Janczarek, prof. UMCS

Magdalena Kopycińska: makopycinska@gmail.com

Słowa kluczowe: czynniki Nod, symbioza *Rhizobium*-rośliny bobowate, biologiczne wiązanie azotu

Streszczenie

Jednym z ważniejszych procesów zachodzących w przyrodzie jest biologiczne wiązanie azotu. Zdolność do asymilacji azotu cząsteczkowego z atmosfery posiada wąska, wyspecjalizowana grupa mikroorganizmów, zwanych diazotrofami. Należą tutaj m. in. symbiotyczne bakterie glebowe, zwane powszechnie rizobiami. Te Gram-ujemne pałeczki, w warunkach niedoboru azotu w środowisku, posiadają zdolność do nawiązywania symbiozy z roślinami bobowatymi. W zamian za składniki odżywcze oraz swoistą niszę ekologiczną zapewnianą przez rośliny, bakterie dostarczają swojemu gospodarzowi zredukowane i łatwo przyswajalne związki azotu. Aby proces symbiozy mógł zajść, pomiędzy mikro- a makrosymbiontem musi dojść do wymiany szeregu sygnałów molekularnych, w wyniku których indukuje się rozwój specyficznych struktur na korzeniach roślin, zwanych brodawkami korzeniowymi, wewnątrz których rizobia przy udziale enzymatycznego kompleksu nitrogenazy, przekształcają azot atmosferyczny w amoniak. Do najważniejszych cząsteczek sygnałnych wydzielanych przez bakterie należą tzw. czynniki Nod, których rola w nawiązywaniu symbiozy opiera się głównie na wywoływaniu szeregu zmian w roślinie, takich jak depolaryzacja błony komórkowej, zmiany w stężeniu jonów Ca^{2+} we włosnikach oraz ich skręcanie, a także ekspresję genów wczesnych i późnych nodulin. Efektywna symbioza pomiędzy bakteriami brodawkowymi a roślinami bobowatymi jest jednym z ważniejszych, naturalnie przebiegających sposobów wprowadzania zredukowanych związków azotowych do biosfery, co umożliwia istotne ograniczenie stosowania sztucznych nawozów mineralnych i chemicznych środków ochrony roślin, co z kolei przyczynia się do utrzymywania zrównoważonego rolnictwa.

1. Wprowadzenie

Azot jest jednym z najważniejszych pierwiastków niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania wszystkich żywych organizmów, gdyż wchodzi on w skład wielu ważnych związków, m.in. białek, kwasów nukleinowych, hormonów roślinnych, substancji będących przenośnikami energii, np. ATP. Głównym rezerwuarem azotu występującym w środowisku naturalnym jest powietrze, w którym jego stężenie oscyluje w granicach 78%. Pierwiastek ten w atmosferze występuje głównie w formie cząsteczkowej (N_2) zawierającej potrójne wiązania kowalencyjne pomiędzy atomami. Obecność tych wiązań powoduje, że azot cząsteczkowy jest trudno przyswajalny przez organizmy żywe. Jego redukcja do form efektywnie wykorzystywanych przez rośliny, m.in. amoniaku (NH_3), wymaga dużych nakładów energii. Niewielka ilość zredukowanych związków azotowych dostępnych w środowisku stanowi istotny czynnik ograniczający wzrost i produktywność roślin. W toku ewolucji organizmy roślinne wykształciły mechanizmy umożliwiające skuteczne pozyskiwanie tego pierwiastka (Fields 2004). Jednym z nich jest proces biologicznego wiązania azotu (ang. *biological nitrogen fixation*, BNF) umożliwiający redukcję mało reaktywnego azotu do związków azotowych łatwo przyswajalnych dla roślin. Szacuje się, że proces ten jest odpowiedzialny za wprowadzenie do globalnego cyklu obiegu azotu około 200 ton tego pierwiastka rocznie. Zdolność do przeprowadzania procesu BNF wykazuje jedynie niewielka grupa mikroorganizmów, zwanych diazotrofami, do których należą m.in. bakterie brodawkowe z rodziny *Rhizobiaceae*. Cechą tych mikroorganizmów jest zdolność do nawiązywania symbiozy z roślinami bobowatymi (np. grochem, fasolą, koniczyną, lucerną, wyką), a obecność w ich komórkach

enzymatycznego kompleksu nitrogeazy pozwala na asymilację azotu cząsteczkowego z atmosfery i jego redukcję do form łatwo przyswajalnych dla roślin (Janczarek i in. 2014; Fields 2004). Zachodzący pomiędzy roślinami a bakteriami specyficzny „dialog molekularny” prowadzi do rozwoju, na korzeniach gospodarza roślinnego brodawek, wewnątrz których znajdują się bakterie redukujące azot atmosferyczny. Nawiązywanie oddziaływań symbiotycznych pomiędzy bakteriami a gospodarzami roślinnymi, cechujących się wysoką specyficznością, jest skomplikowanym procesem obejmującym skoordynowaną, wzajemną wymianę roślinnych oraz bakteryjnych sygnałów molekularnych. Wśród nich kluczową rolę odgrywają czynniki Nod (ang. *Nod Factor*, NF) syntetyzowane przez bakterie brodawkowe w odpowiedzi na specyficzne roślinne flawonoidy. Ponadto wyróżniamy szereg innych bakteryjnych związków zaangażowanych w poszczególne etapy interakcji symbiotycznych, m.in. zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS), lipopolisacharydy (LPS), polisacharydy kapsularne (CPS), polisacharydy żelujące (GPS), glukomannan, laktony N-acylo-L-homoseryny, hopanoidy, kwas indolilo-3-octowy oraz bradyoksetyny. Natomiast wśród roślinnych substancji biorących udział w symbiozie, oprócz flawonoidów, wymienić można: betainy, ksantony, jasmoniany, kwasy aldonowe, fitohormony, nadtlenek wodoru oraz tlenek azotu (II) (Janczarek i in. 2014).

W niniejszej pracy dokonano charakterystyki bakteryjnych czynników Nod ze szczególnym uwzględnieniem ich struktury, syntezy oraz funkcji w symbiozie.

2. Rola czynników Nod w symbiotycznym wiązaniu azotu

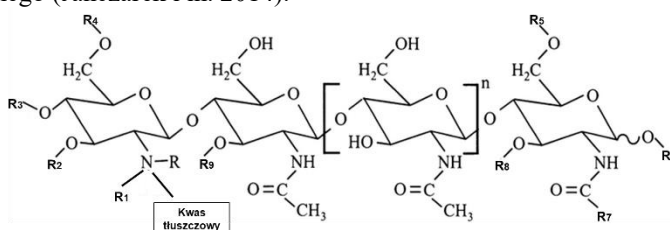
Ekspresja bakteryjnych czynników Nod, odpowiedzialnych za mechanizm brodawkowania (nodulacji), znajduje się pod kontrolą sygnałów roślinnych, głównie flawonoidów, wydzielanych przez korzenie roślin bobowatych w ryzosferze. Związki flawonoidowe pasywnie dyfundujące przez roślinną błonę komórkową powodują aktywację ekspresji genu *nodD*, którego produkt – białko NodD, specyficzny dla poszczególnych gatunków ryzobów, należy do rodziny regulatorów transkrypcyjnych LysR wiążących się z wysoce konserwatywnymi sekwencjami, tzw. nod-box, zlokalizowanymi w obrębie promotorów genów zaangażowanych w biosyntezę oraz sekrecję bakteryjnych NF. Białko NodD warunkuje rozpoznawanie określonych flawonoidów, syntetyzowanych przez gospodarzy roślinnych właściwych dla danego gatunku ryzobów (Jakubowska i in. 1998; Janczarek i in. 2014). Poszczególne szczepy bakteryjne mogą zawierać różną liczbę homologów białka NodD. Przykładowo *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* posiada pojedynczą kopię NodD, w odróżnieniu od *Bradyrhizobium japonicum* czy *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* zawierających od dwóch do pięciu kopii genu *nodD*. Ogólna liczba syntetyzowanych przez ryzobia NF jest zróżnicowana w zależności od szczepu, bądź biowaru. Zdolność do produkcji NF mają bakterie należące do rodzajów, takich jak: *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (Downie 2010; Janczarek i in. 2014; D’Haeze i Holsters 2002). Wpływ na liczbę wytwarzanych NF mają również warunki środowiskowe. Idealnym przykładem może być *Rhizobium tropici* CIAT899, które w niskim pH produkuje aż 52 różne NF, natomiast w pH obojętnym ich liczba zmniejsza się do 29 (Janczarek i in. 2014). Już bardzo niskie stężenia NF (10^{-12} – 10^{-13} M) są zdolne powodować szereg zmian w komórce roślinnej obejmujących deformację włóśniaków korzeniowych, alkalizację, depolaryzację ich błony komórkowej oraz gwałtowne fluktuacyjne wahania wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia, co prowadzi do zmian w cytoszkieletcie włóśniaków korzeniowych, tworzenia nici infekcyjnej, licznych podziałów komórkowych i rozwoju brodawek (Downie 2010; Janczarek i in. 2014). Jedną z pierwszych odpowiedzi komórki roślinnej na bakteryjne NF jest depolaryzacja jej błony komórkowej wskutek gwałtownego wypływu jonów chlorkowych i potasowych. Jednocześnie dochodzi do napływu jonów wapnia do cytoplazmy komórki roślinnej (Geurts i in. 2002). W toku licznych badań udało się zaobserwować, iż początkowo powolny napływ jonów Ca^{2+} , po kilkunastu minutach przechodzi w długotrwałe, fluktuacyjne zmiany stężenia Ca^{2+} zachodzące głównie w obrębie nukleoplazmy. Szlak sygnałowy aktywowany przez zmienne stężenie Ca^{2+} wymaga aktywacji jonowych kanałów potasowych oraz co najmniej trzech nukleoporyn (np. NUP85, NUP133, NENA). Wzrastająca ilość jonów Ca^{2+} prowadzi do aktywacji białkowej kinazy zależnej od wapnia i kalmoduliny (CCaMK), która poprzez fosforylację, aktywuje białko o nieznannej funkcji (CYCLOPS). Następnie dochodzi do

oddziaływania CCaMK z czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak: NIN (ang. *Nodule Inception*, NIN), ERN1, ERN2 (ang. *ERF Required for Nodulation*, ERN) i ekspresji genów indukowanych przez NF, m.in. genów wczesnych nodulin (ENOD40, ENOD11, ENOD12, ENOD5). Końcowym rezultatem tego szlaku sygnałowego jest inicjacja bakteryjnej infekcji w epidermie. Ponadto aktywacja transkrypcyjnego czynnika NIN prowadzi do aktywacji sygnalizacji cytokininowej, która hamuje polarny transport auksyn poprzez inhibicję ich transporterów. Wzrost ilości cytokinin promuje podziały komórek wewnętrznej i środkowej warstwy kory, co jest jednym z czynników inicjujących organogenezę brodawek (Oldroyd i in. 2011; Janczarek i in. 2014). Wykazano również, że NF powoduje wzrost stężenia kwasu fosforowego (PA) oraz pirofosforanu diacyloglicerolu (DGPP). Wzrost ilości PA wywołany przez NF jest spowodowany aktywacją fosfolipazy C (PLC) oraz fosfolipazy D (PLD). Potwierdzono, iż aktywacja obydwu enzymów jest również istotnym elementem mającym znaczenie w deformacji włósników korzeniowych (Geurts i in. 2002).

Dodatkowo NF odpowiadają za aktywację wczesnych genów nodulin warunkujących proces infekcji bakteryjnej i organogenezę brodawki (Janczarek i in. 2014). Także, ekspresja genów późnych nodulin zachodzi z udziałem NF. Kodują one białka odgrywające istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu brodawek, m.in. leghemoglobinę chroniącą nitrogenazę, tj. główny enzym biorący udział w wiązaniu azotu atmosferycznego, przed zbyt wysokim stężeniem tlenu, bądź enzymy uczestniczące w transporcie i metabolizmie azotu (Jakubowska i in. 1998).

3. Struktura czynników Nod

W strukturze czynników Nod, będących lipochitooligosacharydami, wyróżniamy oligomeryczny szkielet, w skład którego wchodzi od dwóch do sześciu reszt N-acetylo-D-glukozaminy połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Nieredukujący koniec NF zawiera różnej długości łańcuchy nasyconych, bądź (wielo)nienasyconych kwasów tłuszczowych. Ponadto NF ulegają licznym substytucjom, będących głównym czynnikiem determinującym ich specyficzność. Modyfikacje te występują w obrębie redukującego, jak i nieredukującego końca NF. Polegają one głównie na podstawieniu łańcucha kwasu tłuszczowego resztami: siarczanowymi, acetylowymi, karbamoilowymi, metylowymi, arabinozyłowymi, fukozyłowymi, bądź mannozą lub glicerolem (Janczarek i in. 2014; D'Haese i Holsters 2002). Struktura omawianych sygnałów molekularnych wraz z możliwymi modyfikacjami została przedstawiona na Rys.1. Zróznicowanie poszczególnych NF pod względem długości łańcucha oligosacharydowego, typu kwasu tłuszczowego oraz rodzaju i liczby substytucji odgrywa znaczącą rolę w warunkowaniu ich specyficzności względem danego gospodarza roślinnego (Janczarek i in. 2014).



Rys. 1. Struktura czynnika Nod wytwarzanego przez bakterie brodawkowe. Opracowanie na podstawie (Janczarek i in. 2014). Możliwe substytucje w strukturze NF: R₁-grupa metylowa; R₂-grupa karbamoilowa; R₃-grupa karbamoilowa; R₄-grupa acetylowa lub karbamoilowa; R₅-grupa siarczanowa, acetylowa, metylowa lub fukozylowa; R₆-mannoza lub glicerol; R₇-grupa acetylowa; R₈-grupa arabinozylowa; R₉-grupa fukozylowa.

4. Biosynteza czynników Nod

W biosyntezę i modyfikację NF zaangażowane są geny *nod*, *nol* oraz *noe*, które mogą być zlokalizowane w obrębie plazmidu symbiotycznego (pSym), bądź też mogą występować w chromosomalnym regionie zwanym wyspą symbiotyczną (Janczarek i in. 2014). Geny te, w zależności od pełnionych funkcji w syntezie NF, dzielimy na trzy następujące grupy:

- Geny *nodABC* powszechnie występujące u prawie wszystkich rizobiów warunkujące syntezę podstawowej struktury NF;
- Geny odpowiedzialne za specyficzne dla danego gatunku bakteryjnego, modyfikację rdzenia oligosacharydowego NF, np. *nodEF*, *nodG*, *nodH*, *nodPQ*, *nodRL*;
- Geny regulatorowe, np. *nodD*, *nolR*, *nodVW* zaangażowane w regulację transkrypcji wyżej wymienionych genów (Janczarek i in. 2014).

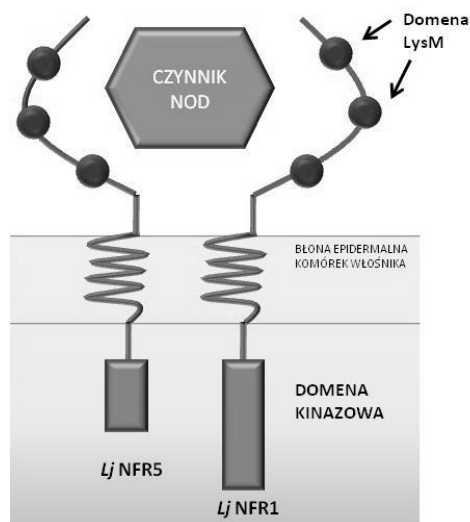
Ekspresja genów *nodABC* biorących udział w biosyntezie podstawowej struktury NF zachodzi w wyniku indukcji białka NodD przez roślinne flawonoidy. Szczepy bakteryjne będące mutantami w genach *nodABC* cechują się całkowitym brakiem zdolności do syntezy tych sygnałów molekularnych. Pierwszym enzymem zaangażowanym w szlak biosyntezy NF jest N-acetyloglukozaminotransferaza kodowana przez gen *nodC*. Katalizuje ona tworzenie wiązań β -1,4-glikozydowych pomiędzy resztami N-acetylo-D-glukozaminy, wydłużając w ten sposób łańcuch chitooligosacharydowy. Następnie nieredukujący koniec oligosacharydu ulega deacetylacji przy pomocy N-deacetylazy kodowanej przez gen *nodB*. W końcowym etapie syntezy podstawowej struktury NF następuje przeniesienie reszty kwasu tłuszczowego z donora grup acylowych na węgiel w pozycji 2 obecny w nieredukującym końcu powstającego łańcucha oligosacharydowego, przy udziale N-acylotransferazy będącej produktem genu *nodA*. Produkty genów *nodE* i *nodF*, odpowiednio, homolog białka przenoszącego grupy acylowe oraz syntaza β -ketoacylo-ACP są głównymi nośnikami kwasów tłuszczowych. Przy czym białko o aktywności syntazy β -ketoacylo-ACP bierze głównie udział w syntezie rzadko spotykanych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, podczas gdy produkt genu *nodE* jest odpowiedzialny za transport powszechnie występujących kwasów tłuszczowych (np. kwasu stearynowego) (Mergaert i in. 1997; Perret i in. 2000; Janczarek i in. 2014; D'Haese i Holsters 2002; Downie 2010).

Modyfikacje zachodzące w obrębie, zarówno redukującego, jak i nieredukującego końca łańcucha chitooligosacharydowego zależą od genów specyficzności gospodarza, kodujących m.in. transferazy katalizujące reakcje substytucji cząsteczek NF. Za przyłączanie reszty arabinozy odpowiedzialny jest produkt genów wchodzących w skład operonu *noeCHOP*, który został zidentyfikowany m.in. u *Azorhizobium caulinodans* ORS571 (Mergaert i in. 1997; Poinso i in. 2016). Wykazano, iż substytucja NF resztą arabinozy powoduje wzrost ilości brodawek u *Sesbania rostrata* będącego gospodarzem dla *A. caulinodans* (Perret i in. 2000). Z kolei gen *nodZ* koduje α -1,6-fukozylotransferazę, która przyłącza resztę fukozy do redukującego końca łańcucha NF. Ponadto u *A. caulinodans* wykazano obecność genu *nolK* biorącego udział w syntezie prekursora dla wspomnianej wyżej transferazy, tj. GDP-fukozy będącej donorem grupy fukozylovej (Perret i in. 2000; Poinso i in. 2016). W przyłączaniu reszt siarczanowych udział biorą, m.in. produkty genów *nodH* i *noeE* będące sulfotransferazami wykazującymi wysoką specyficzność wobec redukującego końca cząsteczki NF. Donorem reszt siarczanowych dla tych enzymów jest 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarzan, w syntezie którego udział biorą białka kodowane przez geny *nodP* i *nodQ* będące odpowiednio: ATP-sulfyrazą oraz kinazą APS (Perret i in. 2000). Czynniki Nod mogą ulegać także metylacji, bądź przyłączaniu grupy karbamoilowej. W procesach tych zaangażowane są produkty następujących genów: *nodS* kodujący metylotransferazę zależną od SAM, która metyluje nieredukujący koniec NF, podczas gdy geny *nodU* oraz *nolO* katalizują karbamoilację w pozycji, odpowiednio, C-6 i C-3 (C-4) nieredukującego końca N-acetylo-D-glukozaminy (Poinso i in. 2016). Z kolei acetylotransferazy kodowane przez geny *nodX* i *nodL* są odpowiedzialne za przyłączanie grup acylowych do węgla w pozycji 6, odpowiednio, redukującego i nieredukującego końca łańcucha oligosacharydowego (Perret i in. 2000). W sekrecji w pełni zsyntetyzowanych NF biorą udział produkty genów *nodIJ* kodujące białka należące do rodziny transporterów ABC (Mergaert i in. 1997).

5. Rozpoznawanie czynników Nod przez rośliny

Infekcja włośników korzeniowych po ich uprzedniej kolonizacji przez bakterie z rodziny *Rhizobiaceae*, a następnie formowanie brodawek obejmujące gwałtowną aktywację komórek epidermy, kory i perycyklu są inicjowane, gdy NF, specyficzne dla danego makrosymbionta, są

rozpoznawane i wiązane przez roślinne receptory typu LysM (ang. *Lysine Motive*). W wyniku tego dochodzi do wczesnej odpowiedzi roślinnej obejmującej wcześniej opisane procesy, tj. deformację włóśników korzeniowych, depolaryzację ich błony komórkowej, oscylacyjne wahania stężenia jonów wapnia, tworzenie nici infekcyjnej, podziały komórkowe oraz aktywację ekspresji wielu genów niezbędnych dla nawiązywania efektywnych oddziaływań symbiotycznych (Janczarek i in. 2014). Roślinna odpowiedź jest indukowana przez bakteryjne NFs, gdy te występują już w stężeniach pikomolarnych, co wskazuje na wysokie powinowactwo receptorów zlokalizowanych w błonie cytoplazmatycznej epidermy makrosymbionta. Receptorowe białka wiążące NF zostały, do tej pory, zidentyfikowane u kilku gatunków roślin bobowatych, tj.: *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Glycine max*, *Pisum sativum* (Guerts i Bisseling 2002; Janczarek i in. 2014). Receptory te są kinazami białkowymi (LysM-RLK) zawierającymi: 44-65 aminokwasową, zewnątrzkomórkową domenę lizynową zdolną do wiązania chityny (LysM), domenę transmembranową oraz wewnątrzkomórkową domenę serynowo-treoninową kinazy białkowej (Janczarek i in. 2014; Sergeevich i in. 2015). Schemat budowy receptora NF prezentuje Rys.2.



Rys. 2. Budowa receptora czynnika Nod na przykładzie receptorów *Lotus japonicus*. Schemat opracowano na podstawie (Oldroyd i Downie 2004).

Badania wykazały, że właściwym receptorem bezpośrednio wiążącym NF jest heterodimer, w skład którego wchodzi kinaza oraz pseudokinaza. W przypadku *L. japonicus* heterodimer ten tworzą następujące polipeptydy: 623-aminokwasowe, mające aktywność kinazową, białko LjNFR1 oraz nieposiadające aktywności kinazy 596-aminokwasowe białko LjNFR5 (ang. *Nod Factor Receptor 1* i 5). Te dwa transmembranowe receptory kinazowe LjNFR1 oraz LjNFR5 zawierają, odpowiednio, dwie i trzy subdomeny LysM. Przeprowadzone badania sugerują, iż do wiązania NF przez właściwe receptory dochodzi z udziałem odpowiednich reszt aminokwasowych obecnych w motywach LysM (Radutoiu i in. 2003; Madsen i in. 2003; Tylman i Kowalczyk 2012; Sergeevich i in. 2015). Inną modelową rośliną bobowatą, u której zidentyfikowano receptorowe białka, jest *M. truncatula*. Stwierdzono u niej obecność cząsteczek białkowych będących ortologami LjNFR1 i LjNFR5, odpowiednio są to: MtLYK3/MtLYK4 (ang. *LysM domain-containing-receptor-like Kinase 3/4*) oraz MtNFP (ang. *Nod Factor Perception*). Receptor MtLYK3/MtLYK4 kontroluje etap inicjacji i wzrostu nici infekcyjnej warunkując to, że tylko rizobia syntetyzujące odpowiednie NFs mogą nawiązywać efektywną symbiozę z *M. truncatula* (Gough 2003; Tylman i Kowalczyk 2012). Ponadto występowanie ortologów LjNFR1 i LjNFR5 stwierdzono również u *G. max* (GmNFR1 α/β ; GmNFR5 α/β) oraz *P. sativum* (PsSYM2A/37; PsSYM10) (Tylman i Kowalczyk 2012; Janczarek i in. 2014). Opisane receptory oddziałują z tzw. remorynami, np. MtSYMREM1 obecnymi w błonie nici infekcyjnej oraz błonie plazmatycznej. Funkcja tych białek nie została jeszcze dokładnie poznana. Uważa się, że oddziaływanie to ułatwia formowanie kompleksu pomiędzy NF a receptorem (Tylman

i Kowalczyk 2012; Janczarek i in. 2014). Ponadto, u kilku innych roślin bobowatych wykazano obecność dodatkowych kinaz białkowych zawierających zewnątrzkomórkową domenę z licznymi powtórzeniami bogatymi w leucynę i zaangażowanych w aktywację kaskady sygnałowej prowadzącej do wykształcenia nici infekcyjnych i brodawek. Są to m.in. LjSYMRK, PsSYM19, MtDMI2, MsNORK (Gough 2003; Tylman i Kowalczyk 2012; Janczarek i in. 2014).

6. Podsumowanie

Istotna rola azotu wynikająca z jego obecności w wielu ważnych i aktywnych biologicznie związkach sprawia, iż jest on jednym z najbardziej pożądaných pierwiastków, zarówno przez organizmy zwierzęce jak i roślinne. Pomimo jego dużej zawartości w atmosferze, forma chemiczna, w której występuje w znacznym stopniu ogranicza jego dostępność dla organizmów żywych. Toteż niedobór azotu jest jednym z główných czynników ograniczających wzrost i produktywność plonów rolniczych, m.in. roślin bobowatych. W trakcie ewolucji rośliny te wykształciły zdolność nawiązywania efektywnej symbiozy z bakteriami zdolnymi do redukcji tego pierwiastka do form łatwo dostępnych dla organizmów roślinnych. Przykładem takich mikroorganizmów są bakterie z rodziny *Rhizobiaceae*. Istotną rolę w oddziaływaniach symbiotycznych pomiędzy mikro- a makrosymbiontem odgrywają, syntetyzowane przez rizobia, czynniki Nod aktywujące kaskadę sygnałową umożliwiającą infekcję włóśników korzeniowych gospodarzy roślinnych oraz tworzenie struktur, w których zachodzi proces redukcji azotu, tj. brodawek. Liczne badania prowadzone nad naturą chemiczną oraz znaczeniem NF w symbiozie przyczyniły się nie tylko do scharakteryzowania tych molekuł sygnałowych, ale również umożliwiły one praktyczne zastosowanie NF jako aktywných składników bionawozów promujących wzrost roślin bobowatych. Kolejną zaletą stosowania tych biopreparatów, oprócz zwiększenia plonów roślin bobowatych o istotnym znaczeniu gospodarczym, jest redukcja ilości, wykorzystywanych w rolnictwie, toksycznych pestycydów, co w konsekwencji prowadzi, m.in. do zmniejszenia zanieczyszczenia gleby i wód gruntowych. Wiedza ta skłania badaczy do dalszych badań mających na celu dokładniejsze poznanie aspektów dotyczących funkcjonowania i znaczenia bakteryjnych NFs, a także białek z nimi oddziałujących, np. remoryn oraz opracowania biopreparatów, zawierających jako aktywny składnik omawiane cząsteczki sygnałowe, stymulujących wzrost i produktywność roślin niebobowatych (Kidaj 2011; Waraczewska i in. 2017).

7. Literatura

- D'Haese W, Holsters M (2002) Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12: 79-105.
- Downie JA (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews* 34: 150-170.
- Fields S (2004) Global nitrogen: cycling out of control. *Environmental Health Perspectives* 112: A556-A563.
- Geurts R, Bisseling T (2002) *Rhizobium* nod factor perception and signaling. *The Plant Cell* 14: 239-249.
- Gough C (2003) Rhizobium symbiosis: insight into Nod factor receptors. *Current Biology* 13: 973-975.
- Jakubowska A, Kowalczyk S (1998) Biochemiczne i molekularne podstawy symbiotycznych oddziaływań bakterii i roślin. *Postępy Biochemii* 44: 72-82.
- Janczarek M, Rachwał K, Marzec A, i in. (2014) Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology* 85: 94-113.
- Kidaj D (2011) Bionawozy zawierające rizobiowe czynniki Nod jako nowy trend w uprawie roślin motylkowatych [online]. Dostępny w Internecie: http://www.rsi2004.lubelskie.pl/doc/sty5/art/Kidaj_D_art
- Madsen BM, Madsen LH, Radutoiu S (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425: 637-640.

- Margaert P, Van Montagu M, Holsters M (1997) Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular Microbiology* 25: 811-817.
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, i in. (2011) The rules of engagement in the Legume-Rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics* 45: 119-145.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 180-201.
- Poinsot V, Crook MB, Erdn S, i in. (2016) New insights into Nod factor biosynthesis: Analyses of chitooligomers and lipo-chitooligomers of *Rhizobium* sp. IRBG74 mutants. *Carbohydrate Research* 434: 83-93.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, i in. (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592.
- Sergeevich SA, Alexandrovich ZV, Yurievna SO (2015) Nod-factor signaling in legume-rhizobial symbiosis. W: *Plants for the Future*, Prof. Hany El-Shemy (red.) InTech: 135-160.
- Tylman I, Kowalczyk S (2012) Receptory i szlaki sygnałowe regulujące symbiozę brodawkową i mikoryzę arbuskularną. *Postępy Biologii Komórki* 39: 429-458.
- Waraczewska Z, Niewiadomska A, Kosicka-Dziechciarek D (2017) Zastosowanie drobnoustrojów o działaniu synergistycznym w procesie biologicznego wiązania azotu. *Woda-Środowisko- Obszary Wiejskie* 17: 157-168.

17. Adsorpcja biosurfaktantów na granicy faz woda-powietrze

Adsorption of biosurfactants at the water-air interface

Mańko Diana, Górska Agnieszka

Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Mańko Diana: diana_manko@sggw.pl

Słowa kluczowe: związki powierzchniowo czynne, napięcie powierzchniowe

Streszczenie

Adsorpcja surfaktantów na granicy różnych faz odgrywa znaczącą rolę w niemal każdym procesie, w którym związki te są wykorzystywane, ponieważ tendencja do gromadzenia się na granicy faz, a tym samym redukcji napięcia międzyfazowego determinuje najważniejsze właściwości technologiczne ich wodnych roztworów. Zdolność tworzenia stabilnych pian i emulsji, właściwości zwilżające, myjące, czy piorące to tylko niektóre przykłady, gdzie adsorpcja jest siłą napędową działania związku powierzchniowo czynnego. Zdolności adsorpcyjne surfaktantów wynikają z ich amfifilowej budowy i zależą głównie od rodzaju i ilości grup funkcyjnych obecnych w cząsteczce związku oraz jej budowy przestrzennej. Biosurfaktanty wytwarzane przez organizmy żywe stanowią zazwyczaj mieszaninę różnych homologów o strukturach znacznie bardziej złożonych niż te prezentowane przez klasyczne (syntetyczne) związki powierzchniowo czynne. W związku z tym również i proces adsorpcji takich substancji jest bardziej złożony, a jego opis niejednokrotnie narażony na wiele trudności. W niniejszej pracy przedstawiono parametry wykorzystywane do opisu procesu adsorpcji biosurfaktantów na granicy faz woda-powietrze, a na podstawie dostępnych danych literaturowych scharakteryzowano skuteczność i efektywność oraz tendencję do adsorpcji wybranego biosurfaktantu glikolipidowego – rannolipidu.

1. Wstęp

Biosurfaktanty, czyli związki powierzchniowo czynne (ZPC) pochodzenia naturalnego stanowią grupę wysoce biodegradowalnych i biokompatybilnych środowiskowo amfifili. Mogą być one wytwarzane zarówno przez mikroorganizmy (bakterie, drożdże, grzyby strzępkowe), jak również rośliny i zwierzęta (np. lecytyna sojowa, saponiny), a nawet ludzi (np. mucyny, surfaktanty płucne). Biosurfaktanty, podobnie jak syntetyczne związki powierzchniowo czynne, ze względu na dwubiegunową budowę cząsteczki wykazują tendencję do adsorpcji na granicy różnych faz oraz tendencję do micelizacji (tworzenia agregatów koloidalnych rozmiarów w objętości roztworu). Jednak naturalne pochodzenie tych związków nadaje im też pewne charakterystyczne właściwości wyróżniające je w grupie ZPC, m.in. surfaktanty te są aktywne biologicznie, efektywne nawet w ekstremalnych warunkach środowiska, a także zdolne do samoagregacji już przy bardzo niskich stężeniach. W literaturze szeroko opisano potencjalne możliwości zastosowania naturalnych surfaktantów w różnych dziedzinach przemysłu np. wydobywczym (technologie MEOR, *Microbial Enhanced Oil Recovery*), papierniczym, celulozowym, spożywczym, a także w procesach remediacji i bioremediacji wód i gleb, farmacji i medycynie. Szczególną uwagę zwraca się także na właściwości antyadhezyjne biosurfaktantów, które gromadząc się na powierzchniach stałych zabezpieczają je przed tworzeniem się na nich biofilmów bakteryjnych. Wielokierunkowe możliwości zastosowań rozciągające się przed naturalnymi ZPC są przyczyną dużego zainteresowania tą grupą związków, a w szczególności poznaniem mechanizmów ich adsorpcji na granicy różnych faz.

2. Opis zagadnienia

Adsorpcja biosurfaktantów na granicy faz woda-powietrze to proces gromadzenia się cząsteczek związku powierzchniowo czynnego na tej granicy w ilości większej niż we wnętrzu (objętości) obu faz. Rozpuszczeniu biosurfaktantu w wodzie towarzyszy spadek entropii układu związany z porządkowaniem się cząsteczek wody wokół amfifilowych cząsteczek ZPC.

Dwubiegunowe cząsteczki biosurfaktantów dążą do granicy faz woda-powietrze celem zmniejszenia powierzchni kontaktu między polarnym rozpuszczalnikiem a swoją niepolarną częścią – tzw. „ogonem”. Na granicy faz ustawiają się w ten sposób, że fragment hydrofilowy ZPC skierowany jest w kierunku fazy wodnej, a fragment hydrofobowy w kierunku fazy o mniejszej polarności – w tym przypadku powietrza. Wraz ze wzrostem stężenia biosurfaktantu w roztworze zwiększa się również ilość jego cząsteczek na granicy faz, aż do momentu zapełnienia się całej powierzchni międzyfazowej i ustalenia się stanu równowagi pomiędzy cząsteczkami ZPC znajdującymi się w fazie objętościowej i powierzchniowej (równowaga ta ma charakter dynamiczny). Dalszy wzrost stężenia związku powierzchniowo czynnego i towarzyszący mu spadek entropii oraz wzrost energii w układzie wymusza tworzenie przez pojedyncze cząsteczki ZPC uporządkowanych struktur w fazie objętościowej roztworu zwanych micelami (Rosen 2004).

Opis procesu adsorpcji biosurfaktantu na granicy faz woda-powietrze wymaga analizy danych uzyskanych z pomiarów napięcia powierzchniowego roztworów badanego związku w szerokim zakresie jego stężenia.

Napięcie powierzchniowe cieczy (γ_{LV}) jest to siła styczna do powierzchni cieczy działająca wzdłuż jej obwodu i przypadająca na jednostkę długości przekroju poprzecznego tej powierzchni wyrażana w mN m^{-1} (jak również praca związana z utworzeniem nowej powierzchni swobodnej wyrażona w J m^{-2}). Napięcie powierzchniowe czystych, polarnych cieczy jest wysokie, przykładowo dla wody w temperaturze 293.15 K wynosi ono 72.8 mN m^{-1} . Dodatek substancji powierzchniowo czynnej powoduje zmniejszenie napięcia powierzchniowego wody na skutek adsorpcji cząsteczek ZPC na granicy faz woda-powietrze. Obniżenie γ_{LV} cieczy jest tym większe im większa jest ilość zaadsorbowanych cząsteczek na granicy faz. Minimalną wartość napięcia powierzchniowego (γ_{\min}) w przypadku wodnych roztworów biosurfaktantów uzyskuje się zazwyczaj w chwili całkowitego wysycenia powierzchni międzyfazowej przez cząsteczki ZPC.

Trudno jest jednak w sposób bezpośredni określić ilość biosurfaktantu zaadsorbowanego na granicy faz woda-powietrze ze względu na problem w oddzieleniu powierzchni międzyfazowej od fazy objętościowej roztworu. W praktyce najczęściej do wyznaczania stężenia powierzchniowego surfaktantu wykorzystuje się dane z pomiarów napięcia powierzchniowego jego wodnych roztworów oraz odpowiednią postać równania izotermy adsorpcji Gibbsa (Rosen 2004):

$$\Gamma_i = - \frac{C_i}{nRT} \left(\frac{d\gamma_{LV}}{dC_i} \right)_{T, C_{j \neq i}} = - \frac{1}{2.303nRT} \left(\frac{d\gamma_{LV}}{d \log C_i} \right)_{T, C_{j \neq i}}$$

(1)

gdzie: Γ_i to nadmiarowe stężenie powierzchniowe biosurfaktantu wyrażone w mol m^{-2} , C_i to jego stężenie objętościowe, T – temperatura bezwzględna, R – stała gazowa, a n jest stałe i dla biosurfaktantów jonowych wynosi 2, a niejonowych – 1.

Nadmiarowe stężenie powierzchniowe ZPC wzrasta wraz ze wzrostem stężenia związku w fazie objętościowej osiągając maksymalną wartość w momencie całkowitego wysycenia obszaru międzyfazowego przez cząsteczki ZPC (maksymalne nadmiarowe stężenie powierzchniowe, Γ_m). Im większa jest wartość Γ_m , czyli im ściślej jest upakowanie cząsteczek w nasyconej monowarstwie adsorpcyjnej, tym mniejsza jest wartość minimalnej powierzchni zajmowanej przez cząsteczkę ZPC w obszarze międzyfazowym (A_{\min}):

$$A_{\min} = \frac{1}{N\Gamma_m} \tag{2}$$

gdzie: N – liczba Avogadro.

Maksymalne nadmiarowe stężenie powierzchniowe Gibbsa jest użyteczną miarą efektywności procesu adsorpcji (ang. *effectiveness of surfactant adsorption*), która jest tym większa im większa jest wartość Γ_m (i mniejsza A_{min}), czyli im gęstsze jest upakowanie nasyconej monowarstwy adsorpcyjnej na granicy faz woda-powietrze. Dodatkowo znając wielkość powierzchni zajmowanej przez cząsteczkę surfaktantu na granicy faz woda-powietrze (A) i porównując ją z rzeczywistymi wymiarami cząsteczki (obliczonymi na podstawie długości wiązań chemicznych i kątów między nimi) można uzyskać m.in. informację o orientacji cząsteczek ZPC w tworzącej się warstwie adsorpcyjnej (Rosen 2004).

Miarą tendencji surfaktantu do gromadzenia się na granicy faz woda-powietrze jest zmiana jego standardowej swobodnej energii adsorpcji (ΔG_{ads}^o), którą można obliczyć za pomocą wielu różnych metod, m.in. stosując:

- równanie Langmuira zmodyfikowane przez de Boera (De Boer 1953):

$$\frac{A_0}{A - A_0} \exp \frac{A_0}{A - A_0} = \frac{C}{\omega} \exp \left(\frac{-\Delta G_{ads}^o}{nRT} \right) \quad (3)$$

gdzie: A_0 jest minimalną powierzchnią, jaką mogłaby zająć cząsteczka ZPC na granicy faz, a tym samym powierzchnią niedostępną dla innej cząsteczki (tzw. “excluded area”), a ω to liczba cząsteczek wody w 1 dm³ równa 55.41;

- równanie Rosena i Aronsona wykorzystujące napięcie powierzchniowe wodnych roztworów ZPC tylko w zakresie stężenia związku odpowiadającego liniowej zmianie γ_{LV} w funkcji $\log C$ (Rosen i Aronson 1981):

$$\Delta G_{ads}^o = nRT \ln \left(\frac{C}{\omega} \right) - \pi \varpi_1 \quad (4)$$

gdzie: ϖ_1 to powierzchnia molowa biosurfaktantu;

- równanie Gamboa i Olea, w którym przyjęto założenie, że w przypadku wodnych roztworów większości surfaktantów o takim stężeniu ZPC, które powoduje obniżenie napięcia powierzchniowego wody o 20 mN m⁻¹ można mówić już o wartości nadmiarowego stężenia powierzchniowego zbliżonej do wartości maksymalnej (Gamboa i Olea 2006):

$$\Delta G_{ads}^o = -2.303nRT(pC_{20} + K_1) \quad (5)$$

gdzie: K_1 jest stałą, którą można obliczyć na podstawie wartości granicznej powierzchni zajmowanej przez cząsteczkę surfaktantu na granicy faz, a pC_{20} to ujemny logarytm ze stężenia ZPC, które powoduje obniżenie γ_{LV} rozpuszczalnika o 20 mN m⁻¹;

- równanie wiążące zmiany standardowej swobodnej energii adsorpcji surfaktantu ze zmianami jego standardowej swobodnej energii micelizacji (ΔG_{mic}^o) (Tadros 1995):

$$\Delta G_{ads}^o = \Delta G_{mic}^o - \frac{\pi_{CMC}}{\Gamma_{CMC}} \quad (6)$$

gdzie: π_{CMC} to różnica pomiędzy napięciem powierzchniowym wody i wodnego roztworu surfaktantu o stężeniu odpowiadającym jego krytycznemu stężeniu micelizacji (CMC), a Γ_{CMC} to nadmiarowe stężenie powierzchniowe Gibbsa surfaktantu w CMC;

- równanie, w którym przyjęto założenie, że zmiana standardowej swobodnej energii Gibbsa w procesie adsorpcji ZPC na granicy faz woda-powietrze związana jest z przejściem części hydrofobowej surfaktantu z fazy wodnej do gazowej (Jańczuk i in. 1997):

$$\Delta G_{ads}^o = A_T N(\gamma_T - \gamma_{WT}) + A_H N(\gamma_{WH}^S - \gamma_{WH}^B) \quad (7)$$

gdzie: A_T i A_H to odpowiednio powierzchnia kontaktu części hydrofobowej („tail”) i hydrofilowej („head”) surfaktantu, γ_T to napięcie powierzchniowe części hydrofobowej, γ_{WT} to napięcie międzyfazowe woda-część hydrofobowa, γ_{WH}^B to napięcie międzyfazowe woda-część hydrofilowa w fazie objętościowej roztworu, a γ_{WH}^S to napięcie międzyfazowe woda-część hydrofilowa w fazie powierzchniowej.

Wartości ΔG_{ads}^0 , ZPC obliczone za pomocą wymienionych równań są ujemne, co świadczy o samorzutności procesu adsorpcji surfaktantów na granicy faz woda-powietrze, a im niższa wartość zmiany standardowej swobodnej energii adsorpcji związku tym większa jest jego tendencja do adsorpcji na granicy faz.

Zmiana standardowej swobodnej energii adsorpcji biosurfaktantu jest nie tylko miarą jego tendencji do gromadzenia się na granicy faz, ale także bezpośrednią miarą skuteczności procesu adsorpcji (ang. *efficiency of surfactant adsorption*). Ze względu na związek pomiędzy ΔG_{ads}^0 , a parametrem pC_{20} (równanie 5) przyjmuje się, że im wyższa wartość parametru pC_{20} tym większa skuteczność adsorpcji ZPC na granicy faz woda-powietrze (Rosen 2004).

3. Przegląd literatury

Ze względu na duży potencjał aplikacyjny najczęściej opisywanym w literaturze biosurfaktantem jest ramnolipid (RL). Ramnolipid to niskocząsteczkowy glikolipid wytwarzany przez bakterie *Pseudomonas aeruginosa* w postaci mieszaniny homologów formy mono (L-ramnozylo- β -hydroksydekanoilo- β -hydroksydekanian, Rha-C10-C10) i di (L-ramnozylo-L-ramnozylo- β -hydroksydekanoilo- β -hydroksydekanian, Rha-Rha-C10-C10) związku (Müller i Hausmann 2011; Sekhon Randhawa i Rahman 2014). Przedstawione w literaturze parametry opisujące proces adsorpcji RL na granicy faz woda-powietrze często różnią się od siebie, ponieważ ramnolipidy podobnie jak inne biosurfaktanty stanowią mieszaninę kilku homologów, która w zależności od warunków syntezy oraz typu bakterii syntetyzujących może różnić się zarówno ilościowo jak i jakościowo.

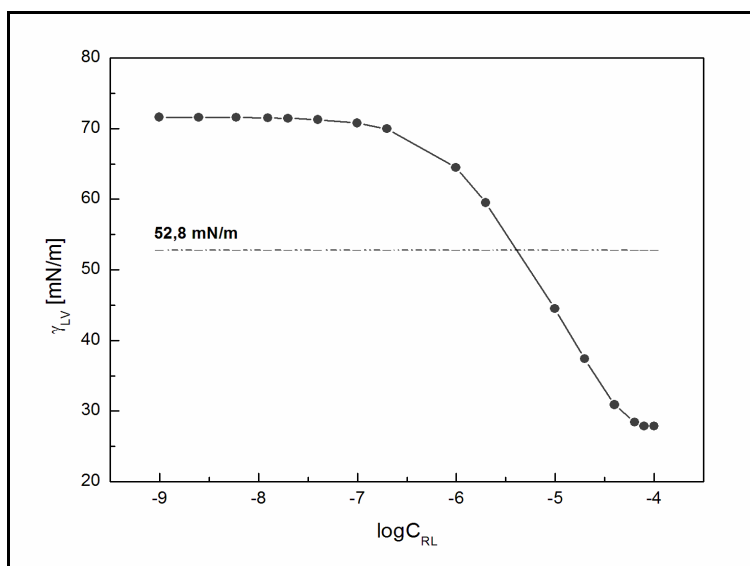
Mańko i in. (Mańko i in. 2014) określili parametry adsorpcyjne komercyjnie dostępnej mieszaniny ramnolipidowej (R-95 Rhamnolipid, Sigma Aldrich) na podstawie zmian napięcia powierzchniowego jej wodnych roztworów (Rys. 1). Wyznaczone doświadczalnie wartości maksymalnego nadmiarowego stężenia powierzchniowego Gibbsa, minimalnej powierzchni zajmowanej na granicy faz, parametru pC_{20} i minimalnej wartości napięcia powierzchniowego zestawiono w tabeli (Tab. 1) wraz z danymi literaturowymi dla powszechnie stosowanych surfaktantów syntetycznych – anionowego siarczanu dodecylosodowego (SDS), kationowego bromku cetylotrimetyloamonowego (CTAB) i niejonowego Tritonu X-100 (TX-100).

Tab. 1. Właściwości powierzchniowe RL, SDS, CTAB i TX-100 (Mańko i in. 2014; Zdziennicka i in. 2012).

	Γ_m [mol m ⁻²]	A_{min} [Å ²]	pC_{20}	γ_{min} [mN m ⁻¹]
RL	2.01	82.6	5.4	27.9
SDS	3.2	51.9	2.1	38.5
CTAB	3.1	53.6	3.4	38.0
TX-100	2.83	58.7	4.7	33.5

Z porównania danych zestawionych w tabeli wynika, że ramnolipid wykazuje największą skuteczność adsorpcyjną (największa wartość parametru pC_{20}), ale jednocześnie najmniejszą efektywność w procesie adsorpcji na granicy faz woda-powietrze (najmniejsza wartość Γ_m). Najmniejsza efektywność adsorpcji RL wynika przede wszystkim z dużych rozmiarów jego cząsteczek. Ponadto ramnolipidy charakteryzują się największą aktywnością powierzchniową wśród

wymienionych surfaktantów – obniżają napięcie powierzchniowe wody w największym stopniu. W wielu pracach potwierdzono wysoką efektywność ramnolipidu w redukcji napięcia powierzchniowego wody. Minimalne wartości γ_{LV} wodnych roztworów RL podawane przez różnych autorów mieszczą się w przedziale od 25 do 35 mN m⁻¹.



Rys. 1. Wykres zmian napięcia powierzchniowego ramnolipidu w funkcji jego stężenia.

Abalos i in. (Abalos i in. 2001) wykorzystując odpady po rafinacji oleju sojowego oraz bakterie *Pseudomonas aeruginosa* AT10 otrzymali, wyizolowali i przebadali pod kątem fizykochemicznym dwie mieszaniny ramnolipidowe, które oznaczyli, jako M7 (R₂C₁₀C₁₀ + R₁C₁₀C₁₀ + R₂C₁₀C₁₂ + R₁C₁₀C₁₂ + R₁C_{12:1}C₁₀ + R₁C_{12:2} + R₁C_{8:2}) i M6 (R₁C₁₀C₁₀ + R₂C₁₀C₁₂ + R₁C₁₀C₁₂ + R₁C_{12:1}C₁₀ + R₁C_{12:2} + R₁C_{8:2}) oraz jeden czysty składnik – diramnolipid o wzorze ogólnym R₂C₁₀C₁₀. Wykorzystując dane z pomiarów napięcia powierzchniowego dla każdego układu wyznaczyli m.in. maksymalne nadmiarowe stężenie powierzchniowe Gibbsa, parametr pC_{20} oraz minimalną wartość napięcia powierzchniowego (Tab. 2).

Tab. 2. Właściwości powierzchniowe R₂C₁₀C₁₀ oraz mieszanin M6 i M7 w wodzie w 25°C (Abalos i in. 2001).

Badany związek	γ _{min} [mN m ⁻¹]	pC ₂₀	Γ _m [x10 ⁷ mg cm ⁻²]
R ₂ C ₁₀ C ₁₀	28.8	0.93	1.04
M6	27.3	0.09	1.16
M7	26.8	0.42	1.23

Z przedstawionych danych wynika, że skuteczność procesu adsorpcji RL na granicy faz woda-powietrze jest największa w przypadku R₂C₁₀C₁₀, mimo iż jego efektywność w tym procesie jest najniższa. Wszystkie wymienione w tabeli układy wykazują wysoką aktywność powierzchniową, a γ_{min} w każdym przypadku jest mniejsze od 30 mN m⁻¹.

Chen i in. (Chen i in. 2010) określili właściwości adsorpcyjne monoRL, diRL oraz mieszaniny obu związków. Pomiarzy przeprowadzili w różnych warunkach m.in. w buforach o pH wynoszącym 9 oraz 7, a także w ultra czystej wodzie UHQ (*Ultra High Quality*). Dane z pomiarów napięcia powierzchniowego poszczególnych roztworów wykorzystali do wyznaczenia Γ_m, A_{min} i γ_{min} (Tab. 3).

Tab. 3. Właściwości powierzchniowe monoRL, diRL oraz mieszanin R1/R2 w różnych warunkach środowiska (Chen i in. 2010).

monoRL (R1)			
	Γ_m [$\pm 0.1 \times 10^{-10}$ mol cm ⁻²]	A_{\min} [± 0.2 Å ²]	γ_{\min} [± 0.5 mN m ⁻¹]
pH=7 (bufor)	2.5	66	28.7
pH=9 (bufor)	2.2	77	31.2
woda UHQ	3.1	53	27.9
diRL (R2)			
pH=7 (bufor)	2.2	77	34.7
pH=9 (bufor)	2.1	80	37.4
woda UHQ	2.0	84	30.3
mieszanina R1/R2 w buforze (pH=9)			
R1:R2 (30:70)	2.0	83	34.7
R1:R2 (50:50)	2.1	78	33.5
R1:R2 (70:30)	2.2	76	32.4

Zdziennicka i Jańczuk (Zdziennicka i Jańczuk 2017) wyznaczyli termodynamiczne parametry adsorpcji wybranych biosurfaktantów na granicy faz woda-powietrze oraz określili tendencję do adsorpcji badanych związków w różnych temperaturach i porównali ją z tendencją do adsorpcji klasycznych surfaktantów. Z otrzymanych przez autorów wartości ΔG_{ads}^0 (obliczonych za pomocą równania (3)) wynika m.in., że rhamnolipid ($\Delta G_{ads}^0 = -43.55$ kJ mol⁻¹), jako anionowy związek powierzchniowo czynny w temperaturze 20°C ma wyższą tendencję do adsorpcji niż syntetyczne anionowe i kationowe ZPC np. SDS (-26.06 kJ mol⁻¹) czy CTAB (-29.20 kJ mol⁻¹), a zbliżoną do surfaktantów niejonowych np. Tritonu X-100 (-44.50 kJ mol⁻¹).

4. Podsumowanie

W literaturze znaleźć można opis procesu adsorpcji na granicy faz woda-powietrze większości klasycznych, syntetycznych surfaktantów powszechnie wykorzystywanych w przemyśle. Brak jest jednak jednoznacznych danych dla popularnych biosurfaktantów. Dane dostępne w literaturze często różnią się od siebie, co może wynikać z trudności w opisie procesu adsorpcji w przypadku związków nie tylko o bardzo skomplikowanych strukturach (a tym samym i o złożonym mechanizmie adsorpcji), ale także stanowiących zazwyczaj mieszaniny różnych homologów. Niemniej jednak dostępne dane literaturowe wskazują, że biosurfaktanty charakteryzują się wyższą tendencją do adsorpcji na granicy faz woda-powietrze niż klasyczne, syntetyczne ZPC. Związki te w znacznym stopniu obniżają napięcie powierzchniowe wody już przy niskich stężeniach, a wartość minimalnego napięcia powierzchniowego osiągnięta przez ich stężone roztwory jest niższa niż dla klasycznych surfaktantów.

5. Literatura

- Abalos A, Pinazo A, Infante MR i in. (2001) Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 17: 1367-1371.
- Chen ML, Penfold J, Thomas RK i in. (2010) Solution self-assembly and adsorption at the water-air interface of the monorhamnolipid and dirhamnolipid rhamnolipids and their mixtures. *Langmuir* 26: 17958-17968.
- De Boer JH (1953) *The Dynamic Character of Adsorption*. Oxford University Press: London.

- Gamboa C, Olea AF (2006) Association of cationic surfactants to humic acid: Effect on the surface activity. *Colloids and Surfaces A* 278: 241-245.
- Holmberg K, Jönsson B, Kronberg B i in. (2002) *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd: England 2002.
- Jańczuk B, Méndez-Sierra JA, González-Martín ML i in. (1997) Properties of decylammonium chloride and cesium perfluorooctanoate at interfaces and standard free energy of their adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science* 192: 408-414.
- Mańko D, Zdziennicka A, Jańczuk B (2014) Thermodynamic properties of rhamnolipid micellization and adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 119: 22-29.
- Marchant R, Banat IM (2012) Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology Letters* 34: 1597-1605.
- Müller MM, Hausmann R (2011) Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91: 251-264.
- Rosen JM (2004) *Surfactants and Interfacial Phenomena*, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken: New Jersey.
- Rosen MJ, Aronson S (1981) Standard free energies of adsorption of surfactants at the aqueous solution/air interface from surface tension data in the vicinity of the critical micelle concentration. *Colloids and Surfaces A* 3: 201-208.
- Sekhon Randhawa KK, Rahman PKSM (2014) Rhamnolipid biosurfactants – past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology* 5: 1-7.
- Tadros ThF (1995) *Surfactants in Agrochemicals*. Surfactant Science Series (Vol. 54), Marcel Dekker, Inc.: New York.
- Zdziennicka A, Jańczuk B (2017) Thermodynamic parameters of some biosurfactants and surfactants adsorption at water-air interface. *Journal of Molecular Liquids* 243: 236-244.
- Zdziennicka A, Szymczyk K, Krawczyk J, Jańczuk B (2012) Activity and thermodynamic parameters of some surfactants adsorption at the water-air interface. *Fluid Phase Equilibrium* 318: 25-33.

18. Wpływ budowy chemicznej biosurfaktantu na jego aktywność powierzchniową i krytyczne stężenie micelizacji

Influence of chemical structure of biosurfactant on its surface activity and critical micelle concentration

Mańko Diana, Górska Agnieszka

Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Mańko Diana: diana_manko@sggw.pl

Słowa Kluczowe: surfaktanty, napięcie powierzchniowe, micelle

Streszczenie

W literaturze można znaleźć liczne publikacje opisujące właściwości powierzchniowe (adsorpcyjne) i objętościowe popularnych biosurfaktantów. Jednakże często dane dotyczące tego samego związku bardzo się od siebie różnią. Fakt ten można wytłumaczyć tym, że surfaktanty pochodzenia naturalnego wytwarzane są przez organizmy żywe w postaci mieszaniny kilku, a nawet kilkunastu homologów związku syntetyzowanego z największą wydajnością. Skład ilościowy i jakościowy takiej mieszaniny uzależniony jest od wielu czynników. Największy wpływ na niego ma rodzaj producenta oraz charakter podłoża hodowlanego stanowiącego źródło węgla, azotu oraz mikro i makroelementów, ale ważne są także warunki panujące w trakcie syntezy (pH, temperatura, poziom natlenienia pożywki). W niniejszej pracy opisano pochodzenie i budowę chemiczną trzech wybranych biosurfaktantów drobnoustrojowych o istotnym znaczeniu praktycznym i korzystnej charakterystyce. Zwrócono szczególną uwagę na fragmenty hydrofilowe i hydrofobowe oraz grupy funkcyjne obecne w cząsteczkach tych związków. W pracy dokonano również przeglądu literaturowego zagadnień związanych z aktywnością powierzchniową i wartością krytycznego stężenia micelizacji opisywanych związków powierzchniowo czynnych. Na podstawie zgromadzonych informacji wyciągnięto wnioski dotyczące wpływu budowy chemicznej różnych homologów wybranych biosurfaktantów na ich aktywność powierzchniową i wartość najmniejszego stężenia, przy którym zaczynają formować się pierwsze micelle tych związków.

1. Wstęp

Biosurfaktanty, czyli związki powierzchniowo czynne (ZPC) pochodzenia naturalnego to asymetryczne cząsteczki syntetyzowane przez organizmy żywe, w których można wyróżnić dwie części o odmiennej polarności. Część polarną (hydrofilową) naturalnego surfaktantu stanowi zazwyczaj fragment pochodzenia cukrowego lub białkowego natomiast część niepolarną (hydrofobową, tzw. ogon) – kwas, hydroksykwas lub α -alkilo- β -hydroksykwas tłuszczowy. Związki syntetyzowane przez mikroorganizmy mogą mieć stosunkowo małe masy cząsteczkowe (do 1500 Da) tak jak np. glikolipidy, lipopeptydy czy fosfolipidy, albo mogą też występować pod postacią wielkich cząsteczek o masach sięgających 1000 kDa, przykładem są polimeryczne lipopolisacharydy i lipoproteiny (Krzyczkowska, Białecka-Florjańczyk 2012).

Obecność w cząsteczkach biosurfaktantów dwóch fragmentów o różnej polarności nadaje im zdolność do adsorpcji na granicy różnych faz, a tym samym redukcji napięcia międzyfazowego, a także do tworzenia agregatów koloidalnych rozmiarów zwanych micelami po przekroczeniu krytycznego stężenia micelizacji (CMC) związku. W praktyce aktywność powierzchniową biosurfaktantu i krytyczne stężenie jego micelizacji można wyznaczyć na podstawie analizy zmian napięcia powierzchniowego wodnych roztworów ZPC w funkcji ich stężenia. Surfaktant, który w największym stopniu redukuje wysokie napięcie powierzchniowe wody (ma najniższą wartością minimalnego napięcia powierzchniowego, γ_{\min}) jest najbardziej aktywny powierzchniowo. Niezwykle pożądane jest jednocześnie, aby ZPC oprócz wysokiej aktywności powierzchniowej cechował się również niską wartością CMC.

Aktywność powierzchniowa biosurfaktantów i wartość ich krytycznego stężenia micelizacji podobnie jak w przypadku klasycznych, syntetycznych związków powierzchniowo czynnych uzależnione są przede wszystkim od budowy chemicznej cząsteczek tych związków. Rodzaj grupy hydrofilowej i jej położenie w cząsteczce ZPC, a także obecność rozgałęzień, wiązań podwójnych i pierścieni aromatycznych w części hydrofobowej związku oraz przede wszystkim długość tej części to jedne z najważniejszych czynników wpływających na sposób ustawiania się cząsteczek biosurfaktantów na granicy faz w procesie adsorpcji czy rodzaj i wielkość tworzonych micel w procesie micelizacji. W przypadku naturalnych surfaktantów wpływ budowy związku na proces adsorpcji i micelizacji jest bardziej złożony gdyż biosurfaktanty stanowią mieszaninę homologów, które mogą działać na siebie antagonistycznie lub synergistycznie – wzmacniając bądź osłabiając siły odpychające między poszczególnymi cząsteczkami ZPC w nasyconych monowarstwach adsorpcyjnych i tworzących się micelach.

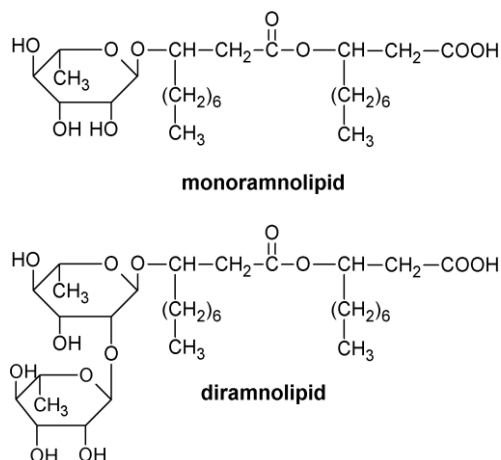
2. Opis zagadnienia

W grupie najczęściej opisywanych w literaturze biosurfaktantów drobnoustrojowych można wyróżnić dwa surfaktanty glikolipidowe, ramnolipid (RL) i soforolipid (SL), oraz lipopeptyd o właściwościach antybiotycznych – surfaktynę.

Ramnolipidy to niskocząsteczkowe surfaktanty wytwarzane z największą wydajnością przez pałeczki ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*). Do biosyntezy tego związku zdolne są nie tylko różne szczepy tej Gram-ujemnej bakterii, ale także inne gatunki *Pseudomonas* m.in.: *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. marginalia* czy *P. flavescens* (Gunther i in. 2005). Ponadto w literaturze znaleźć można informacje o innych rodzajach bakterii wytwarzających ramnolipidy jako wtórne produkty metabolizmu np. *Burkholderia* czy *Serratia* (Marchant i Banat 2012; Nalini i Parthasarathi 2014).

Ramnolipidy podobnie jak inne biosurfaktanty syntetyzowane są w postaci mieszaniny homologów. Z największą wydajnością wytwarzane są zazwyczaj dwie odmiany ramnolipidu oznaczalne ogólnie jako monoramnolipid (monoRL, R1) i diramnolipid (diRL, R2) (Rys. 1). MonoRL, czyli L-ramnozylo-β-hydroksydekanoilo-β-hydroksydekanoian (Rha-C₁₀-C₁₀) to taka forma związku w której jedna cząsteczka cukru (ramnozy) połączona jest z dwoma łańcuchami β-hydroksykwasu o dziesięciu atomach węgla w cząsteczce, natomiast w diRL – L-ramnozylo-L-ramnozylo-β-hydroksydekanoilo-β-hydroksydekanoianie (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) występują dwie cząsteczki ramnozy połączone wiązaniem α-1,2-glikozydowym (Müller i Hausmann 2011).

Część hydrofobowa RL występuje pod postacią jednego lub dwóch (w nielicznych przypadkach nawet trzech) łańcuchów β-hydroksykwasów połączonych ze sobą wiązaniem estrowym i zawierających od 8 do 16 atomów węgla w każdym z nich.



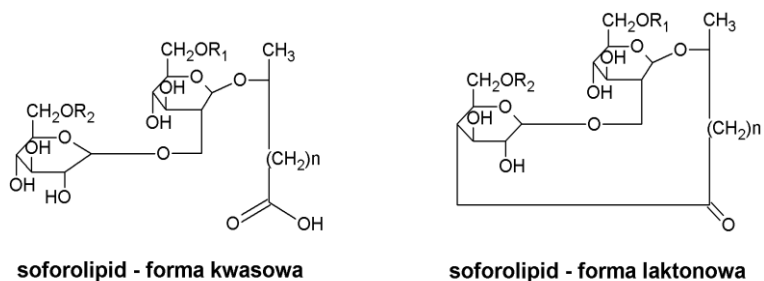
Rys. 1. Schemat budowy chemicznej cząsteczek mono i diramnolipidu.

Część hydrofilową ramnolipidu stanowi zarówno fragment cukrowy jak i grupa karboksylowa zlokalizowana na drugim końcu cząsteczki. Obecność grupy karboksylowej powoduje, że RL w roztworach wodnych dysocjują na aniony powierzchniowo czynne i kationy wodorowe, a tym samym zaliczają się do grupy anionowych ZPC.

Ramnolipidy cechują się wysoką aktywnością powierzchniową – już przy niewielkim stężeniu w znacznym stopniu obniżają wysokie napięcie powierzchniowe wody. Minimalne wartości napięcia powierzchniowego osiąganego przez ich wodne roztwory mieszczą się zazwyczaj w przedziale od 25 do 35 mN m⁻¹, przy czym forma mono związku jest bardziej aktywna powierzchniowo niż forma di (Helvaci i in. 2004).

Tendencja ramnolipidu do micelizacji również jest niezwykle wysoka. Pierwsze, małe i kuliste, agregaty RL tworzą się przy stężeniach nawet o kilka rzędów wielkości niższych niż w przypadku klasycznych surfaktantów. Wartość krytycznego stężenia micelizacji ramnolipidu uzależniona jest od składu zsyntetyzowanej mieszanin i mieści się w szerokim przedziale od 10 do 200 mg dm⁻³ (Müller i in. 2012).

Drugim dobrze poznanym biosurfaktantem glikolipidowym o istotnym znaczeniu praktycznym jest soforolipid (SL). Soforolipidy syntetyzowane są przez niepatogenne drożdże z rodzaju *Candida*, przy czym najwyższą efektywność w produkcji tych ZPC wykazują gatunki *C. apicola* i *C. bambicola* (Marchant i Banat 2012). Mikroorganizmy zdolne są do biosyntezy dwóch form soforolipidu – kwasowej i laktonowej (Rys. 2).



Rys. 2. Schemat budowy chemicznej cząsteczek soforolipidu (formy kwasowej i laktonowej).

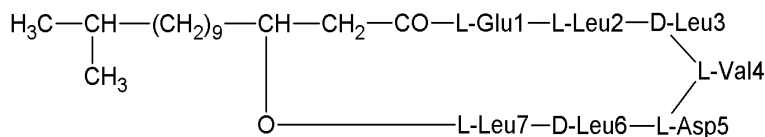
Częścią hydrofilową soforolipidu jest disacharyd – soforoza składająca się z dwóch jednostek glukozy połączonych wiązaniem β-1,2-glikozydowym. Część hydrofilowa związku związana jest glikozydowo z grupą hydroksylową łańcucha alifatycznego SL (zazwyczaj 17-hydroksy-C18/C16 nasyconego, mono- lub dienowego kwasu tłuszczowego). Podobnie jak w przypadku RL obecność grupy karboksylowej w cząsteczce surfaktantów soforozynowych nadaje formie kwasowej związku anionowy charakter. Forma laktonowa SL jest wynikiem estryfikacji grupy karboksylowej łańcucha hydrofobowego z czwartą grupą -OH drugiej jednostki glukozy (sporadycznie z szóstą pierwszej lub z szóstą drugiej cząsteczki glukozy). Ponadto szósta grupa hydroksylowa jednej lub obu jednostek glukozy może być acylowana (R₁ i/lub R₂). W mieszaninie soforolipidowej w największej ilości występuje zazwyczaj 6',6''-dioctan 1,4''-laktanu kwasu 17-L-([2'-O-β-D-glukopiranozylo-1''-β-D-glukopiranozylo]-oksy)-oktadekanowego (Dzięgielewska i Adamczak 2012; Marchant i Banat 2012).

Aktywność powierzchniowa soforolipidu jest nieco niższa niż ramnolipidu, a γ_{\min} jego wodnych roztworów mieści się w przedziale od ~ 35 do 40 mN·m⁻¹, przy czym wyższą efektywnością w redukcji napięcia powierzchniowego wody cechuje się forma laktonowa związku (Penfold i in. 2012). Soforolipidy charakteryzują się wysoką tendencją do micelizacji i już przy stężeniach rzędu 40-100 mg dm⁻³ w objętości roztworów powstają pierwsze agregaty SL, przy czym niższe CMC wykazuje forma laktonowa związku (Develter i Lauryssen 2010).

Dane literaturowe dotyczące właściwości powierzchniowych i objętościowych biosurfaktantów nie ograniczają się jedynie do związków glikolipidowych. Szczególnym

zainteresowaniem wśród naukowców cieszy się także amfifilowa surfaktyna wytwarzana przez laseczkę sienną (*Bacillus subtilis*) – Gram-dodatnią bakterię saprofityczną.

Surfaktyna należy do grupy cyklicznych lipopeptydów, a jej cząsteczka swoim wyglądem przypomina pętlę. Ta peptydowa pętla złożona jest z siedmiu α -aminokwasów zazwyczaj ułożonych w kolejności: kwas L-glutaminowy, L-leucyna, D-leucyna, L-walina, kwas L-asparaginowy, D-leucyna i L-leucyna (Rys. 3). Peptydowy pierścień zawiera pięć silnie hydrofobowych aminokwasów z niepolarnymi łańcuchami bocznymi (4 leucyny i walina), ale także dwa aminokwasy z polarnymi łańcuchami bocznymi obdarzonymi ładunkiem ujemnym (kwas glutaminowy i kwas asparaginowy) w związku z czym cała cząsteczka obdarzona jest ładunkiem ujemnym i surfaktyna należy do anionowych ZPC (Penfold i in. 2012).



surfaktyna

Rys. 3. Schemat budowy chemicznej cząsteczki surfaktyny.

W zależności od szczepu bakterii syntetyzujących surfaktynę niektóre aminokwasy w pętli peptydowej mogą być zastąpione innymi aminokwasami z apolarnymi łańcuchami bocznymi, co wpływa zarówno na aktywność powierzchniową jak i krytyczne stężenie micelizacji związku. Zamknięcie pętli peptydowej warunkowane jest utworzeniem wiązania laktonowego z częścią hydrofobową związku (łańcuchem β -hydroksykwasy) (Zdziennicka i Jańczuk 2017).

Surfaktyna jest niezwykle aktywna powierzchniowo – obniża napięcie powierzchniowe wody od wartości 72 maksymalnie nawet do 27 mN m⁻¹ (Cooper 1981), a jej krytyczne stężenie micelizacji jest rzędu 10⁻⁵ mol dm⁻³ (Liu i in. 2015).

3. Przegląd literatury

W literaturze znaleźć można liczne dane świadczące o wysokiej aktywności powierzchniowej i niskich wartościach krytycznego stężenia micelizacji wielu biosurfaktantów. Jednak dostępne dane dla tego samego związku bardzo często znacznie się od siebie różnią, co przede wszystkim jest wynikiem różnego składu ilościowego i jakościowego mieszanin syntetyzowanych przez organizmy żywe. Dobór biosurfaktantu do konkretnych zastosowań powinien być zatem poprzedzony analizą składu zsyntetyzowanego produktu oraz ewentualnym wyizolowaniem homologu o pożądanych właściwościach.

Biosurfaktantem o niezwykle korzystnej charakterystyce i wyjątkowo szerokim zakresie potencjalnych zastosowań jest ramnolipid. Chen i in. (2010) porównali aktywność powierzchniową i krytyczne stężenie micelizacji dwóch głównych homologów ramnolipidu wyizolowanych z komercyjnie dostępnej mieszaniny (Jeneil Biosurfactant Co.). Dane z pomiarów napięcia powierzchniowego roztworów RL sporządzonych w ultra czystej wodzie UHQ (*Ultra High Quality*) wykazały wyższą aktywność powierzchniową formy monoRL ($\gamma_{CMC} = 31.2 \pm 0.2$ mN m⁻¹) w porównaniu z formą di ($\gamma_{CMC} = 37.4 \pm 0.2$ mN m⁻¹). Z kolei homolog diRL miał niższe krytyczne stężenie micelizacji (CMC = 0.18 ± 0.02 mM) niż jego odpowiednik z jedną cząsteczką ramnozy w swojej strukturze (CMC = 0.36 ± 0.2 mM).

Haba i in. (2003) podkreślili istotny wpływ składu mieszanin ramnolipidowych na wartość minimalnego napięcia powierzchniowego i krytycznego stężenia micelizacji. Autorzy wykorzystali bakterie *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044 do otrzymania RL stosując olej po smażeniu, jako źródło węgla w hodowli. Analiza HPLC-MS otrzymanej mieszaniny wykazała obecność 11 homologów ramnolipidu, przy czym w największych ilościach były to następujące odmiany: Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ (34.12%), Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ (19.93%), Rha-C₁₀-C₁₀ (18.62%) i Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1}

(12.22%). Minimalne napięcie powierzchniowe zsyntetyzowanego produktu wynosiło 32.8 mN m^{-1} a jego krytyczne stężenie micelizacji – 108 mg L^{-1} . Autorzy porównując otrzymane wartości γ_{\min} i CMC z danymi literaturowymi wykazali wpływ składu ilościowego i jakościowego mieszanin ramnolipidowych, obecności wiązań nienasyconych i rozgałęzień w części hydrofobowej związku oraz jej długości na te parametry. Podkreślili m.in. fakt, iż w przypadku homologów RL zawierających również nienasycone łańcuchy węglowodorowe w cząsteczce uzyskiwane wartości CMC są większe niż dla analogicznych układów nasyconych.

Hörmann i in. (2010) wykorzystali bakterie *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T oraz podłoże hodowlane wzbogacone w glukozę do syntezy RL. Okazało się, że wykorzystanie innego gatunku bakterii w znacznym stopniu wpływa na skład syntetyzowanej mieszaniny. W otrzymanym przez autorów produkcie dominował nie homolog Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ jak w przypadku bakterii *Pseudomonas* tyłko Rha-Rha-C₁₄-C₁₄, który po wyizolowaniu obniżał napięcie powierzchniowe wody do 29.4 mN m^{-1} a jego pierwsze agregaty micelarne powstawały w przedziale stężenia od 15 do 20 mg L^{-1} .

Drugi biosurfaktant glikolipidowy opisany w niniejszej pracy – soforolipid, podobnie jak ramnolipid należy do związków wysoce biodegradowalnych i biokompatybilnych środowiskowo. Daverey i Pakshirajan (2010) do biosyntezy soforolipidu wybrali drożdże *Candida bombicola*, które hodowali na mieszanym podłożu hydrofilowym (odbiałczona serwatka i glukoza). Wyizolowany i oczyszczony biosurfaktant okazał się (17-hydroksyoktadekanowym)-1'4"-laktone-6'6"-diacetylowanego soforolipidu, którego krytyczne stężenie micelizacji wynosiło 27.17 mg l^{-1} , a minimalne napięcie powierzchniowe jego wodnych roztworów – 34.18 mN m^{-1} .

Kim i in. (2005) przeprowadzili analizę właściwości powierzchniowych i objętościowych soforolipidu syntetyzowanego przez drożdże *Candida bambicola* ATCC222 114 wykorzystując ciemny olej sojowy (produkt uboczny przetwarzania oleju kukurydzianego) w charakterze źródła węgla w procesie biosyntezy. W otrzymanej mieszaninie dominowała forma laktonowa związku, przy czym minimalna wartość napięcia powierzchniowego produktu wynosiła 48 mN m^{-1} , a jego CMC – 150 mg l^{-1} . Autorzy porównali też uzyskane wartości γ_{\min} i CMC z danymi dla mieszanin zsyntetyzowanych przy użyciu innych substratów organicznych. I tak, gdy w procesie biosyntezy soforolipidu zastosowano olej kukurydziany to dominującą formą w otrzymanym produkcie była forma kwasowa SL (85.49 %) o γ_{\min} i CMC wynoszących odpowiednio 41 mN m^{-1} i 82 mg l^{-1} . Natomiast, gdy użyto oleju sojowego w mieszaninie nadal dominowała forma kwasowa soforolipidu (96.06%), ale o nieznacznie większej aktywności powierzchniowej ($\gamma_{\min} = 40.5 \text{ mN m}^{-1}$) i większym CMC (88 mg l^{-1}).

Pod kątem fizykochemicznym przebadano również biosurfaktanty należące do innych grup m.in. znany lipopeptyd o właściwościach antybiotycznych – surfaktynę. Onaizi i in. (2012) wykorzystali do badań komercyjnie dostępną surfaktynę (Wako Pure Chemical Industries Ltd). Analizując dane literaturowe i wyniki badań własnych autorzy zauważyli istotny wpływ środowiska na właściwości powierzchniowe i objętościowe roztworów ZPC. Badana przez nich surfaktyna redukowała napięcie powierzchniowe wody do wartości 30.5 mN m^{-1} . Proces micelizacji związku rozpoczynał się przy stężeniu $\sim 47.2 \mu\text{M}$. Autorzy porównali otrzymane CMC z danymi literaturowymi krytycznego stężenia micelizacji surfaktyny w 100 mM buforze wodorowęglanu sodu (CMC = $9.4 \mu\text{M}$), jak również podkreślili spadek CMC badanego biosurfaktantu z $240 \mu\text{M}$ (w 5 mM buforze trihydroksyaminometanowym, Tris) do $8 \mu\text{M}$ w obecności jonów metalu i do $24.7 \mu\text{M}$ w buforze Tris o stężeniu 50 mM.

Zdziennicka i Jańczuk (2017) przeprowadzili badania właściwości powierzchniowych na granicy faz woda-powietrze i właściwości objętościowych komercyjnie dostępnej surfaktyny (Sigma Aldrich) w różnych temperaturach. Minimalna wartość napięcia powierzchniowego dla tego ZPC w temperaturze 293K wynosiła ok. 32 mN m^{-1} i zmniejszała się wraz ze wzrostem temperatury kolejno do ok. 30.5 mN m^{-1} (w 303 K) i 29.5 mN m^{-1} (w 313 K). Z kolei wartość krytycznego stężenia micelizacji surfaktyny zmieniała się następująco 9.66×10^{-6} (w 293 K), 8.51×10^{-6} (w 303 K) i $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (w 313 K).

4. Podsumowanie

Analiza danych literaturowych dotyczących aktywności powierzchniowej i właściwości objętościowych wybranych biosurfaktantów pozwala stwierdzić, że wartość minimalnego napięcia powierzchniowego i CMC uzależniona jest od budowy chemicznej homologów wchodzących w skład mieszanin syntetyzowanych przez organizmy żywe. Co więcej również warunki pomiaru (m.in. charakter środowiska, temperatura, siła jonowa roztworu) wpływają na ostateczną wartość minimalnego napięcia powierzchniowego roztworu i CMC badanego związku. Zatem aby porównywać właściwości powierzchniowe i objętościowe biosurfaktantów należałoby wyizolować konkretny homolog z mieszaniny i dokonywać pomiarów określonych parametrów fizykochemicznych badanych roztworów w takich samych warunkach. Jednak niezależnie od problemów z dokładnym określeniem minimalnego napięcia powierzchniowego roztworu naturalnego ZPC i jego CMC niezaprzeczalnym pozostaje fakt, że biosurfaktanty charakteryzują się niezwykle wysoką aktywnością powierzchniową i znacznie niższymi (nawet o kilka rzędów wielkości) wartościami krytycznego stężenia micelizacji niż syntetyczne ZPC.

5. Literatura

- Chen ML, Penfold J, Thomas RK i in. (2010) Mixing behavior of the biosurfactant, rhamnolipid, with a conventional anionic surfactant, sodium dodecyl benzene sulfonate. *Langmuir* 26: 17958-17968.
- Cooper DG, MacDonald CR, Duff SJB, Kosaric N (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 408-412.
- Develter DWG, Laurysen LML (2010) Properties and industrial applications of sophorolipids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112: 628-638.
- Daverey A, Pakshirajan K (2010) Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization. *Colloids Surf. B* 79: 246-253.
- Dzięgielewska E, Adamczak M (2012) Zastosowanie produktów ubocznych i odpadów w syntezie sofrolipidów przez *Candida bambicola*. *Nauki Inżynierskie i Technologia.* 3: 37-48.
- Gunther IV NW, Nuñez A, Fett W, Solaiman DKY (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2288-2293.
- Haba E, Pinazo A, Jauregui O i in. (2003) Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol. Bioeng.* 81: 316-322.
- Helvacı ŞŞ, Peker S, Özdemir G (2004) Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloid Surf. B* 35: 225-233.
- Hörmann B, Müller MM, Syldatk Ch, Hausmann R (2010) Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112: 674-680.
- Kim HS, Kim YB, Lee BS, Kim EK (2005) Sophorolipid production by *Candida bombicola* ATCC 22214 from a corn-oil processing byproduct. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 55-58.
- Krzyczkowska J, Białecka-Florjańczyk E (2012) Biotechnologiczna synteza związków powierzchniowo czynnych i przykłady ich praktycznego zastosowania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 4: 5-23.
- Liu J-F, Mbadinga SM, Yang S-Z i in. (2015) Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 4814-4837.
- Marchant R, Banat IM (2012) Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol. Lett.* 34: 1597-1605.
- Müller MM, Hausmann R (2011) Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91: 251-264.

- Müller MM, Kügler JH, Henkel M i in. (2012) Rhamnolipids – next generation surfactants? *J. Biotechnol.* 162: 366-380.
- Nalini S, Parthasarathi R (2014) Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. *Bioresour. Technol.* 173: 231-238.
- Onaizi S, Nasser MS, Twaiq FA (2012) Micellization and interfacial behavior of a synthetic surfactant-biosurfactant mixture. *Colloid Surface A* 415: 388-393.
- Penfold J, Thomas RK, Shen H-H (2012) Adsorption and self-assembly of biosurfactants studied by neutron reflectivity and small angle neutron scattering: glycolipids, lipopeptides and proteins. *Soft Matter* 8: 578-591.
- Zdziennicka A, Jańczuk B (2017) Thermodynamic parameters of some biosurfactants and surfactants adsorption at water-air interface. *Journal of Molecular Liquids* 243: 236-244.

19. Strategie wprowadzania systemu CRISPR/Cas9 do komórek roślinnych

Delivery strategies of the CRISPR / Cas9 system to plant cells

Olejnik Przemysław

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Biochemii i Biotechnologii, ul. Dojazd 11 60-632 Poznań

Opiekun naukowy: dr hab. Katarzyna Nuc

Olejnik Przemysław: przemyslaw.olejnik@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: T-DNA, modyfikacja genomu, ukierunkowana edycja genomu

Streszczenie

Znaczny wzrost populacji, szacowany w czasie najbliższych dekad przyczyni się do zwiększenia zapotrzebowania na żywność. Jednocześnie ewolucja patogenów roślin, przekładająca się na nasilenie chorób przez nie powodowanych, może znacząco ograniczyć wielkość plonów. Stąd też konieczne jest poszukiwanie nowych rozwiązań pozwalających na pokonanie tych ograniczeń.

Istniejące metody hodowli roślin takie jak krzyżowanie międzygatunkowe i wewnątrzgatunkowe oraz mutagenesa są procesami bardzo czasochłonnymi, wymagającymi przeprowadzenia wielu cykli krzyżowania i selekcji uzyskanych roślin potomnych. Również narzędzia biologii molekularnej, takie jak wiążąca się ze sprzeciwem społecznym transgeneza powszechnie kojarzona z GMO (Genetycznie Modyfikowany Organizm), nie pozwalają na uzyskanie zadowalającego rozwiązania.

Nowe możliwości stwarzają techniki edycji genomu takie jak, wywodzący się z adaptacyjnego systemu odpornościowego organizmów prokariotycznych, system CRISPR/Cas9. Pomimo wielkich nadziei jakie niesie ta technika dla hodowli nadal brak wydajnych i uniwersalnych metod wprowadzania jej elementów do wnętrza komórki. Niniejsza praca stanowi przegląd aktualnie stosowanych metod dostarczania systemu CRISPR/Cas9 w celu modyfikacji genomu roślin.

1. Wstęp

Organizacja Narodów Zjednoczonych szacuje, że do 2050 roku populacja ludzi wzrośnie o około 30% osiągając liczbę 9,6 miliarda. Wzrost gęstości zaludnienia może w tym okresie doprowadzić do znacznego podniesienia średniej rocznej temperatury spowodowanego efektem cieplarnianym. To z kolei może stać się przyczyną zwiększenia częstotliwości zdarzeń atmosferycznych niekorzystnych z agronomicznego punktu widzenia, takich jak długotrwałe susze. Ponadto w wyniku ewolucji patogenów roślin może dojść do nasilenia występowania chorób przez nie powodowanych. Procesy te w przyszłości spowodują z jednej strony wzrost zapotrzebowania na żywność, z drugiej natomiast mogą znacznie ograniczyć wielkość plonów. Nie ulega więc wątpliwości, że zachodzące zmiany będą stanowić wyzwanie zarówno dla rolników jak i hodowców roślin uprawnych.

Hodowla roślin ma na celu przenoszenie alleli warunkujących korzystne, z agronomicznego punktu widzenia, cechy do roślin uprawnych lub usuwanie tych genów, których ekspresja negatywnie wpływa na cechy produkcyjne lub jakość plonu. Współcześnie prowadzone prace hodowlane mają na celu zwiększenie wydajności plonowania roślin i utrzymanie jej na stałym poziomie w następnych pokoleniach, otrzymanie odmian odpornych na choroby powodowane przez patogeny oraz zwiększenie odporności na stresy abiotyczne takie jak susza, zasolenie podłoża czy niekorzystna temperatura. Innym kierunkiem hodowli jest usunięcie lub zmniejszenie zawartości substancji antyżywnościowych w plonie.

Podstawową metodą tradycyjnej hodowli roślin są krzyżowania międzygatunkowe oraz wewnątrzgatunkowe mające na celu przeniesienie pożądanego allelu z rośliny donorowej do rośliny hodowlanej. Proces ten wymaga niejednokrotnie wieloletniej selekcji roślin potomnych ujawniających korzystne cechy oraz wielu cykli krzyżowań wstecznych mających na celu ich utrwalenie w roślinie potomnej.

Do innych metod konwencjonalnej hodowli roślin należy mutagenеза. Spontanicznie pojawiające się zmiany w informacji genetycznej są skutkiem błędów polimerazy DNA, powstających w trakcie replikacji materiału genetycznego. Zjawisko to z punktu widzenia hodowli roślin jest korzystne, ponieważ jest źródłem zmienności genetycznej i prowadzi do powstawania nowych alleli. Spontaniczna mutagenеза jest jednak zjawiskiem rzadkim. W celu zwiększenia częstotliwości pojawiania się zmian w materiale genetycznym stosuje się mutagenезę indukowaną chemicznymi (np. czynniki alkilujące) lub fizycznymi (promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe) czynnikami mutagennymi. Wadą takiego podejścia jest brak kontroli nad miejscem powstawania mutacji. Zmiany genetyczne powodowane przez czynniki mutagenne pojawiają się w przypadkowych miejscach, niejednokrotnie odległych od docelowego *locus*. Powoduje to, podobnie jak w przypadku metody opisanej powyżej, konieczność przeprowadzenia selekcji mutantów o korzystnych cechach i serii krzyżowań mających na celu utrwalenie korzystnych zmian w populacji roślin potomnych.

Zupełnie odmiennym spojrzeniem jest zastosowanie narzędzi biologii molekularnej w hodowli roślin. Podejście to polega na wprowadzeniu genu pochodzącego z innego organizmu (transgenu) do komórki rośliny docelowej za pomocą narzędzi inżynierii genetycznej. Podstawowymi metodami transgenezy stosowanymi w hodowli roślin jest agroinfiltracja z zastosowaniem bakterii z rodzaju *Agrobacterium* oraz transformacja protoplastów z użyciem metody wstrzeliwania lub zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych za pomocą glikolu politetylenowego. Uzyskane w ten sposób rośliny należą do organizmów modyfikowanych genetycznie (GMO). Aktualnie uprawa roślin genetycznie modyfikowanych budzi ogromne kontrowersje na całym świecie i jest zakazana w wielu krajach w tym w Polsce. Sprzeciw społeczny dotyczący uprawy roślin uzyskanych tą metodą wynika zarówno z obawy przed niekontrolowanym przenoszeniem transgenu na inne odmiany i gatunki, zubożeniem flory naturalnych ekosystemów jak i ryzykiem produkcji przez zmodyfikowany organizm alergenów i substancji toksycznych. Ostatnie z wymienionych obaw wynikają z braku kontroli nad miejscem wbudowania transgenu w materiale genetycznym biorcy co może prowadzić do przerwania ciągłości niektórych genów i utraty funkcji przez kodowane przez nie białka. Co w konsekwencji może stać się przyczyną przerwania szlaków metabolicznych i nagromadzenia w komórce produktów pośrednich.

Szansę na przezwycięzenie powyższych problemów dają nowe metody edycji genomu oparte na specyficznych nukleazach takie jak ZFN (ang. *Zink-Finger Nucleases*, nukleaza z domeną palca cynkowego), TALEN (ang. *Transcription Activator-like Effector Nucleases*, nukleaza z domeną specyficznie wiążącą DNA) oraz najnowszy system CRISPR/Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) gdzie za specyficzność rozpoznawania docelowej sekwencji odpowiada krótka, komplementarna do niej cząsteczka RNA.

2. Opis zagadnienia

CRISPR/Cas9 to narzędzie edycji genomu wywodzące się z organizmów prokariotycznych. Stanowi bardzo rozpowszechniony w tej grupie organizmów system odporności nabytej przeciwko obcym elementom genetycznym takim jak wirusy czy plazmidy. Jego obecność stwierdzono u 90% przedstawicieli archeonów i około 45% gatunków bakterii (Rousseau i in. 2009).

Po raz pierwszy powtarzające się sekwencje palindromowe zaobserwowano już w 1987 r. (Ishino i in. 1987). Ich funkcja pozostała jednak nie znana aż do roku 2005, kiedy wykryto homologie pomiędzy fragmentami DNA występującymi pomiędzy powtórzeniami palindromowymi, a informacją genetyczną wirusów, co wskazywało na udział tego systemu w kształtowaniu odporności (Mojica i in. 2005). W roku 2007 potwierdzono, że zaobserwowana 20 lat wcześniej sekwencja w połączeniu z ekspresją genów Cas (kodujących nukleazy) zapewnia ochronę przed obcym materiałem genetycznym wnikającym do wnętrza komórki (Barrangou i in. 2007). Odkrycie możliwości kierowania systemem CRISPR/Cas9 poprzez zamianę sekwencji o długości 20 nt kodującej crRNA (CRISPR RNA), decydującej o specyficzności działania nukleazy Cas, dała możliwość na jego zastosowanie jako narzędzia modyfikacji genomu.

Edycja genomu organizmów eukariotycznych za pomocą systemu CRISPR/Cas9 wymaga wprowadzenia do wnętrza komórki dwóch jego komponentów: gRNA (ang. guide RNA) i białka Cas9. Tak zwany gRNA jest chimerą dwóch, naturalnie występujących cząsteczek RNA: CRISPR

RNA (crRNA) i transaktywującego RNA (tracrRNA). W komórkach prokariotycznych komplementarny do sekwencji docelowej crRNA odpowiada za naprowadzenie endonukleazy na konkretny fragment DNA. Z kolei tracrRNA stanowi strukturalne połączenie pomiędzy białkiem a CRISPR RNA. Endonukleaza Cas9 składa się z dwóch podjednostek (NUC i REC). W skład większej podjednostki REC wchodzi dwie domeny o aktywności nukleazy NHN i RuvC oraz miejsce oddziałujące z PAM (ang. protospacer adjacent motif) (Doudna i Charpentier 2014). Sekwencja motywu z jaką oddziałuje białko Cas9 różni się w zależności od stosowanego ortologu. Najczęściej stosowana endonukleaza Cas9 pochodząca z *Streptococcus pyogenes* do uzyskania aktywności wymaga obecności PAM o sekwencji NGG (gdzie N oznacza dowolny nukleotyd a G oznacza guaninę).

Po utworzeniu kompleksu składającego się z gRNA i endonukleazy Cas9, guide RNA łączy się zgodnie z zasadą komplementarności z sekwencją docelową naprowadzając na nią tym samym białko Cas9. Jeżeli w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji komplementarnej do gRNA znajduje się PAM dochodzi do oddziaływania pomiędzy DNA i białkiem Cas9, które jest warunkiem koniecznym dla wprowadzenia przez białko pęknięcia w dwuniciowej cząsteczce DNA.

Pojawienie się uszkodzenia w strukturze DNA prowadzi do aktywacji komórkowych systemów naprawczych, do których można zaliczyć łączenie końców niehomologicznych i rekombinację homologiczną. Pierwszy z nich prowadzi zwykle do insercji lub delekcji kilku nukleotydów w miejscu uszkodzenia. Pojawienie się mutacji typu indel w obszarze kodującym „docelowe” białko może z kolei spowodować przesunięcie ramki odczytu a w konsekwencji knock-out genowy. Naprawa uszkodzenia metodą rekombinacji homologicznej wymaga obecności fragmentu DNA, który zawiera sekwencje homologiczne do tych występujących po obu stronach uszkodzenia. Jego obecność umożliwia aktywację mechanizmu, który usuwa uszkodzenie wraz z otaczającą je sekwencją i w ich miejsce wprowadza nieuszkodzony fragment posiadający na obu końcach sekwencje homologiczne. Aktywacja tego mechanizmu umożliwia nie tylko naprawę uszkodzonego materiału genetycznego ale również wprowadzenie genu w ściśle określonym miejscu (knock-in).

System CRISPR/Cas9 stanowi obecnie bardzo popularne narzędzie edycji genomu, które znalazło zastosowanie u niemal każdej grupy organizmów. Jednakże pomimo wielu zalet system ten nie jest wolny od wad. Najważniejszą spośród nich jest niewątpliwie ryzyko edycji genomu poza miejscem docelowym oraz, w przypadku roślin, brak uniwersalnych metod wprowadzania gRNA i białka Cas9 do wnętrza komórki.

3. Przegląd literatury

System CRISPR/Cas9 jest aktualnie jednym z najczęściej stosowanych narzędzi edycji genomu. Jego popularność wynika z niezawodności, łatwości projektowania gRNA, dużej elastyczności oraz możliwości wprowadzenia modyfikacji w sposób ukierunkowany. Dodatkową zaletę stanowi fakt, że roślin uzyskanych z zastosowaniem CRISPR/Cas9 wielokrotnie nie można odróżnić od otrzymanych z wykorzystaniem konwencjonalnych metod hodowli, ze względu na brak transgeny. Pozwala to na uniknięcie trudnego i czasochłonnego procesu legislacyjnego (Paul i Qi 2016). Jednakże wprowadzanie elementów systemu jest nadal jedną z najpoważniejszych barier ograniczających jego szerokie zastosowanie w edycji genomów różnych gatunków (Baltes i in. 2014).

Metody dostarczania gRNA i endonukleazy Cas9 można podzielić na pośrednie i bezpośrednie. Metody bezpośrednie oparte są na wprowadzeniu odpowiedniego konstruktów genowego z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* lub wirusów.

Bakterie z rodzaju *Agrobacterium* to gram-ujemne fitopatogenne pałeczki, które zdolne są do wnikania do komórek roślinnych poprzez uszkodzone tkanki. Ich cechą charakterystyczną jest zdolność do przekazywania roślinie-gospodarzowi fragmentu plazmidu, który integruje się z jego materiałem genetycznym. W przypadku *A. tumefaciens* tę kolistą cząsteczkę DNA oznacza się jako Ti natomiast w *A. rhizogenes* Ri. Ich cechą wspólną jest obecność tak zwanego T-DNA (ang. transfer DNA), w obrębie którego znajdują się geny przekazywane roślinie. U dziko żyjących szczepów, T-DNA zawiera onkogeny i geny syntezy opin, które nie będąc przyswajanymi przez gospodarza stanowią doskonałe źródło substancji pokarmowych dla patogena. Z kolei w pozostałej części

plazmidu znajdują się geny odpowiadające za wirulencję i katabolizm opin. Badania wykazały, że usunięcie genów znajdujących się w obrębie T-DNA nie wpływa na transfer i integrację tego fragmentu kwasu nukleinowego z DNA rośliny-gospodarza, co umożliwia zastosowanie wektorów powstałych w oparciu o plazmidy *Agrobacterium* w transformacji roślin. Aktualnie do transformacji roślin stosuje się tak zwane wektory binarne, w skład których poza T-DNA wchodzi elementy umożliwiające ich replikację zarówno w komórkach *Agrobacterium* jak i *Escherichia coli*.

Konstrukcja genetyczna przeznaczona do transformacji roślin za pomocą wyżej wspomnianych bakterii wykorzystująca system CRISPR/Cas9, polega na zamianie genów syntezy opin i onkogenów na informację genetyczną zawierającą zwykle sekwencję promotora U3 lub U6 warunkującego transkrypcję gRNA, fragmentu DNA kodującego naprowadzający RNA oraz genu kodującego endonukleazę Cas9 pod kontrolą silnego promotora warunkującego jej ekspresję. Wprowadzanie elementów systemu CRISPR/Cas9 z wykorzystaniem bakterii z rodzaju *Agrobacterium* stanowi jedną z najczęściej stosowanych metod. Około 80% publikacji dotyczących edycji genomu roślin donosi o zastosowaniu tej metody w celu dostarczenia gRNA i nukleazy Cas9 do komórki (Ran i in. 2017).

Niewątpliwą zaletą metody opartej na agroinfiltracji jest duża pojemność wektora umożliwiająca wprowadzenie konstrukcji mającej na celu edycję wielu pozycji jednocześnie. Przykładem takiego podejścia jest eksperyment Xie i in. (2015) przeprowadzony na komórkach ryżu. W celu wprowadzenia zmian w wielu genach w miejsce fragmentu kodującego gRNA wklonowano sekwencje, w wyniku transkrypcji której otrzymano policistronowy tRNA-gRNA. W powstałym transkrypcie, każdy z fragmentów odpowiadających gRNA był oflankowany przez cząsteczkę tRNA. Taka konstrukcja umożliwiła uzyskanie pojedynczych gRNA prowadząc tym samym do wydajnego wprowadzenia zmian we wszystkich zaplanowanych sekwencjach docelowych.

Poza bakteriami z rodzaju *Agrobacterium* do wprowadzania elementów systemu CRISPR/Cas9 do komórek roślinnych coraz częściej stosuje się wektory powstałe na bazie materiału genetycznego wirusów. Powszechnie w tym celu wykorzystywane są geminiwirusy, które zostały użyte w celu edycji genomu między innymi *Nicotiana benthamiana* (Baltes i in. 2015). Jako nośnik informacji genetycznej kodującej gRNA zastosowano również wirusa mozaiki tytoniu (TMV), z użyciem którego możliwa była równoczesna edycja genomu wspomnianego wyżej gatunku w wielu pozycjach (Cody i in 2017). Wadą tego systemu jest niewielka pojemność wektora. Pojemność wektora opartego na *Geminiviridae* wynosi około 3 kb podczas gdy sam gen kodujący białko Cas9 wymaga pojemności ok 4.2 kb. W związku z tym wektory wirusowe mogą być zastosowane jedynie jako nośniki gRNA, ten zaś może być stosowany jedynie w przypadku edycji genomu roślin o stabilnej ekspresji wcześniej wprowadzonego genu kodującego endonukleazę Cas9 (Baltes i in. 2015; Cody i in 2017).

Poza opisanymi powyżej bezpośrednimi metodami wprowadzania elementów CRISPR/Cas9 do komórek roślinnych możemy wyróżnić również metody pośrednie, których działanie opiera się na zastosowaniu czynników fizycznych lub chemicznych. Zaletą metod pośrednich jest możliwość przenoszenia wielu konstrukcji genowych jednocześnie. Ponadto zastosowanie tych metod jest niezależne od gatunku. Do najczęściej stosowanych technik z tej grupy należą mikrowstrzeliwanie oraz transformacja protoplastów.

Mikrowstrzeliwanie, nazywane również metodą biolistyczną polega na bombardowaniu komórek roślinnych mikrocząsteczkami złota opłaszczonymi przez cząsteczki DNA. Energię kinetyczną, niezbędną do pokonania ściany i błony komórkowej dostarcza wspomnianym cząsteczką tak zwane działo genowe (ang. gene gun). Po dostaniu się do wnętrza komórki DNA integruje się w przypadkowym miejscu z genomem gospodarza. Mikrowstrzeliwanie jest popularną metodą wprowadzania materiału genetycznego do komórki, ponieważ charakteryzuje się wysoką skutecznością, umożliwia wprowadzenie wielu konstrukcji jednocześnie i wykazuje skuteczność niezależnie od gatunku rośliny. Czynnikiem ograniczającym zastosowanie mikrowstrzeliwania jest obecność wielu kopii tego samego genu w transformowanej komórce co może prowadzić do niepożądanych efektów, takich jak supresja genu. Metodę biolistyczną z powodzeniem zastosowano między innymi w celu wyciszenia genów *OsBADH2*, *Os02g23823* i *OsMPK2* ryżu i genu *TaMLO* pszenicy (Shan i in. 2013). Ponadto wykazano przydatność tej metody w edycji genomu

wykorzystując rekombinację homologiczną w celu wprowadzenia genu fosfotransferazy higromycyny (HPT) do soi i wymiany fragmentu genu ALS2 kodującego syntazę acetylomleczanową u kukurydzy (Li i in. 2015; Svitashv i in. 2015). Należy podkreślić, że podobnych wyników nie uzyskano stosując transformację z wykorzystaniem bakterii z rodzaju *Agrobacterium*. Mikrowstrzeliwanie umożliwia również wprowadzenie do komórek transkryptów gRNA i nukleazy Cas9 uzyskanych *in vitro* oraz gotowych kompleksów gRNA-Cas9 (Liang i in. 2017; Svitashv i in. 2016).

Transformacja protoplastów to metoda wymagająca pozbawienia komórki jej ściany. W tym celu tkankę roślinną traktuje się mieszaniną enzymów cellulolitycznych, ksylogolitycznych i pektynolitycznych. Po zakończeniu hydrolizy elementów ściany komórkowej, pozbawione zewnętrznego rusztowania protoplasty przyjmują kształt kulisty. Na tym etapie jedyną barierą oddzielającą ich wnętrze od środowiska zewnętrznego jest półpłynna błona lipidowa. W celu wprowadzenia do wnętrza protoplastu materiału genetycznego lub białka należy doprowadzić do krótkotrwałego zwiększenia przepuszczalności błony co umożliwia wniknięcie makrocząsteczek do cytoplazmy.

Najczęściej stosowanymi metodami umożliwiającymi przedostanie się makromolekuł do wnętrza protoplastu jest elektroporacja i traktowanie glikolem polietylenowym (PEG). Błona komórkowa jest strukturą spolaryzowaną, to znaczy, że w skutek nierównomiernej dystrybucji jonów po obu jej stronach, pomiędzy jej wewnętrzną i zewnętrzną powierzchnią, powstaje różnica ładunków. Elektroporacja to metoda, która dzięki krótkotrwałym impulsom elektromagnetycznym prowadzi do przejściowej depolaryzacji błony komórkowej. Zjawisku temu towarzyszy powstanie rejonu hydrofilowego za pośrednictwem, którego możliwe jest wniknięcie makromolekuł do wnętrza protoplastu.

Uzyskanie chwilowej dezorganizacji błony komórkowej powodującej zwiększenie jej przepuszczalności jest możliwe również metodami chemicznymi. Dodatek glikolu polietylenowego (PEG) do pożywki zawierającej protoplasty prowadzi do stanu odwracalnej dezintegracji błony, w trakcie której możliwe jest przedostanie się makromolekuł do wnętrza komórki. Przykładem zastosowania tej metody jest wprowadzenie nukleoproteiny gRNA-Cas9 do protoplastów petunii w celu knock-out genowego (Subburaj i in. 2016).

Niewątpliwą zaletą metod pośrednich jest możliwość wprowadzania elementów systemu CRISPR/Cas9 w formie transkryptów uzyskanych *in vitro*, ufałdowanego białka lub gotowej do działania nukleoproteiny. Dzięki temu możliwa jest edycja genomu bez dostarczania obcego DNA i jego integracji z genomem komórki roślinnej. Uzyskane w ten sposób rośliny potomne nie posiadają w materiale genetycznym transgeny, którego obecność mogłaby powodować kontrowersję. Daje to nadzieję, że odmiany roślin uprawnych uzyskane z wykorzystaniem strategii pośrednich, nie wykorzystujące "obcego" DNA, nie będą podlegały wymaganiom i procesowi legislacyjnemu jakie stawiane są rośliną genetycznie modyfikowanym. Największą wadą tych metod jest z kolei trudność regeneracji roślin z protoplastów, szczególnie w przypadku roślin jednoliściennych.

4. Podsumowanie

System CRISPR/Cas9 jest obecnie jednym z najczęściej stosowanych narzędzi ukierunkowanej edycji genomu, umożliwiającym zarówno wyciszenie danego genu jak i wprowadzenie fragmentów DNA na drodze rekombinacji homologicznej. W niedalekiej przyszłości można spodziewać się wprowadzenia do uprawy, odmian roślin o zwiększonej odporności na patogeny czy wyższym plonowaniu uzyskanych z zastosowaniem systemu CRISPR/Cas9 (Li i in. 2017; Malnoy i in. 2017; Wang i in. 2014).

Pomimo wielkich nadziei wiązanych ze stosowaniem tego narzędzia edycji genomu w hodowli roślin w dalszym ciągu brak wydajnych i uniwersalnych metod dostarczania jego elementów do komórki roślinnej. Protokoły wprowadzania makrocząsteczek nie są idealne dla wszystkich gatunków roślin uprawnych, a ponadto ograniczone są do konkretnych tkanek i rodzajów hodowli *in vitro*. Większość eksperymentów prowadzonych aktualnie z wykorzystaniem CRISPR/Cas9 u roślin ma na celu wyciszenie genów. Niewiele jest natomiast badań nad zastępowaniem bądź wprowadzaniem dodatkowych genów z zastosowaniem mechanizmu

rekombinacji homologicznej. Wynika to z braku wydajnych metod wprowadzania wielu elementów systemu edycji genomu jednocześnie i wskazuje na konieczność dalszych badań nad optymalnymi metodami dostarczania elementów CRISPR/Cas9 do wnętrza komórki (Ran i in. 2017).

5. Literatura

- Baltes NJ, Hummel AW, Konecna E i in. (2015) Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system. *Nat Plants* 1:15145
- Baltes, NJ, Gil-Humanes, J, Cermak, T i in. (2014) DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell* 26: 151–163.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H i in. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses i prokariotes, *Science*, 315: 1709-1712
- Cody W, Scholthof H B, Mirkov TE (2017). Multiplexed gene editing and protein over-expression using a Tobacco mosaic virus viral vector. *Plant physiology*, pp-00411.
- Doudna JA, Charpentier E (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096
- Ishino Y, Shinagawa H, Makiano K i in (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product, *J Bacteriol*, 169:5429-5433.
- Li M, Li X, Zhou Z i in. (2016). Reassessment of the four yield-related genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in plant science*, 7.
- Li Z, Liu ZB, Xing A i in. (2015). Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol* 169, 960–970.
- Liang Z, Chen K, Li T i in. (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 8:14261.
- Malnoy M, Viola R, Jung MH i in. (2016). DNA-free Genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Frontiers in plant science*, 7.
- Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez i in. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements, *J Mol Evol*, 60:174-182
- Paul, JW, and Qi, Y (2016). CRISPR/Cas9 for plant genome editing: accomplishments, problems and prospects. *Plant Cell Reports* 35: 1417–1427.
- Ran, Y, Liang, Z, Gao C (2017). Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. *Science China Life Sciences*, 1-16.
- Rousseau C, Gonnet M, Le Romancer M i in. (2009) CRISPI: a CRISPR interactive database. *Bioinformatics* 25, 3317–3318.
- Shan Q, Wang Y, Li Ji in. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31, 686–688.
- Subburaj S, Chung SJ, Lee C i in. (2016). Site-directed mutagenesis in *Petunia*× *hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. *Plant cell reports*, 35(7), 1535-1544.
- Svitashev S, Schwartz C, Lenderts B, i in. (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 7, 13274.
- Svitashev S, Young JK, Schwartz C, i in. (2015). Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol* 169, 931–945.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, i in. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology*, 32(9), 947-951.
- Xie K, Minkenberg B, Yang Y (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system, *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 3570–3575.

20. Sandwichowe ftalocyjaniny lantanowców – synteza i właściwości

Sandwich lanthanide phthalocyanines – synthesis and characterization

Zakrzyk Maja, Słota Rudolf

Zakład Chemii Ogólnej, Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski

Opiekun naukowy: Prof. UO dr hab. inż Rudolf Słota

Zakrzyk Maja: maja87z@gmail.com

Słowa Kluczowe: kompleks makrocykliczny, europ, gadolin, spektroskopia UV-Vis, chromatografia kolumnowa

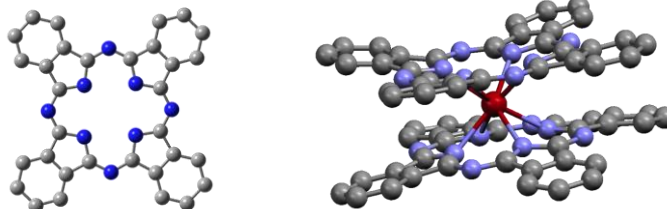
Streszczenie

Kompleksy ftalocyjaniny z Eu i Gd otrzymano w wyniku ogrzewania mieszaniny octanu lantanowca z 1,2- dicyjanobenzenem, odpowiednio w temperaturze 330°C i 370°C. Głównym produktem reakcji był sandwichowy kompleks typu LnPc₂ (Pc = C₃₂H₁₆N₈, Ln = Eu³⁺, Gd³⁺) oraz niewielka ilość odmiany LnPcX zawierającej przyłączony aksjalnie jon octanowy (X = AcO⁻). Surowy produkt oczyszczano chromatograficznie. Czystość otrzymanych kompleksów określano na podstawie widm UV – Vis oraz IR. Wykonano badania spektrochemiczne w DMF oraz dichlorometanie. Zbadano kinetykę fotodegradacji EuPc₂ i GdPc₂ pod wpływem promieni UV (366 nm). Stwierdzono, że oba związki są stosunkowo trwałe, natomiast nieco bardziej odporny na działanie promieni UV był kompleks z europem.

1. Wstęp

Ftalocyjaniny to syntetyczne strukturalne analogi porfiryny. Badania tych substancji rozpoczęto w latach 30-tych XX w. Na ich podstawie ustalono podstawowe właściwości fizykochemiczne ftalocyjaniny oraz jej kompleksów z metalami bloku *s*, *p* i *d* oraz określono ich strukturę. Sandwichowe kompleksy z lantanowcami otrzymano po raz pierwszy w latach 60-tych XX w. Metodę syntezy opracowali Plyushev i Shkhlover (1964) oraz Kirin i Moskalev (1965), oni też zapoczątkowali kompleksowe badania tych substancji. Związki te zostały uznane za jedne z najciekawszych materiałów molekularnych otrzymanych w XX w. (Dyrda i in. 2002; Leznoff i in. 1996; Kirin i in. 1965).

Strukturę cząsteczki ftalocyjaniny przedstawiono na rysunku 1a. Stanowi ona aromatyczny i bardzo stabilny układ chromoforowy, utworzony z czterech grup benzopirolowych, połączonych mostkami metinowymi. Dzięki temu ftalocyjanina może tworzyć liczne kompleksy z metalami o zróżnicowanej budowie molekularnej. Mogą to być układy typowe, zawierające jeden lub dwa niepodstawione ligandy oraz złożone struktury, zawierające dwa lub trzy ligandy ftalocyjaninowe z dodatkowymi podstawnikami. Proste kompleksy ftalocyjaniny, zawierające jeden centralny jon metalu mają zwykle strukturę płaską. Duże jony metali, które nie mieszczą się w "oknie" utworzonym przez cztery wewnętrzne atomy azotu, mogą jednak powodować pewną deformację makropierścienia, polegającą na jego wygięciu i utworzeniu struktury wklęsłej. Na szczególną uwagę zasługują połączenia ftalocyjaniny z lantanowcami, które zdolne są do tworzenia kompleksów o strukturze sandwichowej (LnPc₂), gdzie jon metalu (Ln³⁺) koordynowany jest przez dwa ligandy ftalocyjaninowe (Rys.1b). Tego typu kompleksy, w zależności od środowiska, charakteryzują się dużą trwałością. (Słota i in. 2003; Dyrda i in. 2002; Leznoff i in. 1996, Słota 1995, Słota i in. 2002; Kirin i in. 1967, Słota i in. 2012).



Rys. 1. a) struktura molekularna makropierścienia ftalocyjaniny, Pc (C₃₂H₁₆N₈) b) struktura sandwichowa EuPc₂; atomy C – szare, N – niebieskie, Eu – czerwony.

Ftalocyjaniny to związki o ogromnym potencjale aplikacyjnym. Obszar ich możliwych zastosowań to elektronika (półprzewodniki), optoelektronika (wyświetlacze, diody LED, lasery), fotowoltaika (fotoogniwa, panele słoneczne), katalizatory, sensory chemiczne i optyczne oraz ciekłe kryształy. Ze względu na ich aktywność fotochemiczną związki te badane są również pod kątem ich zastosowania jako fotosensybilizatorów w fotodynamicznej terapii przeciwnowotworowej (PDT). (Wohrle 2012 i in.; Trytek i in. 2005; Słota 1995).

Właściwości fizyczne metalofalocyjanin w dużej mierze zależą od skompleksowanego metalu a także od rodzaju podstawników peryferyjnych. Strukturę molekularną ftalocyjanin można modyfikować chemicznie poprzez wymianę centralnego atomu metalu i/lub podstawników peryferyjnych bądź aksjalnych. Dzięki temu można wpływać na właściwości fizykochemiczne tych związków. (Słota i in. 1998; Słota 1995).

Difalocyjaniny lantanowców to związki o intensywnej niebieskozielonej barwie, silnie absorbujące światło w zakresie UV-Vis. Charakteryzują się dużą trwałością w różnych środowiskach. W szczególności podkreśla się ich odporność na działanie wysokiej temperatury. Wynika to z budowy elektronowej makropierścienia. W atmosferze beztlenowej ulegają rozkładowi powyżej 700°C. Duże znaczenie ma również trwałość kompleksów ftalocyjaniny w różnych rozpuszczalnikach. Ponadto związki te charakteryzują się stosunkowo dużą jak dla tej klasy materiałów przewodnością ciemną, ($10^{-6} - 10^{-2}$ S/cm), wykazują aktywność katalityczną oraz mają interesujące właściwości optoelektroniczne, m.in. zdolność do zmiany barwy pod wpływem pola elektrycznego (elektrochromizm). Difalocyjaniny lantanowców mają o kilka rzędów lepsze przewodnictwo (o charakterze półprzewodnikowym) od kompleksów z metalami bloku s, p i d. Związki te mają również właściwości paramagnetyczne, wynikające z obecności niesparowanych elektronów w podpowłoce 4f jonu centralnego (Ln^{3+}). (Słota 1995; Słota i in. 2008; Dyrda i in. 2003; Galbas 2015; De Saja i in. 2005).

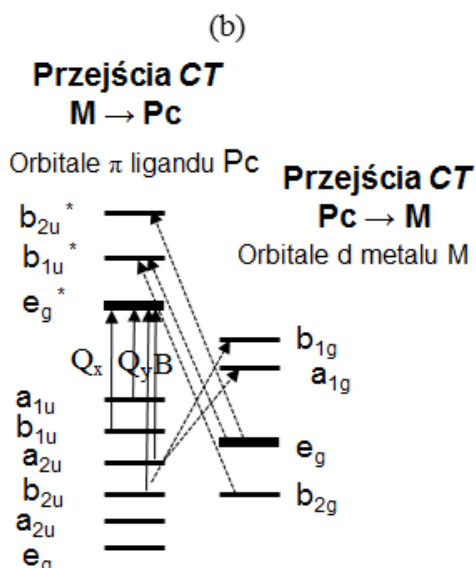
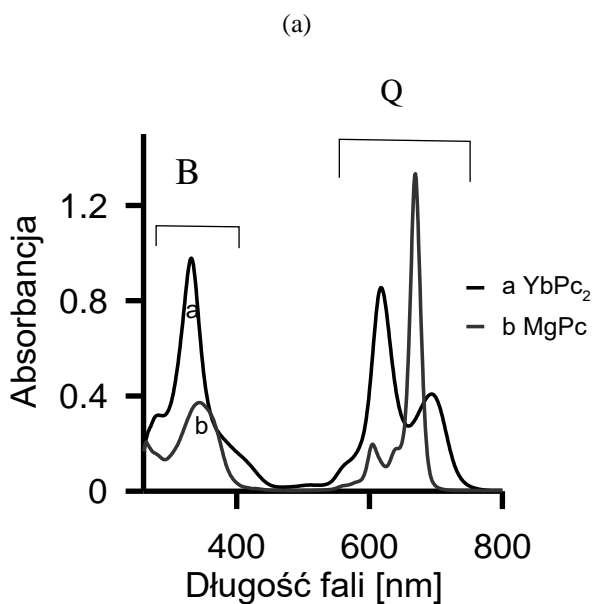
W badaniach ftalocyjanin najważniejszą rolę odgrywają elektronowe widma absorpcyjne w zakresie UV – Vis (Rys. 2a). Można w nich wyróżnić dwa intensywne pasma, B i Q, powstające w wyniku przejść elektronowych typu $\pi \rightarrow \pi^*$ w układzie chromoforowym makropierścienia (Rys. 2b). Pasma B (Soreta) leży w zakresie 330 – 350 nm i odpowiada mu przejście $a_{2u} \rightarrow e_g^*$. Natomiast pasmo Q leży w przedziale 600 – 800 nm i powstaje ono w wyniku przejścia elektronowego $a_{1u} \rightarrow e_g^*$. Ponieważ orbital a_{1u} ma wyższą energię niż a_{2u} , w widmach ftalocyjanin obserwuje się znaczne przesunięcie pasma Q w stronę „czerwonej” części widma. W przypadku typowych ftalocyjanin zawierających jeden makropierścień Pc (tzw. mono-ftalocyjaniny) pasmo Q jest ok. dwukrotnie bardziej intensywne od pasma B, podczas gdy dla sandwichowych difalocyjanin intensywność tych pasm jest porównywalna; w obydwu przypadkach zależy ona od rodzaju kompleksowanego metalu.

W rozpuszczalnikach polarnych (np. DMF), w widmach kompleksów ftalocyjanin o budowie sandwichowej pasmo Q ulega rozszczepieniu na dwie składowe Q_x i Q_y na skutek oddziaływania układów elektronowych obydwu makropierścieni.

Ponadto, w obszarze widzialnym mogą pojawić się również inne pasma, leżące zwykle w zakresie 450 – 600 nm, typu *charge transfer*, które związane są z przeniesieniem ładunku od metalu do ligandu (MLCT) lub od ligandu do metalu (LMCT). Natomiast w zakresie UV widma (190 – 300 nm) również można zaobserwować pasma o niewielkiej intensywności, oznaczane jako N, L i C. Należy podkreślić, że położenie oraz intensywność pasm w widmach UV – Vis kompleksów ftalocyjaniny zależy przede wszystkim od ich struktury molekularnej, rodzaju atomu centralnego oraz od rodzaju użytego rozpuszczalnika. (Słota 1995; Dyrda i in. 2003).

Wiele spośród kompleksów ftalocyjaniny wykazuje aktywność fotochemiczną. Stąd też związki te mogą być stosowane jako fotosensybilizatory (lub fotoaktywatory) w różnego rodzaju procesach chemicznych. Aktywność fotochemiczna metalofalocyjanin wynika z ich zdolności do silnej absorpcji fotonów w zakresie UV i "czerwonej" części widma (molowy współczynnik absorpcji $\epsilon > 10^5$), co z kolei umożliwia stosunkowo łatwe wzbudzenie elektronów w ich cząsteczkach. Będące w stanie wzbudzonym molekuly MPc mogą skutecznie oddziaływać z innymi składnikami układu, w wyniku czego mogą powstać różne cząsteczki o charakterze rodnikowym (np. jony tlenkowe, tlenorodniki, rodniki $\cdot\text{OH}$, czy tlen singletowy). Niemniej jednak, w pewnych warunkach absorpcja

zwłaszcza promieniowania UV może prowadzić do fotodegradacji układu molekularnego i rozpadu makropierścienia Pc. Jednym z głównych produktów fotolizy ftalocyjanin jest ftalimid. (Słota i in. 2003, Dyrda i in. 2003). Fotostabilność metaloftalocyjanin w roztworze zależy od skompleksowanego metalu, rodzaju użytego rozpuszczalnika a także od obecności w układzie reduktorów i utleniaczy. Szczególnie odporne na promieniowanie UV – Vis okazały się diftalocyjaniny lantanowców, zwłaszcza cięższych jonów Ln^{3+} .



Rys. 2. (a) Absorpcyjne widma elektronowe MgPc (monoftalocyjanina) oraz YbPc₂ (kompleks sandwiczowy) w DMF; (b) przejścia elektronowe odpowiadające pasmom B i Q oraz *charge transfer* (CT).

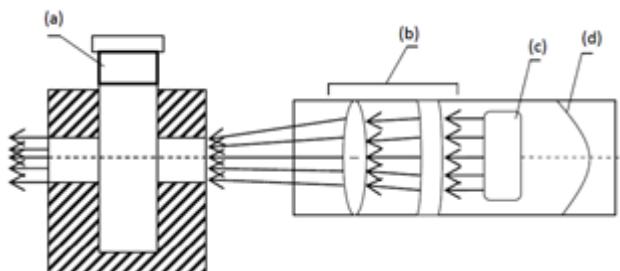
2. Materiały i Metody

a. Materiały

Octan europu i iterbu, $\text{Ln}(\text{OAc})_3 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ ($\text{Ln} = \text{Eu}, \text{Gd}$) zsyntezowano z odpowiednich tlenków (Ln_2O_3) (Sigma Aldrich) i 60% kwasu octowego (POCh); 1,2 dicyjanobenzen (Merck); Al_2O_3 pH 10 (Fluka); N,N – dimetyloformamid (DMF) i dichlorometan (CH_2Cl_2) (Sigma Aldrich).

b. Metody

Reaktor rurowy szklany z sondą temperaturową, ogrzewany elektrycznie (WCh Uniwersytet Opolski), oświetlacz UV z termostatem (Optel Opole), źródło UV - wysokociśnieniowa lampa rtęciowa Heraeus St-46 ($\lambda = 366 \text{ nm}$, irradiancja $I_{\text{UV}} = 500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), spektrofotometr UV-Vis-NIR Jasco – 670, kuwety kwarcowe o długości drogi optycznej 1,000 cm, spektrometr FTIR Nexus Thermo Nicolet (pastylki KBr).

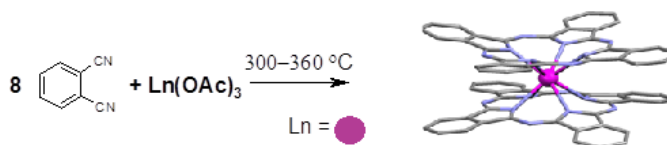


Rys. 3. Schemat układu optycznego do badań fotostabilności; (a) kuenta kwarcowa z próbką, umieszczona w termostatowanym uchwycie, (b) kwarcowy układ optyczny, (c) lampa UV (Heraeus St 46), (d) zwierciadło.

3. Wyniki

a. Synteza

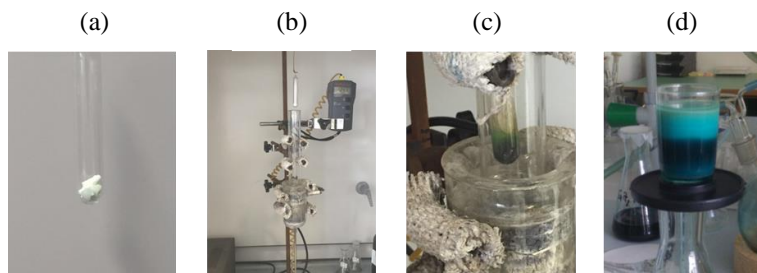
Diftalocyjaniny europu i gadolinu syntezowano wg metody opracowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego, polegającej na spiekaniu stałych reagentów w zatopionej ampułce szklanej, w kontrolowanych warunkach temperaturowych. (Słota R i in. 1998). Mieszaninę octan odpowiedniego lantanowca i 1,2 – dicyjanobenzenu w stosunku molowym 1:8 ogrzewano wg eksperymentalnie dobranego reżimu temperaturowego w reaktorze szklanym. Temperatura oraz czas reakcji zależą od rodzaju lantanowca. Optymalna temperatura syntezy dla EuPc_2 wynosi 330°C natomiast dla GdPc_2 370°C . Po osiągnięciu optymalnej temperatury mieszaninę ogrzewano przez 1h do momentu wykrystalizowania ciemnognatowego produktu. Głównym produktem reakcji jest sandwichowy kompleks typu LnPc_2 . Ponadto w układzie tworzy się również kompleks z jednym ligandem Pc (monoftalocyjanina), zawierający aksjalnie podstawiony ligand octanowy, LnPcX ($\text{X} = \text{AcO}^-$), jako produkt uboczny syntezy.



Rys. 4. Schemat procesu syntezy diftalocyjanin lantanowców.

Surowy produkt poddano ekstrakcji gorącym (80°C) dimetyloformamidem (DMF), a otrzymany ekstrakt oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej „flash” na złożu zasadowego tlenku glinu Al_2O_3 . Jako eluenta użyto DMF. Proces chromatograficzny jest bardzo skuteczny.

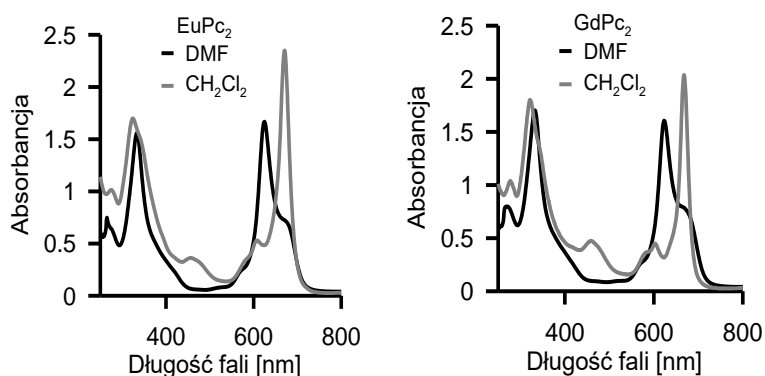
W ten sposób można nie tylko oddzielić formę sandwichową od kompleksu „mono” ale możliwe jest otrzymanie końcowego produktu o dużej czystości. Jakość otrzymanych kompleksów określano na podstawie widm UV –Vis oraz FTIR.



Rys. 5. Układ do syntezy LnPc₂ (a) ampulka z reagentami, (b) reaktor szklany z sondą temperaturową, (c) stopiony produkt podczas końcowego etapu syntezy (d) rozdział produktów reakcji metodą chromatografii „flash”

b. Widma absorpcyjne UV – Vis

Z przeprowadzonych badań wynika, że położenie i kształt pasm w widmach elektronowych kompleksów diftalocyjanin lantanowców zależą od rodzaju użytego rozpuszczalnika (Rys 6). Wynika to stąd, że cząsteczki rozpuszczalnika mogą w różny sposób oddziaływać z kompleksami ftalocyjaniny i wpływać na zmianę rozkładu gęstości elektronowej w układzie chromoforowym rdzenia makropierścienia. W polarnym rozpuszczalniku jakim jest DMF, badane kompleksy występują w postaci formy niebieskiej, w przypadku której pasmo Q rozdzielone jest na dwie składowe Q_x i Q_y (charakterystyczny "garb" w widmie, Rys. 6). Rozszczepienie pasma Q wynika z wzajemnego odpychania układów elektronowych poszczególnych makropierścieni. W przypadku kompleksów LnPc₂ długość fali przy której wartość absorpcji osiąga maksimum (λ_{max}) wyraźnie zależy od rodzaju koordynowanego metalu. Można również zauważyć przesunięcie pasma Q w stronę krótszych fal w miarę wzrostu liczby atomowej lantanowca (efekt hipsochromowy), (Tab. 1). Natomiast w niepolarnym rozpuszczalniku, np. w dichlorometanie, obserwuje się wyłącznie formę zieloną z nierozdzielonym pasmem Q (Rys. 6), której widmo przypomina kształtem typowe widma kompleksów z jednym ligandem Pc.

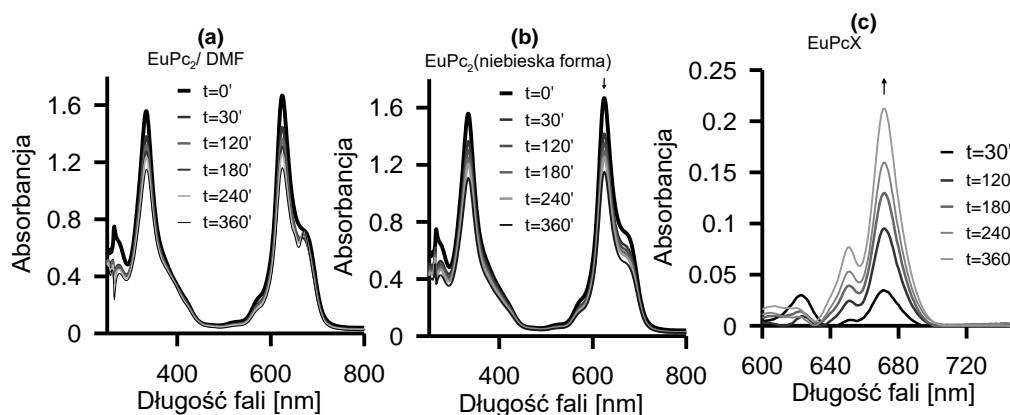


Rys. 6. Elektronowe widma absorpcyjne (UV – Vis) kompleksów EuPc₂ i GdPc₂ w DMF i CH₂Cl₂.

c. Fotostabilność

Badano wpływ promieniowania UV na trwałość układu molekularnego kompleksów EuPc₂ i GdPc₂ w roztworze DMF. Nie wykonano odpowiednich badań w dichlorometanie ze względu na

fotolityczny rozkład tego rozpuszczalnika w warunkach prowadzonego eksperymentu. Układy naświetlano w czasie 360 min promieniami UV o długości fali $\lambda = 366$ nm i natężeniu $I_{UV} = 500 \mu W/cm^2$. Częstotliwość pomiarów widma UV – Vis dobierano odpowiednio do badanego kompleksu. W obu przypadkach przebieg fotolizy był podobny. Zaobserwowano stopniowe zmniejszenie intensywności pasm B oraz Q, świadczące o postępującej fotodegradacji kompleksów, (Rys. 7). Stwierdzono, że część kompleksu $LnPc_2$ rozkłada się do formy "mono" ($LnPcX$) o czym świadczy pojawienie się pasma przy długości fali 671 nm (Rys. 7a, na przykładzie $EuPc_2$). W celu określenia efektywnej stałej szybkości fotodegradacji (k) badanych kompleksów, zarejestrowane ("surowe") widma (Rys. 7a) poddano odpowiedniej obróbce przy użyciu oprogramowania analitycznego spektrofotometru (SpectraManager v. 2.0), dzięki czemu możliwe było rozdzielenie składowych, związanych z formą niebieską $LnPc_2$ (Rys. 7b) oraz z formą "mono" $LnPcX$ (Rys. 7c).

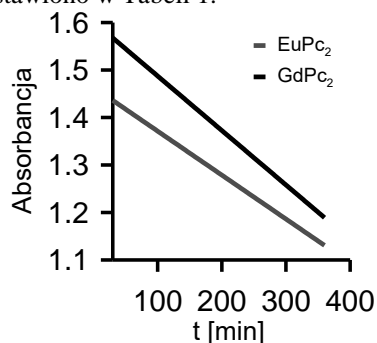


Rys. 7. Zmiany w widmie UV – Vis dla $EuPc_2$ w DMF pod wpływem promieni UV (a) "surowe" widmo, (b) widmo formy niebieskiej (c) tworzenie formy "mono" $EuPcX$.

Na podstawie zmian absorbancji (A) dla pasma Q w czasie (t), wyznaczono krzywe kinetyczne $A = f(t)$ (Rys.8). Analiza obydwu zależności (program CurveExpert 1.3) wykazała, że przebiegi tych krzywych mają charakter eksponencjalny, co oznacza, że kinetyka badanych procesów, niezależnie od rodzaju ftalocyjaniny, odpowiada reakcji I rzędu. W każdym przypadku współczynnik korelacji wynosił $R2 \geq 0,98$. Stałe szybkości fotodegradacji, k , dla badanych kompleksów zostały wyznaczone bezpośrednio z równania (1)

$$A = A_0 e^{-kt} \quad (1)$$

gdzie A – absorbancja roztworu po czasie naświetlania t (min), A_0 – absorbancja początkowa układu. Na podstawie wartości k obliczono czas, po którym 50% początkowej ilości kompleksu ulega rozkładowi ($\tau_{1/2}$). Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.



Rys. 8. Krzywe kinetyczne procesu fotodegradacji $EuPc_2$ i $GdPc_2$ w DMF.

Tab. 1. Położenie λ_{\max} pasma Q w widmie UV-Vis, stałe szybkości fotolizy (k) oraz czas 50% fotodegradacji ($\tau_{1/2}$) dla EuPc₂ i GdPc₂.

	λ [nm]	k [min ⁻¹]	$\tau_{1/2}$ [min]
EuPc ₂	625	$6,69 \cdot 10^{-4}$	1047
GdPc ₂	624	$7,87 \cdot 10^{-4}$	881

Porównując wartości k oraz $\tau_{1/2}$ można stwierdzić, że w przypadku EuPc₂ degradacja układu molekularnego zachodziła z mniejszą szybkością w porównaniu z kompleksem GdPc₂.

4. Wnioski

Podczas syntezy, obok głównego produktu (LnPc₂) powstaje niewielka ilość formy "mono" (LnPcX), którą można skutecznie oddzielić metodą chromatografii kolumnowej na złożu zasadowego Al₂O₃. Otrzymane kompleksy LnPc₂ silnie absorbują promieniowanie w zakresie bliskiego UV (pasmo B) oraz czerwonym (pasmo Q) widma. Rozszczepienie pasma Q jest nieco większe dla GdPc₂ niż EuPc₂, co świadczy o silniejszym oddziaływaniu jonu Gd³⁺ z poszczególnymi makropierścieniami Pc, niż w przypadku Eu³⁺. Badane kompleksy są trwałe w roztworze DMF oraz CH₂Cl₂ i nie są wrażliwe na działanie światła dziennego, natomiast pod wpływem promieniowania UV ulegają fotolizie. Kompleks z europem okazał się bardziej odporny na promieniowanie UV niż GdPc₂.

5. Literatura

- De Saja J A., Rodriguez – Mendez M L, (2005) Sensors based on double Decker rare earth phthalocyanines, *Advances in Colloid and Interface Science*, 116, 1 - 11
- Dyrda G, Słota R, Waclawek W, (2002) Ftalocyjaniny i ich makrocykliczne analogi, *Chemia Dydaktyka Ekologia Metrologia*, 7, 33-40
- Dyrda G, Słota R, Waclawek W, (2003) Fotochemiczna aktywność i stabilność metaloftalocyjanin w fazie ciekłej, *Na pograniczu chemii i biologii*, T. IX, H. Koroniak, J. Barciszewski (red.), Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 103-110
- Galbas M (2015) Praca doktorska, Uniwersytet Opolski
- Kirin I S, Moskalev P I, Makashev Yu A, (1965) Obrazovanie neobychnikh ftalocianinov redkozemelnykh elementov, *Zhurnal Neorganicheskoy Khimii*, 10, 1951-1953.
- Kirin I S, Moskalev P I, (1967) Issledovanie ftalocianinov s vysokoy udelnoy elektroprovodnostyu, *Zhurnal Fizicheskoy Khimii*, 41, 497-499.
- Kirin I S, Moskalev P I, Makashev Yu A, (1967) O novykh kompleksnykh soedineniyakh ftalocianina s redkozemelnyimi elementami, *Zhurnal Neorganicheskoy Khimii*, 12, 707-712.
- Phtalocyanines Properties and Applications, 1 st ed.; Leznoff C.C., Lever A.B.P., Eds.; VCH Publishers; New York, USA, 1989 -1993; Vol. 1-3; Willey – VCH: New York, USA, 1996; Vol. 4
- Słota R ,Dyrda G, Hofer M, Mele G, Bloise E, del Sole R, (2012) Novel lipophilic lanthanide bis – phtalocyanines functionalized by pentadecylphenoxygroups: synthesis, characterization and UV – photostability, *Molecules*, 17, 10738-10753.
- Słota R, Waclawek W, DyrdaG, (1998) Synteza kompleksów ftalocyjaniny z metalami., *Chemia Dydaktyka, Ekologia Metrologia*, 3, 51 – 58.
- Słota R, Waclawek W, (1993) Determination of Neodymium Diphthalocyanine and its Utilisation in Qualitative and Quantitative Evaluation of Synthetic Products, *Analytical Chemistry*, 38, 619-624
- Słota R, Dyrda G, Szczegot K, (2008) Sulfur dioxide oxidation catalyzed by photosensitized ytterbium diphtalocyanine, *Catalysis Letters*, 126, 247-252.
- Słota R (1995) Praca doktorska, Politechnika Warszawska, Warszawa.
- Słota R, Dyrda G (2003) UV photostability of metal phthalocyanines in organic solvents, *Inorganic Chemistry*, 42, 5743-5750.

- Słota R, Dyrda G, Waclawek W, (2002) Investigation of phthalocyanine crystals exposed to NO₂ ambient gas., *Polyhedron*, 21, 677 -681.
- Trytek M, Makarska M, Polska K i in. (2005) Porfiryny i ftalocyjaniny cz. I. Właściwości i niektóre zastosowania, *Biotechnologia*, 71, 109-127.
- Wohrle D, Shnurfal G, (2012) Practical applications of phtalocyanines from Dyes and pigments to materials for optical, electronic devices, *Macroheterocycles*, 3, 191-202.

Recenzenci rozdziałów w monografiach z kolekcji ISBN 978-83-65677-93-8:

dr hab. Damian Absalon, dr Jan Andrzejewski, prof. dr hab. Krzysztof Anusz, dr hab. inż. Piotr Arlet, dr hab. Katarzyna Bagan-Kurluta, dr hab. Maciej Barczewski, dr inż. Jacek Bartman, dr hab. inż. Marian Bartoszek, dr inż. Justyna Batkowska, dr inż. Piotr Bąska, dr hab. Teresa Bednarczyk, dr Jerzy Bednarski, dr Katarzyna Bergier, dr inż. Agnieszka Bielaszka, prof. dr hab. inż. January Bień, dr Barbara Bilewicz-Kuźnia, dr inż. Mariola Błaszczyk, dr Tomasz Błądek, prof. dr hab. Jacek Błęszyński, dr hab. Adam Bobryk, dr Michał Borodo, dr inż. Marta Borowska, dr inż. Tomasz Brynk, prof. dr hab. Jarosław Całka, dr Beata Całyniuk, dr hab. Witold Chabuz, dr hab. Piotr Chęłpiński, dr Dorota Chrobak-Chmiel, dr Agnieszka Chruścikowska, dr hab. Andrzej Ciążela, prof. dr hab. Jan Cielichowski, dr hab. inż. Adam Cwudziński, prof. dr hab. inż. Anna Cysewska-Sobusiak, dr Paweł Czarniecki, dr hab. Ewa Katarzyna Czech, dr inż. Małgorzata Czichy, dr inż. Klara Czyńska, dr Krzysztof Damaziak, dr hab. Paweł Daniel, dr hab. Anna Doliwa-Klepcka, dr Wioleta Drobik-Czwaro, prof. dr hab. Leszek Drodz, dr Renata Dudziak, prof. dr hab. inż. Włodzimierz Dudziński, dr inż. Krzysztof Durka, dr hab. Marzena Dyjakowska, dr Gabriela Dyrda, dr Magdalena Dziedzic, dr hab. Małgorzata Dzierżęcka-Gappa, dr inż. Małgorzata Dzieciół, prof. dr hab. inż. Marek Dziubiński, dr Marcin Dziwisz, prof. dr hab. Leonard Etel, dr hab. Beata Feledyn-Szewczyk, dr Wiesław Fidecki, dr hab. Marek Figura, dr hab. Paweł Filipiak, dr Piotr Filipiak, dr Jarosław Frączak, dr hab. Magdalena Gajęcka, dr inż. Mariusz Gamracki, prof. dr hab. Ryszard Gerlach, dr Artur Giełdoń, dr Wojciech Glac, prof. dr hab. Tomasz Głowiński, prof. dr hab. Agnieszka Gmitrowicz, dr hab. Sławomir Gonkowski, prof. dr hab. Józef Górniewicz, ks. prof. dr hab. Krzysztof Gózdź, dr Marcin Grąz, dr hab. Joanna Hawlena, dr Iga Hołyńska-Iwan, dr Magdalena Jaciow, dr Magdalena Jankowska-Wajda, dr inż. Tomasz Jankowski, dr inż. Paweł Jelec, dr hab. Andrzej Junkuszew, dr Agata Kabała-Dzik, dr Alena Kacmarova, dr Marta Kaczmarek-Ryś, dr hab. Hanna Karakuła-Juchnowicz, dr inż. Robert Kasner, prof. dr hab. inż. Nina Kazhar, dr inż. Krzysztof Kaziński, dr inż. Agata Kiciak, dr Dominika Kidaj, prof. dr hab. Marek Klimek, dr Joanna Klonowska, dr hab. Zbigniew Kobus, dr hab. Beata Kolny, dr Przemysław Kołodziej, dr inż. Bogusław Kołodziejski, dr hab. Jerzy Kopyński, dr Agnieszka Korchut, dr Grzegorz Korcyl, dr Monika Kornacka, dr hab. inż. Marta Kosior-Kazberuk, dr inż. Łukasz Kotwica, dr hab. Małgorzata H. Kowalczyk, dr Kamil Kowalski, prof. dr hab. Wojciech Kowalski, dr hab. Katarzyna Kozłowicz, dr hab. Piotr Krakowiak, dr Marlena Krawczyk-Suszek, dr hab. Marta Krenz-Niedbała, ks. dr hab. Piotr Kroczek, dr inż. Karol Król, dr Celina Kruszniak-Rajs, dr inż. Krzysztof Krzysztofowicz, dr Waldemar Kuczma, dr inż. Edyta Kudlek, dr Joanna Kula-Gradziak, dr hab. inż. Andrzej Kulig, dr inż. Tomasz Kulpa, dr Marcin Kunecki, dr hab. inż. Robert Kunkel, dr hab. Małgorzata Kwiecień, dr Marzanna Lament, prof. dr hab. Katarzyna Laskowska, dr inż. Magdalena Lech, dr inż. Justyna Libera, prof. dr hab. Tadeusz Linkner, prof. dr hab. Anna Lityńska, dr hab. Wiesław Lizak, dr inż. Aneta Lorek, dr hab. inż. Magdalena Janus, dr Tariq Mahmood, dr inż. Ewa Malczyk, dr hab. inż. Justyna Martyniuk-Pęczek, dr Sławomir Maślanka, dr hab. Jacek Matulewski, dr Artur Mazurek, dr Anna Michalska-Bañkowska, dr inż. Paweł Michalski, prof. dr hab. Jan Miciński, dr hab. ks. Bogusław Migut, dr hab. Krzysztof Mikołajczuk, dr Barbara Milewicz-Bednarska, prof. dr hab. inż. Piotr Miller, dr hab. Maria Mocarz-Kleindienst, dr Sylwia Mojsym-Korybska, dr Marta Mozgawa-Saj, dr inż. Adam Mroziński, dr hab. Dorota Narożna, dr hab. Oktawian Nawrot, prof. dr hab. Stanisław Sławomir Nicieja, dr Joanna Nieć, prof. dr hab. Mateusz Nieć, dr Jacek Niedźwiecki, dr hab. Jerzy Nita, dr Katarzyna Nowak, dr hab. Zbigniew Nowak, prof. dr hab. inż. Lucyna Nyka, dr hab. Ireneusz Ochmian, dr inż. Paweł Ogrodnik, dr hab. Dorota Olszewska-Słonina, dr hab. Krzysztof Oplustil, prof. dr hab. inż. Leszek Opyrchal, prof. dr hab. Lucjan Pająk, prof. dr hab. inż. Zbigniew Paszkowski, dr inż. Agnieszka Pawłowska, dr inż. Marek Piątek, dr inż. Paweł Pietrusiewicz, dr Karol Pilorz, dr hab. Monika Pitucha, dr hab. Magdalena Polak-Berecka, dr hab. Renata Polaniak, dr inż. Kornelia Polek-Dvraj, dr Piotr Pomorski, dr inż. Arkadiusz Popławski, dr Agnieszka Potyrańska, dr hab. Krzysztof Pudelko, dr Rafał Raczyński, dr hab. Zenon Rajfur, prof. dr hab. Konrad Rejda, dr hab. Piotr Romańczyk, dr inż. Andrzej Roszkowski, dr hab. Lucyna Rotter, dr hab. Monika Różańska-Boczula, dr inż. Jarosław Rubacha, dr inż. Maciej Rumiński, dr inż. Bogdan Ruszczak, dr hab. Justyna Rybak, dr hab. Stanisław Rybicki, dr Liliana Rytel, dr inż. Martyna Rzelewska, dr inż. Beata Sadowska, prof. dr hab. Zygmunt Sadowski, dr Artur Sajnog, dr Rafał Sawicki, dr hab. inż. Gabriela Siawrys, dr hab. inż. Jarosław Sidun, dr Grzegorz Siebielec, dr hab. inż. Waldemar Skomudek, dr hab. Agnieszka Skowrońska, prof. dr hab. Wojciech Skóra, prof. dr hab. Elżbieta Skrzypek, dr inż. Grzegorz Sławiński, dr hab. Beata Smolik, dr Marta Sobańska, prof. dr hab. Wojciech Sońta, dr hab. inż. Michał Stosiak, dr hab. Maria Straś-Romanowska, dr hab. Alicja Sułek, dr hab. Lech Szczegół, dr inż. Mirosława Szewczyk, dr Sebastian Szklener, dr Agnieszka Szudlarek, dr Łukasz Szleszkowski, dr hab. Magdalena Zulc-Brzozowska, dr hab. Józef Szymanski, dr Lidia Szymczak-Mazur, prof. dr hab. inż. Adam Maria Szymski, dr inż. Małgorzata Śmist, dr hab. Janusz Świniarski, dr hab. Bożena Targońska-Stępnik, prof. dr hab. inż. Elżbieta Trocka-Leszczynska, prof. dr hab. Paweł Turzyński, dr inż. Lechosław Tuz, dr hab. Witold Tyborowski, dr inż. Ewa Ura-Bińczyk, dr inż. Krystyna Urbańska, dr inż. Urszula Warzyńska, dr hab. Adam Waśko, dr inż. Dariusz Wawrentowicz, dr hab. Adrian Wiater, dr hab. Jacek Wilczyński, dr Lidia Anna Wiśniewska, dr hab. Piotr Wiśniewski, dr inż. Agnieszka Witecka, dr Wojciech Witkowski, dr inż. Alicja Wodnicka, dr Krzysztof Kamil Wojtanowski, dr hab. Filip Wolański, dr Łukasz Wolko, dr hab. Karolina Wójcik, prof. dr hab. Maria Wróbel, dr inż. Joanna Wyczarska-Kokot, dr Adrian Zajac, dr hab. Przemysław Zalewski, dr hab. Jerzy Zalewski, dr hab. Bożena Zawadzka, prof. dr hab. Anna Zdziennicka, prof. Piotr Ziółkowski, prof. dr hab. Dariusz Zlotkowski, dr inż. Maciej Zwierzchowski

W kolekcji „Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce” (ISBN 978-83-65677-93-8) ukazały się:

1. Nauki przyrodnicze - Część I – Żywnienie i żywność
(online: ISBN 978-83-65917-96-6; druk: ISBN 978-83-65917-97-3)
2. Nauki przyrodnicze - Część II (online: ISBN 978-83-65917-99-7; druk: ISBN 978-83-65917-98-0)
3. Nauki przyrodnicze - Część III (online: ISBN 978-83-66139-00-8; druk: ISBN 978-83-66139-01-5)
4. Nauki przyrodnicze - Część IV (online: ISBN 978-83-66139-03-9; druk: ISBN 978-83-66139-02-2)
5. Nauki przyrodnicze - Część V (online: ISBN 978-83-66139-04-6; druk: ISBN 978-83-66139-05-3)
6. Nauki przyrodnicze - Część VI – Ochrona środowiska
(online: ISBN 978-83-66139-07-7; druk: ISBN 978-83-66139-06-0)
7. Nauki medyczne i nauki o zdrowiu - Część I (online: ISBN 978-83-65917-92-8; druk: ISBN 978-83-65917-93-5)
8. Nauki medyczne i nauki o zdrowiu - Część II (online: ISBN 978-83-65917-95-9; druk: ISBN 978-83-65917-94-2)
9. Nauki techniczne i inżynierskie - Część I – Budownictwo i architektura
(online: ISBN 978-83-66139-08-4; druk: ISBN 978-83-66139-09-1)
10. Nauki techniczne i inżynierskie - Część II (online: ISBN 978-83-66139-11-4; druk: ISBN 978-83-66139-10-7)
11. Nauki techniczne i inżynierskie - Część III (online: ISBN 978-83-66139-12-1; druk: ISBN 978-83-66139-13-8)
12. Nauki techniczne i inżynierskie - Część IV (online: ISBN 978-83-66139-15-2; druk: ISBN 978-83-66139-14-5)
13. Nauki techniczne i inżynierskie - Część V (online: ISBN 978-83-66139-16-9; druk: ISBN 978-83-66139-17-6)
14. Nauki humanistyczne i społeczne - Część I (online: ISBN 978-83-65917-83-6; druk: ISBN 978-83-65917-82-9)
15. Nauki humanistyczne i społeczne - Część II – Ekonomia, działalność gospodarcza i bankowość
(online: ISBN 978-83-65917-84-3; druk: ISBN 978-83-65917-85-0)
16. Nauki humanistyczne i społeczne - Część III (online: ISBN 978-83-65917-86-7; druk: ISBN 978-83-65917-87-4)
17. Nauki humanistyczne i społeczne - Część IV – Pedagogika, edukacja, rodzina
(online: ISBN 978-83-65917-89-8; druk: ISBN 978-83-65917-88-1)
18. Nauki humanistyczne i społeczne - Część V – Prawo i administracja
(online: ISBN 978-83-65917-90-4; druk: ISBN 978-83-65917-91-1)