

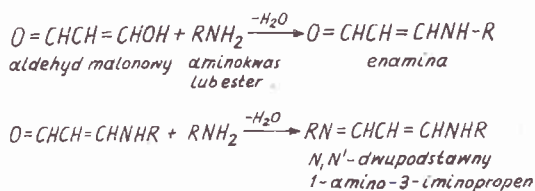
HIGIENA ŻYWNOŚCI ZWIERZĘCEGO POCHODZENIA

TADEUSZ WITAS

Międzyreakcje malonianów z aminokwasami, białkami, enzymami i z innymi związkami odżywczymi

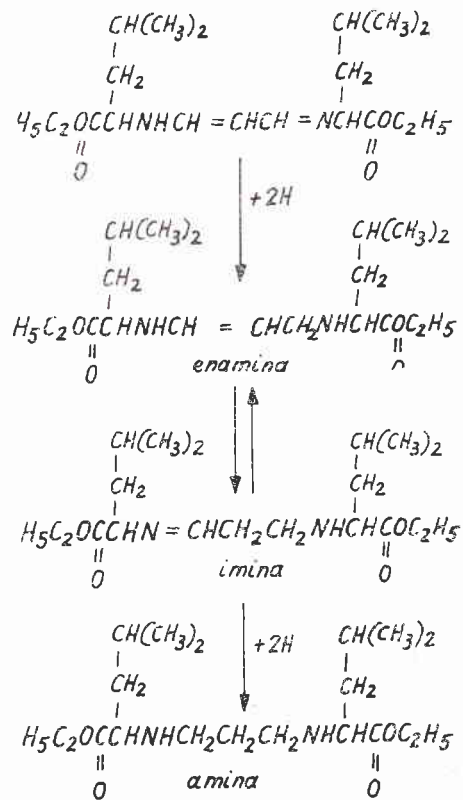
Z Instytutu Rybołówstwa Morskiego WSM w Szczecinie

Rozległość zmian biochemicznych w enzymach lub w innych białkach układów biologicznych, w paszach i w żywności pod wpływem peroksydacji lipidów wyjaśniają w dużym stopniu mechanizmy interakcji aktywnych intermediatów aminokwasów z dwualdehydem malonowym (DAM). Malonylacja aminokwasów, białek i enzymów wykazuje szczególną toksyczność dla żywych organizmów. Związki kompleksowe DAM z aminokwasami lub aminami pod wpływem światła UV charakterystycznie fluoryzują. W związkach tych, wytworzonych *in vivo*, stwierdzono duże zawartości alaniny, waliny, proliny a szczególnie duże glicyny. Wytwarzanie związków fluoryzujących związane jest z rozpadem aminokwasów i powstawaniem struktur aminowych w białkach pomiędzy funkcyjnymi grupami aminowymi a DAM. Struktury chromoforów fluoryzujących tworzą 2 mole związku aminowego z 1 molem DAM, z których powstaje N, N-dwupodstawny 1-amino-3-iminopropen (18, 29). Chromoforowy związek fluoryzujący typu zasad Schiffa $R-N=CH-CH=CH-NH-R_1$ otrzymano w wyniku sprzężeń poprzecznych DAM z biologicznie ważnymi aminami włącznie z RNA, DNA i fosfolipidami. W układach chromoforowych charakterystyczne spektra fluoryzujące uzyskano także z aminokwasami w temperaturze pokojowej stwierdzono izomeryzację cis-trans przy wiązaniach $C=C$ lub $C=N$ (8). Przebieg reakcji jest następujący:



Ryc. 1. Schemat międzyreakcji dwualdehydu malonowego z aminokwasami

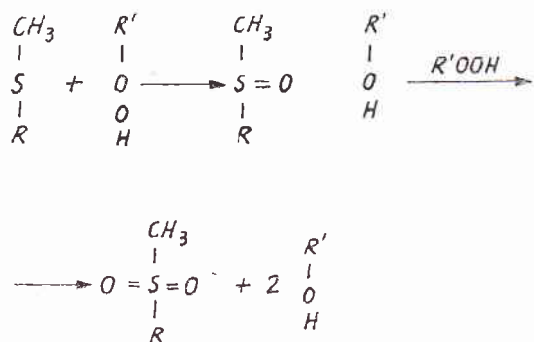
W strukturach polienowych aldehydów powstających w wyniku kondensacji β -oksyakroleiny bez udziału azotu stwierdzono ponadto obecność wiązania $C=C$. Sprzężone pochodne 1-amino-3-iminopropenu powstające z estru etylowego leucyny po stopniowej redukcji dają kolejno enaminy, iminę i aminę według następującego mechanizmu (8):



Ryc. 2. Wytwarzanie się pochodnych aminowych z estru etylowego leucyny

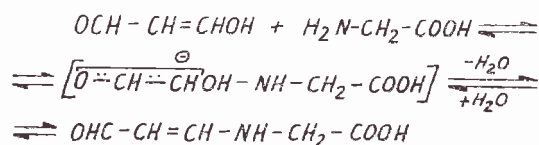
Redukcja sprzężonych zasad Schiffa pochodnych estru metyloвого waliny następuje poprzez ten sam mechanizm (8). Najbardziej labil-

nymi aminokwasami w wielu białkach pod wpływem utlenionych związków tłuszczowych są metionina, histydyna, cystyna, lizyna (23), glicyna, tyrozyna, arginina i tryptofan a także inne aminokwasy obecne w białku lizozymowym (10, 14). Ekspozycja metioniny na nadtlenki linolenianu powoduje powstawanie sulfotlenku metioniny:



Ryc. 3. Międzyreakcje metioniny z nadtlenkiem linolenianu

Szczególnie abiogenne działanie DAM w układach biologicznych wiąże się z lizyną, metioniną i z innymi resztami aminokwasowymi niektórych enzymów, np. z rybonukleazą A, która może być sprzęgana poprzecznie i inaktywowana przez ten aldehyd (8). Na podstawie badań chemicznych i spektralnych stwierdzono, że DAM i glicyna reaguje do postaci enaminy. Mechanizm reakcji obejmuje nukleofilową grupę aminową glicyny i α , β -nienasycony układ enolu karbonylowego aldehydu malonowego z utratą cząsteczki wody i wytworzeniem enaminy (10):

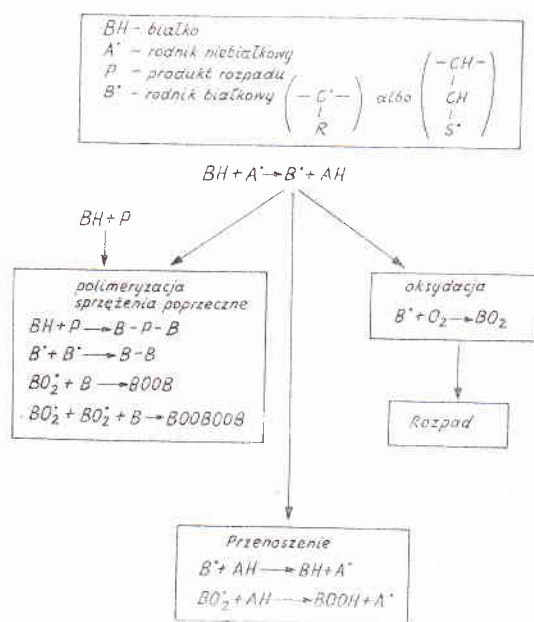


Ryc. 4. Międzyreakcje dwualdehydu malonowego z glicyną

Struktura enaminy glicyny, innych aminokwasów lub białek z DAM prowadzi do sprzężeń intra- i intermolekularnych, jako wynik rezonansowej stabilizacji cząsteczki (10) i prawdopodobnie *in vivo* stanowi jeden z procesów inaktywacji szkodliwych biologicznie związków. Pochodne malonyłowe aminokwasów, białek, enzymów i innych związków prowadzą do powstawania ketonów, związków z grupami acylowymi, które likwidują dodatnie ładunki grup aminowych ($^+\text{H}_3\text{N}^+\text{R}$) i dostarczają ujemnych ładunków ($-\text{OOC}, \text{CH}_2, \text{CO}, \text{NH}, \text{R}$), zmie-

nają ładunki białek i enzymów. Blokowanie grup α i ϵ -aminowych prowadzi do modyfikacji z obniżeniem punktów izoelektrycznych białek, zmiany ich rozpuszczalności oraz zmiany charakterystyki i właściwości elektroforetycznych białek (27). Badania przeprowadzone na hodowli komórek fibroblastów ludzkich (27) potwierdzają wyniki Crawforda i wsp. (11) otrzymane na zwierzętach, że DNA reaguje z DAM a proces ten jest niezwykle toksyczny dla żywych organizmów i żywych pojedynczych komórek. Zaobserwowano, że replikacja DNA pod wpływem DAM zostaje zahamowana. Produkty reakcji DNA z aldehydem są trwałe i pod wpływem dezoksyrybonukleazy tylko częściowo ulegają degradacji a przy nieznacznym podniesieniu temperatury następuje wzrost stopnia nierozpuszczalności kompleksu. Pod wpływem wzrastających ilości DAM następuje dalsze obniżenie liczby komórek i zmniejszenie ilości syntetyzowanych białek.

Białka i związki lipoproteinowe w substratach biologicznych ulegają ciągłym przemianom inter- i intramolekularnym. Międzyreakcje kompleksów gliko- i lipidobiałkowych są silnie katalizowane przez orientację dwustronną w układach ciała stałe — powietrze albo ciecz — powietrze (4). Oddziaływanie związków utlenienia tłuszczów z białkami lub z produktami ich rozpadu następuje w procesie kopolimeryzacji, w którym tworzą się związki wielkocząsteczkowe. Ciężar cząsteczkowy kopolimerów zależy od ciężaru cząsteczkowego źródła azotu. Najmniejszy jest z włączonym aminokwasem, średni z produktami hydrolizy białek a największy z białkami. Międzyreakcje lipidobiałkowe uważa się za najbardziej rozległy ob-

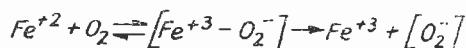


Ryc. 5. Schemat reakcji białek z utlenionymi lipidami

szar biochemicznych zmian w składnikach odżywczych pasz, żywności i zmian w tkankach żywych organizmów (3, 4). Schematycznie reakcje produktów utlenienia lipidów z białkami przedstawiono na ryc. 5:

W biochemicznych mechanizmach kopolimeryzacji wolnorodnikowych łańcuchów białek i tłuszczów lub ich produktów, w układach *in vitro* i *in vivo*, za wiązania poprzeczne wewnątrz- i międzycząsteczkowe tych związków uważa się DAM lub jego izomery jako prawdopodobnie najbardziej aktywny dwufunkcyjny reagent (1—4, 8—16, 22—27). W substratach białkowych o znacznej zawartości wody DAM w pH obojętnym istnieje w postaci uwodnionego anionu enolowego, nielotnego, wiązanego wiązaniem wodorowym i siłami elektrostatycznymi. W takiej postaci w paszach i w żywności ma zdolność do nagromadzania się i interakcji z aminokwasami, peptydami i z białkami oraz z innymi grupami związków biogennych (29).

Reakcja sprzęgania białek hemowych z utlenionymi lipidami wymaga obecności wody w układzie międzyfazowym lipidy — białka. Reakcje wiązania tlenu do białek hemowych w procesie utleniania z przenoszeniem ładunku z hemu do tlenu tworzą strukturę superoksoferrihemową (2). Reakcja ta jest odwracalna przy niskim ciśnieniu cząsteczkowym tlenu:



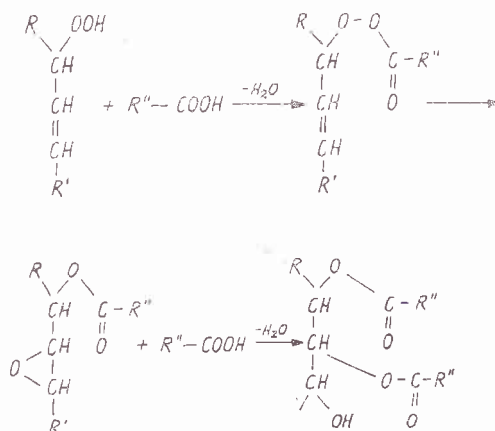
Ryc. 6. Schemat tworzenia się struktury superoksoferrihemowej w białkach hemowych

Dysocjacja superoksoferrihemu do postaci (O_2^-) rodnika supertlenowego i utlenianie hemu może przebiegać w sposób powolny. Rodnik supertlenku jest bardzo reaktywny, może reagować z wodą do postaci cząsteczkowego tlenu lub reagować z innymi związkami, tworząc rodniki nadtlenuków i hydronadtlenków.

Buttkus (3) wykazał, że DAM reaguje bardzo szybko z miozyną. Miozyna ryb w warunkach zamrażalniczych intensywnie reaguje z DAM, obniżając zdolność wiązania wody, rozpuszczalność i ilości wolnych grup ε-aminowych tych białek. Według Pedersena i wsp. (20) interakcje utlenionych lipidów z białkami są związane z denaturacją białek i wytwarzaniem się oligomerów. W wyniku reakcji hydronadtlenków z wolnymi grupami karboksylowymi cząsteczki białka, np. kolagenu, tworzą wiązania estrowe:

Hydronadtlenki mogą tworzyć także mostki pomiędzy dwoma łańcuchami peptydów (21). Roubal i Tappel (24, 25) sugerują, że nierozpuszczalność białek jest wynikiem interakcji w

układzie proteiny — proteiny zapoczątkowanej przez rodniki tłuszczowców. Denaturacją białek w wyniku międzyreakcji z unadtlenionymi lipidami i DAM ma charakter nieodwracalnych deformacji i uszkodzeń reagujących związków biogennych. Interakcje utlenionych lipidów z białkami mają charakter złożony, gdy w procesach przemian objęte są fosfolipidy i cholesterol. Przypuszcza się, że zmiany białek związane z toksycznym oddziaływaniem utlenionych związków malonalogennych w układach fosfolipidy — sterol mogą mieć powolny, lecz trwały i nieodwracalny wpływ na przepuszczalność błon organelli komórkowych oraz samej komórki, stając się przyczyną znacznej liczby schorzeń.



Ryc. 7. Reakcje utlenionych lipidów z wolnymi grupami karboksylowymi białek

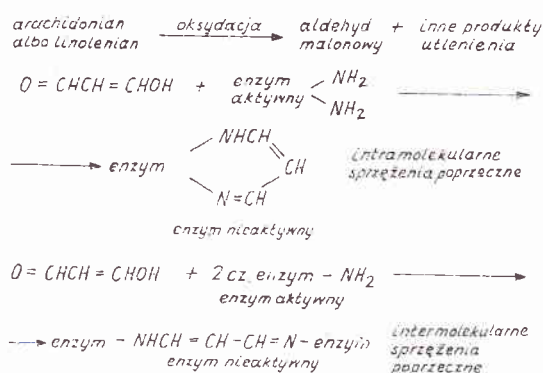
W wyniku peroksydacji błon mitochondriów *in vitro* z szorstkich mikrosomów następuje uwalnianie białek i lipoprotein oraz powstawanie DAM. Rekonstrukcja białek przez szorstkie mikrosomy jest hamowana konkurencyjnie przez lipoperoksydację błon i reakcje z malonalem. Wydaje się prawdopodobne, że w wyniku interakcji peroksydowanych lipidów w układach cholesterol — proteiny lub proteiny — fosfolipidy — cholesterol — kwas sialowy w błonach komórkowych i subkomórkowych substancją powodującą inter- i intramolekularne odkształcenia jest DAM, ponieważ może on powstawać z każdego z reagentów układu (1, 6, 14, 16, 18, 28, 29).

Reakcje deformacji białek pod wpływem peroksydacji lipidów i ich pochodnych, w tym głównie DAM, występującego w żywności jako kompleksie biosystemów, są ważnym czynnikiem biologicznym ze względu na toksyczność powstających związków, które w organizmach żywych wykazują nadal aktywność biochemiczną.

Produkty utlenionych tłuszczów oraz DAM oddziałują wielokierunkowo na układy enzymatyczne w organizmach żywych, głównie przez zmianę właściwości strukturalnych i funkcjonalnych kompleksów enzymatycznych, przez ich wzbudzenie, hamowanie i inaktywację (1—7, 9, 17, 24, 26). Stwierdzono, że spożywanie termicznie utlenionych tłuszczów wywołuje aktywację mikrosomalnych enzymów wątroby, nie tylko powoduje wzrost ciężaru wątroby i wzrost stężenia białek mikrosomalnych, lecz również zaobserwowano wzrost stężenia endogennego DAM w mitochondriach. Termicznie utlenione tłuszcze powodują wzrost pobudzenia różnych funkcji oksydaz, wzrost aktywności cytochromu P-450 i aktywności metylotransferazy S-adenozylometioniny: fosfadyloetanoaminy. Utlenienie tłuszczów stymuluje proliferację gładkiego retikulum endoplazmatycznego i aktywują kompleksy enzymów mikrosomalnych. Różne postacie utlenionych produktów olejowych były tak silnymi stymulantami, że ich wpływ na wzrost ciężaru wątroby, stężenie białek mikrosomalnych i aktywność metylotransferazy był większy niż specyficznego stymulatora jakim jest DDT. Pokarmowa aktywacja układu monooksygenaz wywołuje zmiany w syntezie fosfolipidów związanych w błonach komórkowych, w szczególności fosfadylocholino w wyniku działania metylotransferazy (1). Mazeaud i Biliński (17) sugerują możliwość współzależności hydrolizy i autooksydacji lipidów z syntezą prostaglandyn. Fosfolipaza A uwalnia polinienasycone kwasy tłuszczowe, które stanowią substrat dla autooksydacji tłuszczów bądź syntezy prostaglandyn. W organizmie żywym istnieje możliwość konkurencyjności na bazie nienasyconych kwasów tłuszczowych pomiędzy powstawaniem DAM a syntezą prostaglandyn (17).

Wolnorodnikowe intermediały peroksydacji lipidów i polinienasyconych kwasów tłuszczowych reagują z enzymami do znacznej zmiany ich właściwości. Uszkodzenie enzymów przebadano w mitochondriach. Stwierdzono, że w wyniku sprzężeń poprzecznych spowodowanych peroksydacją linolenianu uszkadza się i ulega polimeryzacji cytochrom C. Cytochrom C z rodnikiem nadtlenkowym tworzą dimery, trimery i tetramery podobnie jak pod wpływem radiacji. Zaobserwowano także powstawanie dimerów rybonukleazy (24). W stanach patologicznych utlenione tłuszcze lub DAM mogą zakłócać metaboliczne mechanizmy regulacji, jakimi są układy białek sulfhydrylowych z glutationem, udział transferazy tiolowej, peroksydazy i reduktazy glutationowej oraz oksydazy mikrosomalnej i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (13). Wraz ze wzrostem stężenia DAM z peroksydowanych lipidów w mikrosomach endoplazmatycznego retikulum wątroby następowała inaktywacja glukozy-6-fosfatazy, uwalnianie i inaktywacja reduktazy NADPH-

-cytochrom C. Destrukcja cytochromu P-450 występowała tylko w obecności wysokich stężeń hydronadtlenków oraz powszechnego wytwarzania DAM. Uszkodzenia te w układach komórkowych są związane z implikacjami patologicznymi. Ustalono, że inaktywacja rybonukleazy przez oczyszczone hydronadtlenki kwasu linolenowego polega na włączeniu tego związku do enzymu poprzez mechanizm rodnikowy. W mechanizmie tym atak skierowany jest na centra aktywne rybonukleazy poprzez inaktywację reszt lizyny, histydyny, tyrozyny, metioniny i cystyny (28). Deformacja cystyny zmienia charakter aktywności uszkodzanego enzymu (5). Tappel (29) przypuszcza, że malonal pochodzący z peroksydowanych lipidów jest reagentem w inter- i intracząsteczkowych sprzężeniach poprzecznych rybonukleazy. Chio i Tappel (7) wyrazili pewnie, że mechanizm reakcji pomiędzy rybonukleazą A a polinienasyconymi lipidami oraz pomiędzy rybonukleazą A a DAM wykazują szereg charakterystycznych podobieństw i określili liniową współzależność pomiędzy log aktywności enzymu a stężeniem unadtlenionego lipidowego inaktywatora enzymu. Wold (30) proponuje, co potwierdzają Chio i Tappel (7), następujący schemat sprzężeń poprzecznych DAM z aktywnym enzymem:



Ryc. 8. Schemat międzyreakcji aldehydu malonowego z aktywnym enzymem

Kwas malonowy jest znanym i skutecznym inhibitorem dehydrogenazy bursztynianowej oraz przeszkadza w redukcji metemoglobiny przez blokowanie wytwarzania NADH (31). Według Nejfacha (19) kwas malonowy oddziałując kompetencyjnie na poziomie siódmej reakcji cyklu Krebsa prowadzi do inaktywacji dehydrogenazy bursztynianowej, katalizującej utlenianie kwasu bursztynowego do fumarowego.

Możliwe jest również współzawodnicze abio-genne oddziaływanie DAM podczas przenoszenia jednostek formylowych w biosyntezie białek i biosyntezie nukleotydów purynowych, stając się przyczyną patologii określonej grupy schorzeń u ludzi i zwierząt.

Międzyreakcje malonianów z polocukrowcami

Badania interakcji związków malonylowych z polocukrowcami są nieliczne. Reakcję DAM z glikogenem i skrobią przeprowadzono w nasyconych roztworach cukrowców. Po przeprowadzonej dializie stwierdzono, że tylko glikogen związał DAM. Różnice w reaktywności pomiędzy glikogenem i skrobią sugerują, że wiązanie z DAM wymaga określonych rodzajów układów strukturalnych (15).

Udział w abiogennych międzyreakcjach malonianów z białkowymi i niebiałkowymi związkami azotowymi w paszach i w produktach żywnościowych jest niezwykle rozległy. Reakcje te dotyczą polisacharydów tylko w niewielkim stopniu, głównie mogą obejmować tłuszczone, nienasycone węglowodory oraz cukrowce proste jako produkty rozpadu polisacharydów.

Piśmiennictwo

1. Andia A. M. G., Street J. C.: J. Agr. Food Chem. 23, 173, 1975.
2. Benedict R. C., Strange E. D., Swift C. E.: J. Agr. Food Chem. 23 (2), 167, 1975.
3. Buttke H.: J. Food Sci. 32 (4), 432, 1967.
4. Casselman B. W. G.: J. Exper. Med. 94 (6), 549, 1951.
5. Cecil R., Wake R. G.: Biochem. J. 82, 401, 1962.
6. Chen L. H., Packett L. V.: Am. J. Clin. Nutr. 24, 1332, 1971.
7. Chio K. S., Tappel A. L.: Biochem. 8 (7), 2827, 1969.
8. Chio K. S., Tappel A. L.: Biochem. 8 (1), 2821, 1969.
9. Childs E. A.: J. Food Sci. 38, 718, 1973.
10. Crawford D. L., Yu T. C., Sinnhuber R. O.: J. Agr. Food Chem., 14 (2), 182, 1966.
11. Crawford D. L., Sinnhuber R. O., Stout F. M., Old J. E., Kaufman J.: J. Toxicol. Appl. Pharmacol. 7, 826, 1965.
12. Crawford D. L., Yu T. C., Sinnhuber R. O.: J. Food Sci. 32 (3), 332, 1967.
13. Isaacs J., Binkley F.: Biochim. Biophys. Acta (G) 497, 192, 1977.
14. Kare IM., Schaich K., Roy R. B.: J. Agr. Food Chem. 23 (2), 159, 1975.
15. Kwon T. W., Menzel D. B., Olcott H. S.: J. Food Sci. 30 (5), 803, 1965.
16. Matsushita S.: J. Agr. Food Chem. 23 (2), 150, 1975.
17. Mazeud F., Bilinski E.: J. Fish. Res. Bd. Canada 33 (6), 1297, 1976.
18. Miquel J., Tappel A. L., Dillard C. J., Herman M. M., Bensch K. G.: J. Gerontol. 29 (6), 622, 1974.
19. Neffach S. A.: Mechanizmy integracji przemian komórkowych. PWN, 1973.
20. Pedersen J. W., Glavind J.: Acta Chem. Scand. 6, 453, 1952.
21. Pokorny J., Janicek G.: Die Nahrung 12, 81, 1968.
22. Pokorny J., Janicek G.: Die Nahrung 19, 911, 1975.
23. Roubal W. T., Tappel A. L.: Arch. Biochem. Biophys. 113, 5, 1966.
24. Roubal W. T., Tappel A. L.: Arch. Biochem. Biophys. 113, 150, 1966.
25. Roubal W. T.: J. Am. Oil Chem. Soc. 47, 141, 1970.
26. Schaich K. M., Karel M.: J. Food Sci. 40 (2), 456, 1975.
27. Schwenke K. D., Prahl P. L., Ender B., Besrukow M. G., Belikow W. M., Freimuth U., Charatjan S. G., Wolnowa A. J.: Die Nahrung 19, 921, 1975.
28. Smith E. L.: Enzymes 1, 286, 1970.
29. Tappel A. L.: Am. J. Clin. Nutr. 23 (8), 1137, 1970.
30. Weid F.: Methods Enzymol. 11, 617, 1967.
31. Zimmerman G. L., Snyder H. E.: J. Food Sci. 34, 238, 1969.

Adres autora: doc. dr inż. Tadeusz Witas, ul. Podhalańska 3 m. 5, 70-452 Szczecin.

STANISŁAW MEUSZYŃSKI, IRENA TERECH, HENRYK ZIELONKA

Badanie środowiska rzeźni drobiu na obecność pałeczek Salmonella

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Katowicach

Z Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Katowicach

Rozwijająca się produkcja kurcząt rzeźnych — brojlerów i w związku z tym przejście większości zakładów na produkcję drobiu bitego przez cały rok, stworzyły konieczność oparcia nadzoru weterynaryjnego na kadrze lekarzy wet., specjalizujących się w zagadnieniach sanitarno-weterynaryjnych, wiążących się ściśle z tą dziedziną produkcji środków spożywczych.

Zadaniem kontroli lekarsko-weterynaryjnej jest ustalenie stanu zdrowotnego dostarczanych do uboju kurcząt, nadzór nad wszystkimi fazami procesu technologicznego uboju i obróbki, przede wszystkim z punktu widzenia wymogów sanitarno-higienicznych oraz inne czynności wynikające z funkcji lekarza wet. higienisty żywnościowego.

Warunki środowiska rzeźni drobiu, w jakich odbywają się procesy produkcyjne, mogą wywierać niekorzystny wpływ na jakość produktu finalnego w przypadku zakażenia środowiska drobnoustrojami chorobotwórczymi, głównie pałeczkami *Salmonella*.

Z piśmiennictwa wynika, że drób obok trzody chlewnej jest głównym rezerwuarem licznych typów serologicznych salmonel, przy czym nosicielstwo tych drobnoustrojów u drobiu grzebiącego może kształtować się różnorodnie, w granicach od 0,5% do około 50% (1, 2). Znamienne są wyniki pracy Weidlicha, który wykazał, że w tej samej partii drobiu badanego przyżyciowo stwierdzono badaniem kału 2,2% nosicieli, podczas gdy po uboju stwierdzono zakażenie salmonelami tuszek drobiu w 17%, co jest niewątpliwie następstwem wtórnego zakażenia tymi drobnoustrojami środowiska rzeźni drobiu na różnych odcinkach linii produkcyjnej (4).

W celu zorientowania się o stopniu zakażenia środowiska rzeźni drobiu salmonelami przeprowadzono analizę mikrobiologiczną rzeźni drobiu „B” na terenie województwa katowickiego. Badana rzeźnia stanowi obiekt adaptowany, o przeciętnym standardzie wyposażenia, urządzeń, pomieszczeń itp., gwarantujących minimum