

Jacek Leman

Instytut Biotechnologii Żywności
Akademia Rolniczo-Techniczna
Olsztyn

Chemiczna modyfikacja białka drożdży

Wprowadzenie

Perspektywy wykorzystania biomasy drożdży w żywieniu ludzi wynikają z ich zdolności do szybkiego wzrostu na różnych substratach oraz wysokiej zawartości wartościowego białka (1,2). Jednak, obecność materiału ściany komórkowej (3-6) oraz wysoka zawartość kwasów nukleinowych (1,6) ograniczają możliwość zwiększenia spożycia tego białka. Dzielne spożycie kwasów nukleinowych przez człowieka w ilości powyżej 2g podwyższa poziom kwasu moczowego w plazmie krwi, co sprzyja wytrącaniu się jego kryształów, i w następstwie akumulacji w stawach, jest przyczyną podagry. Niedobór oksydazy kwasu moczowego uniemożliwia utlenianie tego kwasu do rozpuszczalnej i ulegającej wydaleniu allantoiny (7).

Zawartość kwasów nukleinowych w białku drożdży obniża się metodami chemicznymi i enzymatycznymi (8,9). Najbardziej powszechna metoda otrzymywania białka o niskim poziomie kwasów nukleinowych polega na jego ekstrakcji stężonymi zasadami w podwyższonej temperaturze (60°C), a następnie wytrąceniu białka w środowisku kwaśnym (10-13). Działanie zasady na białko powoduje jego denaturację i degradację, co pogarsza wartość odżywczą i właściwości funkcjonalne. Zmiany w białku obejmują racemizację aminokwasów, β -eliminację, sieciowanie niektórych aminokwasów oraz tworzenie się potencjalnych związków antyżywnościowych i rozkład reszt cystyny, seryny, fosfoseryny i treoniny do aminokwasów nienasyconych, np. dehydroalaniny (14-17), która reagując z różnymi czynnikiemami nukleofilowymi (18-20) powoduje powstawanie nietypowych aminokwasów. Ponadto, zniszczenie niektórych aminokwasów oraz tworzenie się lizynoalaniny pogarsza strawność białka *in vivo* i *in vitro* (21,22).

Zastosowanie egzo- i endogennych rybonukleaz do obniżenia zawartości kwasów nukleinowych w białku drożdży ograniczają m.in. daleko posunięta proteoliza białka oraz wysokie ceny preparatów enzymatycznych (23). Reasumując, należy stwierdzić, że ze względu na niekorzystny wpływ stężonych zasad na białko istnieje potrzeba opracowania prostej, bezpiecznej i taniej metody przemysłowego oddzielenia kwasów nukleinowych od białka drożdży.

Interakcje białka i kwasów nukleinowych: kompleks nukleoprotein

Wydzielanie białka drożdży w punkcie izoelektrycznym (pH 4,5), metodą termiczną (80°C, pH 6) lub przez wysalanie powoduje równoczesną koprecypitację kwasów nukleinowych (24) wskazując, że są one zasocjowane z białkiem tworząc kompleks nukleoproteinowy, stabilizowany, względnie słabymi siłami hydrofobowymi, elektrostatycznymi oraz wiązaniami wodorowymi. Wiązania jonowe występują głównie pomiędzy anionowymi grupami fosforanowymi kwasów nukleinowych i kationowymi grupami podstawowych aminokwasów, np. ϵ -NH₃ lizyny. W łagodnych warunkach, duża ilość takich słabych asocjacji zapewnia stabilność kompleksu. Zniszczenie oddziaływań jonowych, np. poprzez modyfikację anionowych grup RNA lub grup ϵ -NH₂ w białku ułatwia jego oddzielenie od kwasów nukleinowych.

Uwalnianie białka z kompleksu nukleoprotein drożdży

Sukcynilacja

Acylowanie wolnych grup aminowych w białkach bezwodnikami kwasów cyklicznych destabilizuje jego oligomery w następstwie dysocjacji podjednostek, szczególnie wtedy gdy ich struktura czwartorzędowa jest stabilizowana oddziaływaniami jonowymi (25,26). Przypuszcza się, że oddziaływania jonowe, warunkujące m.in. stabilność kompleksu nukleoprotein drożdży, są destabilizowane w analogiczny sposób.

Mühlrad i wsp. (27) wykazali, że w celu zmodyfikowania większej liczby ϵ -NH₂ grup lizyny wymagany jest nadmiar bezwodnika kwasu bursztynowego ponieważ reaguje on również z innymi grupami funkcjonalnymi w białku, tj. resztami tyrozyny, histydyny i alifatycznych hydroksykwasów (9, 27-30). W metodzie proponowanej przez wymienionych autorów bezwodnik kwasu bursztynowego dodaje się do homogenatu drożdży w sposób ciągły, utrzymując kwasowość na poziomie pH 8,5 (schemat 1A).

W wyniku sukcywilacji białka zwiększa się jego elektroujemność i wzrasta związane z tym odpychanie elektrostatyczne pomiędzy wprowadzonymi grupami karboksylowymi i anionowymi grupami fosforanowymi w kwasach nukleinowych. W następstwie tych zjawisk kompleks nukleoprotein ulega destabilizacji. Nierozpuszczalny materiał ściany komórkowej jest oddzielany przez wirowanie, a kwasowość odwirowanego roztworu obniżana do pH 4,2 w celu wytrącenia białka. Zmodyfikowanie 90% grup funkcjonalnych w białku umożliwia zredukowanie w nim ilości kwasów nukleinowych o 95%. Stopień usunięcia kwasów nukleinowych z białka rośnie wraz ze wzrostem stopnia sukcywilacji.

W porównaniu do białka izolowanego w środowisku zasadowym, białko otrzymane omawianą metodą charakteryzuje się wyższą zawartością poszczególnych aminokwasów oraz korzystnymi cechami funkcjonalnymi. Dużą wadą tej metody jest powstawanie nieprzyswajalnej przez organizm sukcywilolizyny (32,33). Modyfikowane tym sposobem białko drożdży nie może być zatem głównym źródłem białka w diecie. Usuwanie grup sukcywilowanych z izolatu białka jest związane ze stosowaniem drastycznych warunków i pogarsza jego jakość.

Modyfikacja odwracalna

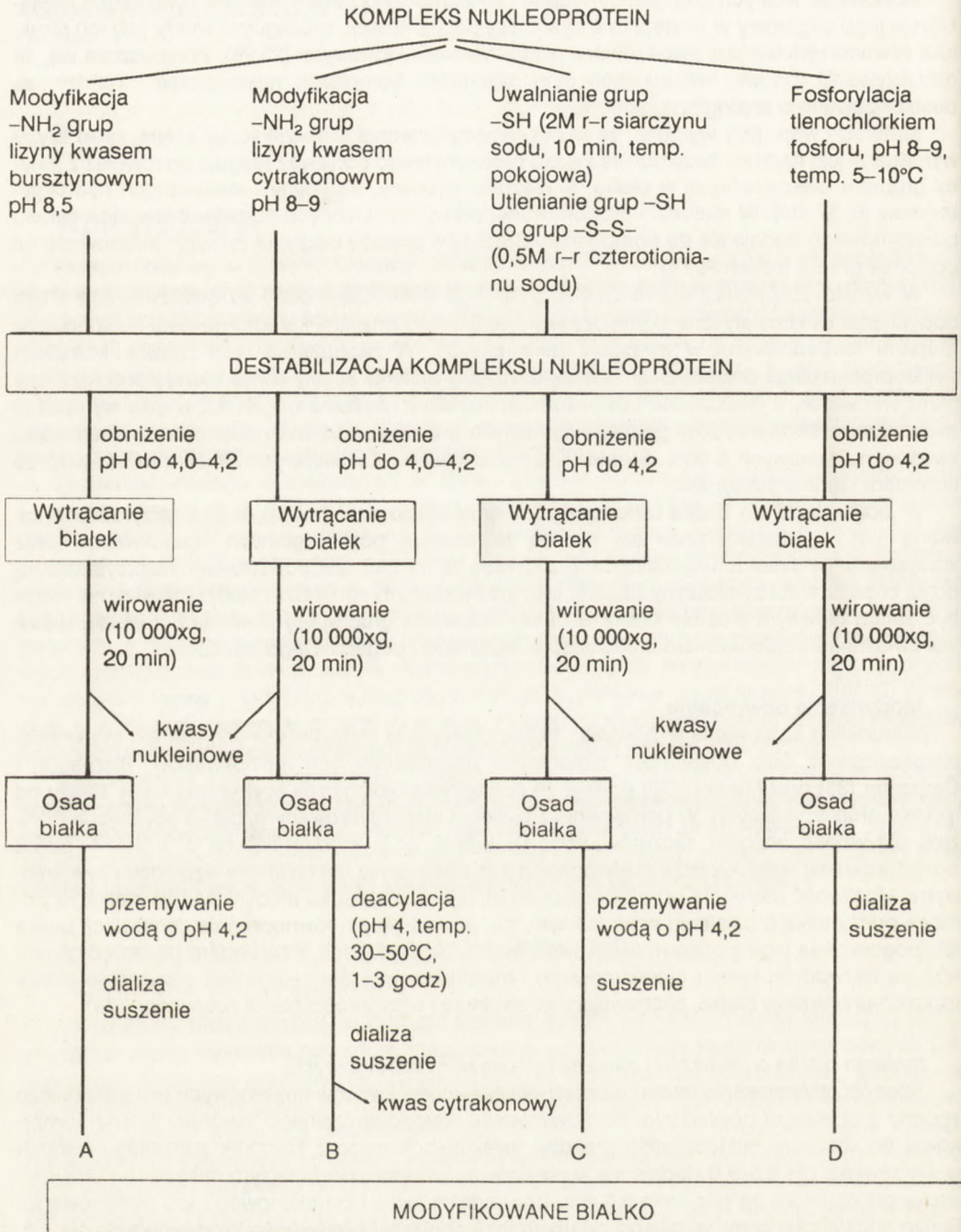
Warunkiem stosowania w żywności białek chemicznie modyfikowanych jest ich strawność, nietoksyczność oraz dostępność biologiczna zmodyfikowanych aminokwasów. Bjarnason i Carpenter (35) oraz Mauron (30) podają, że dostępność biologiczna acylowanej lizyny zależy od rodzaju grup acylujących. W porównaniu z białkiem niemodyfikowanym, białka acylowane obniżają aktywność wzrostu szczurów (37). Usuwanie grup modyfikujących z izolatów białka o zredukowanej ilości kwasów nukleinowych jest zatem silnie uzasadnione względami żywieniowymi. Możliwość usuwania grup blokujących istnieje w przypadku modyfikowania białka za pomocą odczynnika o działaniu odwracalnym, nie powodującym równocześnie denaturacji białka lub pogorszenia jego podstawowych właściwości biologicznych. Przykładem takich odczynników są bezwodniki kwasu cytrakonowego i maleinowego, które zapewniają utrzymanie jednorodnych preparatów białka, zachowującego strukturę i właściwości białka natywnego (34).

Izolacja białka o obniżonej zawartości kwasów nukleinowych

Sposób otrzymywania izolatu o obniżonej zawartości kwasów nukleinowych jest zasadniczo zgodny z opisanym poprzednio. Po odwirowaniu nierozpuszczalnego materiału ściany komórkowej do roztworu nukleoprotein drożdży, wyekstrahowanych z komórek zdeintegrowanych w środowisku pH 8,5-9,0 dodaje się w niewielkich porcjach, przy ciągłym mieszaniu i utrzymywaniu pH roztworu na poziomie 8,0-8,5, bezwodnika kwasu cytrakonowego lub maleinowego. Białko oddziela się przez wirowanie po uprzednim obniżeniu kwasowości środowiska do pH 4,2,

Schemat 1

Sposób oddzielania białka i kwasów nukleinowych: A – sukcylnacja, B – odwracalna modyfikacja, C – sulfitoliza, D – fosforylacja

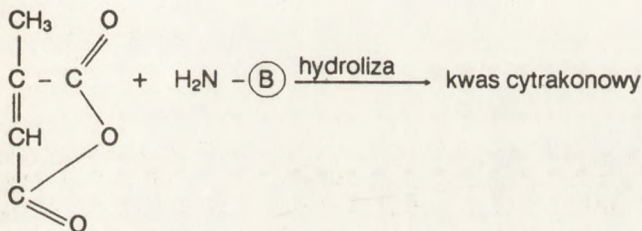
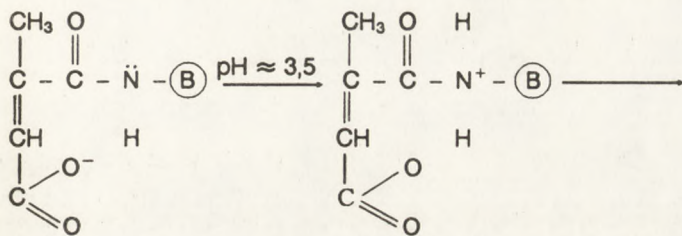


a następnie rozpuszcza w wodzie o pH 8,5, dializuje wobec wody (pH 8,5) w temperaturze 5°C i liofilizuje (schemat 1B).

Stopień modyfikacji grup aminowych w białku drożdży maleje ze wzrostem stężenia bezwodnika. Maksymalny stopień modyfikacji białka bezwodnikami kwasu cytrykonowego i maleinowego, przy identycznym stosunku molarnym bezwodnika i lizyny, wynosi odpowiednio 88 i 95%. Jednak, oddzielenie kwasów nukleinowych od białka drożdży modyfikowanego bezwodnikiem kwasu cytrykonowego zachodzi łatwiej aniżeli od białka modyfikowanego bezwodnikiem kwasu maleinowego i stopień usunięcia kwasów nukleinowych z białka zmodyfikowanego w 50% wynosi odpowiednio 50 i 12% (31).

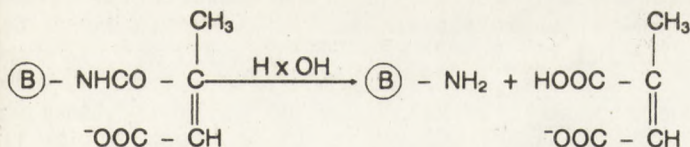
Deacylacja

Zasadniczą rolę w procesie deacylacji spełnia wiązanie podwójne cis, orientujące przestrzennie końcową grupę karboksylową i ułatwiające atak nukleofilowy na węgiel amidowy:

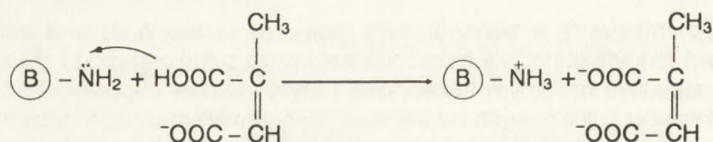


Stopień deacylacji białka zwiększa się wraz z obniżeniem kwasowości środowiska. Deacylacja całkowita następuje po 3 godzinach w środowisku o pH 3 i 4 oraz po 5 godzinach w pH 5. W środowisku o pH 6 szybkość procesu jest znacznie mniejsza i deacylacji, dopiero po dłuższym czasie, ulega tylko 80% grup zmodyfikowanych.

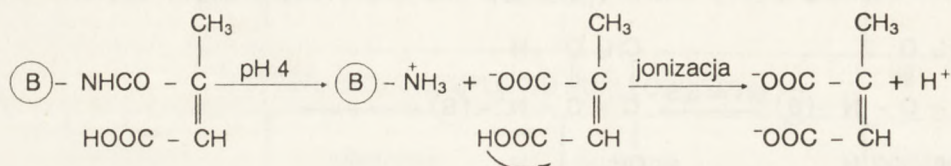
Podczas deacylacji białek, pH środowiska obniża się, zwłaszcza w zakresie pH 3,0–4,5. W środowisku o niskim pH, uwolnione grupy aminowe, w odróżnieniu od grup karboksylowych ulegają całkowitej protonacji. Dodatkowo naładowane grupy aminowe nie wpływają jednak na pH środowiska ponieważ hydroliza wiązania amidowego, tworzonego przez bezwodnik o strukturze β-dieniu, jest katalizowana jonami wodoru (38). Zjawisko wyjaśniają następujące reakcje:



Po uwolnieniu protonu z kwasu cytrakonowego następuje protonacja grupy aminowej



Spadek pH podczas deacylacji prowadzonej w środowisku o pH 3–4 można wyjaśnić obniżeniem się wartości pK_a wolnej grupy karboksylowej cytrakonilu w następstwie jego uwolnienia z białka. W środowisku o pH poniżej 5 wolne grupy karboksylowe cytrakonilu w modyfikowanym białku mogą występować w postaci sprotonowanej. Po deacylacji, wartość pK_a tych grup karboksylowych obniża się, co powoduje jonizację i wytwarzanie protonów:



W środowisku o pH 4 szybkość deacylacji modyfikowanych białek drożdży zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury. W temperaturze 50°C całkowita deacylacja następuje już po 30 minutach. W niższych temperaturach czas trwania procesu przedłuża się do powyżej 12 godzin.

Izolat niezdenaturowanego białka drożdży, otrzymany proponowaną metodą, charakteryzuje się korzystnymi właściwościami funkcjonalnymi. Ponadto, proces trawienia białka modyfikowanego tym sposobem będzie poprzedzony jego deacylacją w żołądku z uwagi na istniejące w nim środowisko (pH, temperatura).

Fosforylacja

Modyfikacja białka przez fosforylację posiada wiele zalet, decydujących o jej wyższości nad innymi metodami chemicznymi. Fosfoproteiny występują powszechnie w przyrodzie i wiele z nich jest podstawowym składnikiem diety człowieka (39–43). Białka fosforylowane charakteryzują się lepszymi właściwościami funkcjonalnymi w porównaniu z białkami niemodyfikowanymi (39, 41–44). Ponadto, fosforylacja jest metodą bardziej efektywną aniżeli omówione już metody chemiczne. Przyjmuje się, że tylko 2% kwasu rybonukleinowego, który jest związany z białkiem, nie ulega oddysocjowaniu (45).

Wspomniano już, że w kompleksie nukleoprotein drożdży, białka i kwasy nukleinowe są związane względnie słabymi siłami niekowalentnymi, głównie oddziaływaniami elektrostatycznymi w rejonach hydrofobowych pomiędzy kationowymi $\epsilon\text{-NH}_3^+$, grupami lizyny w białku i anionowymi grupami fosforanowymi w kwasach nukleinowych (46,48). Fosforylacja białek drożdży powoduje wzrost elektroujemności cząsteczek białka, a tym samym zmienia oddziaływania elektrostatyczne. Wprowadzenie dwóch ujemnych ładunków do grupy $\epsilon\text{-NH}_2$ lizyny zwiększa odpychanie elektrostatyczne pomiędzy dostarczoną grupą fosforylową i anionowymi grupami fosforanowymi w kwasach nukleinowych, co powoduje rozerwanie kompleksu nukleoprotein i w środowisku o pH 4,0–4,2 ułatwia oddzielenie białka od kwasów nukleinowych (schemat 1D).

Uwalnianie kwasów nukleinowych z kompleksu nukleoprotein zwiększa się ze wzrostem stopnia modyfikacji $\epsilon\text{-NH}_2$ grup lizyny. Z uwagi na to, że grupy te są wrażliwe na atak nukleofilowy przy udziale POCl_3 , tylko wtedy gdy nie są naładowane dodatnio, stopień modyfikacji reszt lizyny zwiększa się wraz z podwyższeniem pH reakcji od 15 do 30%. W środowisku o pH 11,5 około 35% reszt lizyny ulega modyfikacji (44).

Wpływ kwasowości czynnej na stabilność wiązań fosforylowych w fosforylowanym białku drożdży wskazuje, że są one bardziej labilne w środowisku kwaśnym aniżeli zasadowym. Wiązania fosforu z grupami hydroksylowymi reszt seryny lub treoniny są bardziej stabilne (47,48), podczas gdy wiązania fosforu z azotem są labilne w środowisku kwaśnym i stabilne w środowisku zasadowym (49,50). Wynika stąd, że większość fosforu białka drożdży jest związana z azotem grup ϵ -NH₂.

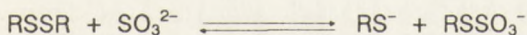
Zawartość kwasów nukleinowych w fosforylowanym białku drożdży zależy od stosunku wagowego POCl₃: białko, i obniża się od początkowej zawartości 20% do 2,5% przy stosunku równym około 1. Dalsze obniżenie zawartości kwasów nukleinowych nie jest możliwe nawet przy wysokich stężeniach POCl₃ (44). Ilość białka fosforylowanego, otrzymanego przy różnych proporcjach POCl₃: białko zwiększa się ze wzrostem stężenia tlenochlorku fosforu. Istnieją dwie przyczyny ograniczające stopień fosforylacji. Jedną z nich jest szybka hydroliza POCl₃ w środowisku o pH 7, powodująca uwolnienie niereaktywnego jonu fosforanowego (44). W fosforylacji grup -NH₂, a być może również -OH, uczestniczą pośrednie produkty hydrolizy POCl₃, które są bardzo reaktywne i posiadają łatwo odłączający się chlor.

Końcowy produkt hydrolizy – jon fosforanowy nie jest, jak wspomniano, aktywnym czynnikiem fosforylującym. Szybki rozkład POCl₃ do wolnego jonu fosforanowego, wyprzedzający reakcję z białkiem drożdży, zmniejsza ilość aktywnego czynnika fosforylującego i tym samym ogranicza stopień fosforylacji białka. Drugą prawdopodobną przyczyną niepełnej fosforylacji białka są przeszkody przestrzenne, które ograniczają dostęp czynnika fosforylującego do niektórych reaktywnych grup białka. Można tak przypuszczać w związku z tym, że fosforylowane białka zachowują w dużym stopniu swoją oryginalną strukturę (43). Niemniej jednak, nie udaje się zwiększyć stopnia fosforylacji ani obniżyć zawartości RNA (44), działając na kompleks białka drożdży mocznikiem (8M) lub solami chaotropowymi, które to czynniki powodują rozwinięcie i dezagregację makrocząsteczek oraz dysocjację kompleksu nukleoprotein.

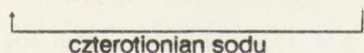
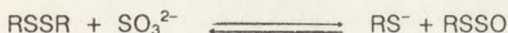
Sulfitoliza

Sulfitolizę zaproponował Damodaran (51) jako prostą metodę otrzymywania izolatów białka o niskiej zawartości kwasów nukleinowych. Zasada tej metody polega na konwersji grup sulfhydrylowych i disiarczkowych w nukleoproteinach do pochodnych S-sulfonowych, z czym są związane zmiany konformacji i wzrost elektroujemności białka w kompleksie nukleoprotein drożdży, powodujących jego destabilizację i dysocjację (schemat 1C) (51).

Rozczepienie wiązań disiarczkowych w nukleoproteinach drożdży i przekształcenie grup sulfhydrylowych do pochodnych wiązania dwusiarczkowe ulegają rozczepieniu pod wpływem siarczynu sodu wg reakcji (52)



W drugim etapie, uwolnione w poprzedniej reakcji grupy sulfhydrylowe są utleniane do disiarczków przez czterotioan sodu wg reakcji (53)



Wynikiem reakcji kompleksu nukleoprotein drożdży z siarczynem sodu (redukcja) i czterotioanem (utlenianie) jest obniżenie zawartości kwasów nukleinowych w preparacie białek, otrzymanym przez ich strącenie w punkcie izoelektrycznym (pH 4,2). Dysocjujące kwasy nukleinowe charakteryzują się punktem izoelektrycznym w granicach pH 1,5–2,0 wobec czego podczas strącania sulfonowanych białek drożdży przechodzą do roztworu.

Stopień usunięcia kwasów nukleinowych zależy od stężeń Na_2SO_3 i $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$. Redukcja wiązań disiarczkowych za pomocą siarczynu sodu nie wystarcza do wzbudzenia dysocjacji nukleoprotein drożdży. Pożądany efekt uzyskuje się dopiero po ponownym utlenieniu wolnych grup sulfhydrylowych za pomocą czterotianu sodu lub innego utleniacza. Wyjaśnienie tego zjawiska jest trudne. Można przypuszczać, że zmiany strukturalne cząsteczek białka, spowodowane redukcją wiązań disiarczkowych są niewystarczające i nie dochodzi do przerwania wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań pomiędzy białkami i kwasami nukleinowymi. Usuwanie nadmiaru siarczynu podczas strącania białek w punkcie izoelektrycznym sprzyja ponownemu tworzeniu się oryginalnej pary wiązań disiarczkowych wg reakcji: $\text{RSSO}_3^- + ^-\text{SR} \rightleftharpoons \text{RSSR} + \text{SO}_3^{2-}$ i powoduje przywrócenie pierwotnej elektroujemności białka, a tym samym stabilizuje kompleks nukleoprotein. Dopiero pod wpływem czterotianu sodu, uwolnione w pierwszym etapie wiązania sulfhydrylowe utleniają się do wiązań disiarczkowych, które w obecności nadmiaru siarczynu w układzie ulegają redukcji.

Procesy redukcji i utleniania można więc kontynuować w zależności od stężenia siarczynu i czterotianu w środowisku. Przekształcając coraz większą liczbę grup sulfhydrylowych w pochodne S-sulfonowe można zmienić konformację białka i wzbudzać dysocjację kompleksu nukleoprotein, której sprzyja również wzrost ładunku ujemnego netto w białku sulfonowanym wskutek sił odpychania elektrostatycznego (51).

Stopień usunięcia kwasów nukleinowych zależy od stężenia nukleoprotein w roztworze i maleje wraz ze wzrostem stężenia w zakresie 0–2,5%. Wzrost stężenia nukleoprotein powyżej wartości granicznej nie zmienia stopnia usunięcia kwasów nukleinowych. Przypuszcza się, że to widoczne obniżenie efektywności procesu może być spowodowane zarówno mało wydajną redukcją i konwersją wiązań disiarczkowych w pochodne niespecyficznych oddziaływań pomiędzy białkami i kwasami nukleinowymi.

Przewaga tej metody nad omawianymi polega na tym, że biologiczna dostępność aminokwasów egzogennych w sulfonowanym białku drożdży nie ulega pogorszeniu. W związku z kontrowersyjnymi poglądami na temat stosowania sulfitów w żywności (54) należy stwierdzić, że zarówno siarczyny jak i czterotian sodu są całkowicie usuwane w procesie otrzymywania izolatu białka. Ponadto, czterotian sodu można zastąpić innym utleniaczem. Białko S-sulfonowane, jak się wydaje, jest bezpieczne w żywieniu ludzi również i dlatego, że przekształceniu w pochodne S-sulfonowe ulega tylko niewielka ilość grup disiarczkowych, a proces desulfonowania można przeprowadzić w środowisku kwaśnym (53).

Modyfikacja solami chaotropowymi

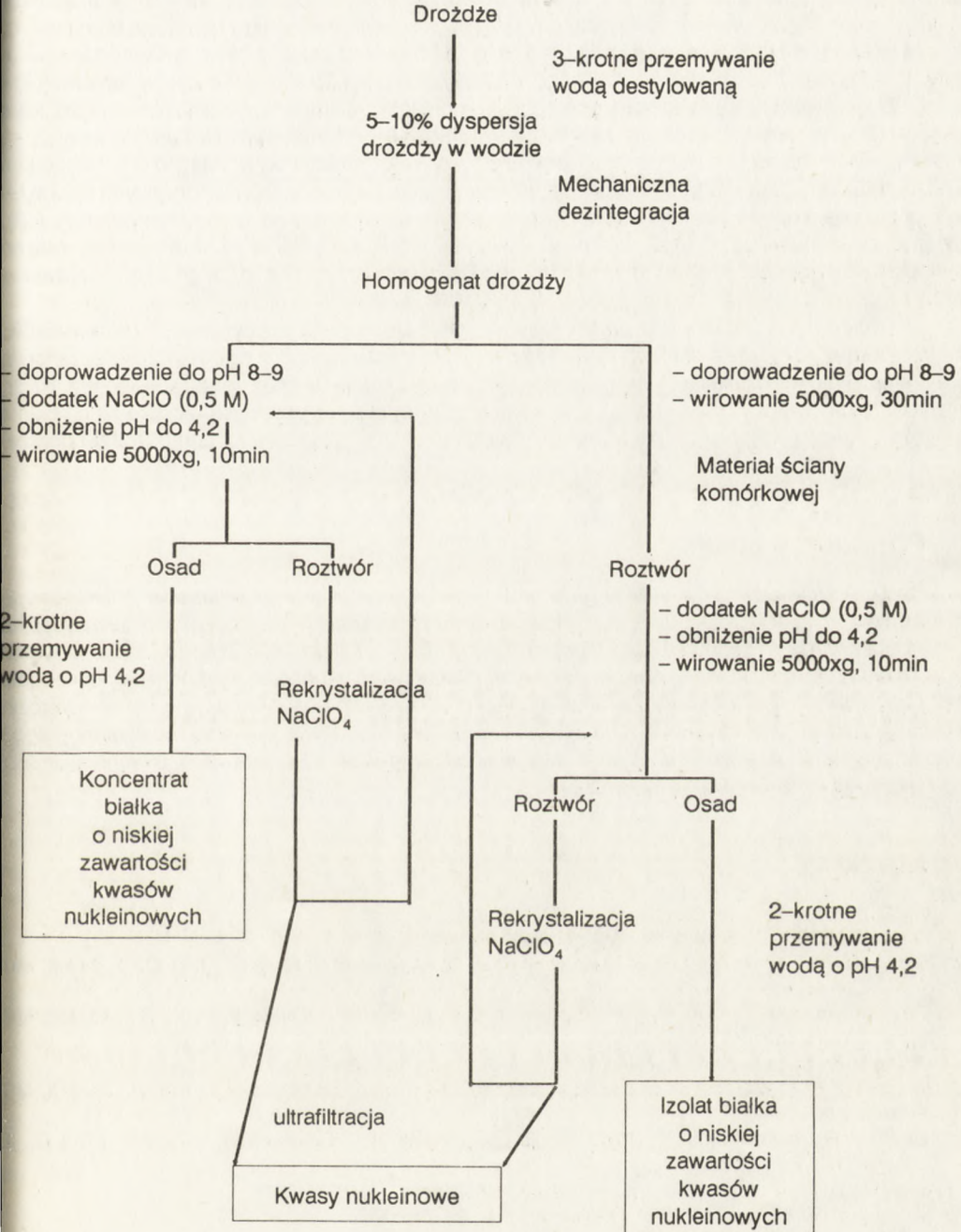
Przyjmuje się, że oddziaływania pomiędzy kwasami nukleinowymi i białkami drożdży są zdominowane przez siły hydrofobowe (55). Siły te zależą od struktury warstwy wodnej tworzącej się wokół rejonów hydrofobowych i jej zniszczenie osłabia oddziaływania hydrofobowe (57). Do czynników zmieniających strukturę warstwy wodnej wokół reszt hydrofobowych należą m.in. sole chaotropowe i liotropowe (57,58).

Sposób otrzymywania izolatu białek drożdży o obniżonej zawartości kwasów nukleinowych przedstawiono na schemacie 2.

Zawartość RNA w izolacie białek drożdży maleje wraz ze wzrostem stężenia soli. Przy niskich stężeniach soli, skuteczność ich działania układu się według następującej kolejności: $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{ClO}_4^- = \text{Cl}_3\text{CCOO}^-$ (58). Nadchloran sodu w stężeniu 0,5 M usuwa z kompleksu nukleoprotein około 80% początkowej zawartości RNA, podczas gdy NaCl i NaBr usuwają tylko odpowiednio 10 i 25%. W stężeniach powyżej 0,5 M NaClO_4 i Cl_3CCOONa działają mniej efektywnie, natomiast wpływ NaCl i NaBr na zmniejszenie zawartości kwasów nukleinowych utrzymuje się w zakresie stężeń do 1 M.

Schemat 2

Sposób otrzymywania koncentratu i izolatu białka drożdży o niskiej zawartości kwasów nukleinowych przy zastosowaniu nadchloranu sodu



Zmniejszenie zawartości RNA pod wpływem soli chaotropowych nie zależy od zawartości tego kwasu co sugeruje, że przy określonym stężeniu soli, wolny i związany z białkiem RNA pozostają w równowadze termodynamicznej, a stała tej równowagi jest funkcją stężenia soli i anionu. Powtórne działanie na kompleks nukleoprotein 0,5 M roztworem NaClO_4 powoduje zmniejszenie w nim zawartości RNA do 10% ilości początkowej, wskazując, że ciągła ekstrakcja nukleoprotein nadchloranem sodu mogłaby doprowadzić do całkowitego usunięcia tego kwasu.

W obecności NaClO_4 stopień dysocjacji RNA z kompleksu nukleoprotein zależy od temperatury. W temperaturze 5°C ilość usuniętego RNA wynosi tylko 20% usuwanego w temperaturze 25°C . Sugerowałoby to, że stabilność kompleksu nukleoprotein jest uwarunkowana przez kilka mechanizmów. Reakcje asocjacji zachodzące wyłącznie pod wpływem sił hydrofobowych są mało wrażliwe na zmiany temperatury ponieważ siły tego rodzaju wywołują przede wszystkim zmianę entropii układu (56,59). Natomiast, interakcje przy udziale wiązań wodorowych charakteryzują się znacznymi zmianami entalpii, a tym samym są wrażliwe na zmiany temperatury (60). Wiązania wodorowe są bardziej stabilne w niskich temperaturach. Istnienie potencjalnych wiązań wodorowych pomiędzy RNA i białkiem może być zatem przyczyną słabego oddysocjowania RNA z kompleksu nukleoprotein pod wpływem NaClO_4 w niskich temperaturach.

Przedstawiona metoda jest prosta i nie wymaga stosowania specyficznych odczynników. Nadchloran sodu wydaje się idealny do tego celu i to zarówno pod względem bezpieczeństwa jak i efektywności działania. Mogą być również stosowane inne sole chaotropowe, np. NaBr , NaNO_3 , NaSCN , NaI i Cl_3CCOONa . Adaptacja tego procesu do przemysłowej produkcji białka ze źródeł mikrobiologicznych nie wymagałaby dodatkowych nakładów. Ponadto, w celu obniżenia kosztów produkcji sole można odzyskiwać i wielokrotnie stosować.

Podsumowanie

Chemiczna modyfikacja $\epsilon\text{-NH}_2$ grup lizyny jako metoda usuwania kwasów nukleinowych z kompleksu nukleoprotein drożdży pozwala obniżyć w znacznym stopniu ich zawartość, a jednocześnie nie zmienia składu aminokwasowego białka mikrobiologicznego. Badania wskazują również, że uzyskuje się poprawę niektórych właściwości funkcjonalnych białka, takich jak: rozpuszczalność, zdolność wiązania wody, lepkość oraz zdolności emulsyjne i pianotwórcze. Niemniej jednak, wykorzystanie modyfikowanych białek drożdży w żywieniu ludzi wymagałoby przeprowadzenia doświadczeń żywieniowych w celu określenia ich strawności, wchłanianości i biologicznej dostępności aminokwasów.

Literatura

1. Kihlberg R., (1972), *Ann. Rev. Microbiol.*, 26, 427-432.
2. Kharatyan S. G., (1978), *Ann. Rev. Microbiol.*, 32, 30-33.
3. Scrimshaw N. S., (1975), *Single-cell proteins*, red. Tannenbaum S. R., Wang D. I. C., 2, 24-56, MIT Press, Cambridge.
4. Tannenbaum S. R., (1968), *Single-cell proteins*, red. Mateles R. T., Tannenbaum S. R., 343-362, MIT Press, Cambridge.
5. Young V. R., Scrimshaw N. S., Milner M. S., (1976), *Chem. Ind.*, 588-596.
6. Worgan J. T., (1974), *Single-cell protein: plant foods for man*, red. Tannenbaum S. R., 99-118, MIT Press, Cambridge.
7. Young V. R., Scrimshaw N. S., (1975), *Single-cell proteins*, red., Tannenbaum S. R., Wang D. I. C., 2, 566-582, MIT Press, Cambridge.
8. Knorr D., Shetty J. K., Kinsella J. E., (1979), *Biotech. Bioeng.*, 21, 2011-2018.
9. Shetty J. K., Kinsella J. E., (1978), *Biotech. Bioeng.*, 20, 755-762.

10. Hedenskog G., Mogren H., (1973), *Biotech. Bioeng.*, 15, 129–136.
11. Vananuvat P., Kinsella J. E., (1975), *J. Agric. Food Chem.*, 23, 216–223.
12. Lindblom M., (1974), *Biotech. Bioeng.*, 16, 1495–1502.
13. Newell J. A., Robbins E. A., Seeley R. D., (1975), US Patent 3867555.
14. Cheftel J. C., (1977), *Food proteins*, red. Whitaker J. R., Tannenbaum S. R., 404–423, Westport, AVI.
15. Masters P. M., Friedman M., (1979), *J. Agric. Food Chem.*, 27, 507–516.
16. Shetty J. K., Rao M. S. N., (1978), *Int. J. Pept. Protein Res.*, 11, 305–313.
17. Nicolet B. H., Shinn L. A., Saidel L. J., (1942), *J. Biol. Chem.*, 142, 609–616.
18. Bohak Z., (1964), *J. Biol. Chem.*, 239, 2878–2889.
19. Asquith R. S., Skinner J. D., (1970), *Texilveredlung*, 5, 406–413.
20. Horn M. J., Jones D. B., Ringel S. J., (1941), *J. Biol. Chem.*, 133, 11–20.
21. De Groot A. J., Slump P., (1969), *J. Nutr.*, 98, 45–52.
22. Provansal M. M. P., Cup J.-L. A., Cheftel J. C., (1975), *J. Agric. Food Chem.*, 23, 938–947.
23. Shetty J. K., Kinsella J. E., (1979), *J. Food Sci.*, 44, 1362–1369.
24. Vananuvat P., (1974), Ph. D. Thesis, Cornell Univ., Ithaca, N. Y.
25. Hass L. F., (1964), *Biochemistry*, 3, 535–542.
26. Klotz I. M., Keresztes-Nagy S., (1963), *Biochemistry*, 2, 445–451.
27. Mühlrad A., Corsi A., Granata A. L., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, 162, 435–442.
28. Gounaris A. D., Perlmann G. E., (1967), *J. Biol. Chem.*, 242, 2739–2746.
29. Habeeb A. S. F. A., Cassidy H. G., Singer S. J., (1958), *Biochim. Biophys. Acta*, 29, 587–594.
30. Freedman M. H., Grossberg A. L., Pressman D., (1968), *Biochemistry*, 7, 1941–1946.
31. Shetty J. K., Kinsella J. E., (1982), *Modification of proteins: food nutritional and pharmaceutical aspects*, *Advances in Chemistry Series* nr 198, red. Feeney R. E., Whitaker J. R., 169–186, American Chemical Society, Washington, D. C.
32. Shetty J. K., Kinsella J. E., (1979), *J. Food Sci.*, 43, 633–642.
33. Shetty J. K., Kinsella J. E., (1978), US Patent 4168262.
34. Habeeb A. F. S. A., Atassi M. Z., (1979), *Biochemistry*, 18, 4939–4952.
35. Bjarnason J., Carpenter K. J., (1969), *Br J. Nutr.*, 23, 859–866.
36. Mauron J., (1972), *Protein and amino acid functions*, red., Bigwood E. J., 512–527, Pergamon, Oxford.
37. Groninger H. S., Miller R., (1979), *J. Agric. Food Chem.*, 27, 949–962.
38. Kirby A. J., Lancaster P. W., (1974), *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 1495–1502.
39. Mohammad A., Mecham D. K., Olcott H. S., (1954), *J. Agric. Food Chem.*, 2, 126–133.
40. Matheis G., Penner M. H., Feeney R. E., Whitaker J. R., (1983), *J. Agric. Food Chem.*, 31, 379–384.
41. Sung H. Y., Chen H. J., Liu T. Y., Su J. C., (1983), *J. Food Sci.*, 48, 716–723.
42. Hirotsuka M., Taniguchi H., Narita H., Kita M., (1984), *Agric. Biol. Chem.*, 48, 93–99.
43. Woo D. L., Creamer L. K., Richardson T., (1982), *J. Agric. Food Chem.*, 30, 65–72.
44. Huang Y. T., Kinsella J. E., (1986), *Biotech. Bioeng.*, 28, 1690–1698.
45. Kinsella J. E., (1986), *Food biotechnology*, red. Knorr D., 82–108, Marcel-Dekker, New York.
46. Helene C., Lancelot G., (1982), *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 30, 1166–1174.
47. Rimington C., Kay H. D., (1926), *Biochem J.*, 20, 777–786.
48. Anderson L., Kelley J. J., (1959), *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 2275–2287.
49. Zervas L., Katsoyannis P. G., (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 5351–5362.
50. Willmitzer L., Wagner K. G., (1975), *Eur. J. Biochem.*, 59, 43–53.
51. Damodaran S., (1986), *J. Agric. Food Chem.*, 34, 26–35.
52. Cole D., (1967), *Methods Enzymol.*, 11, 206–213.
53. Bailey J. L., Cole R. D., (1959), *J. Biol. Chem.*, 234, 1733–1742.
54. Nolan A. L., (1983), *Food Eng.*, 55, 84–92.
55. Damodaran S., Kinsella J. E., (1983), *Biotech. Bioeng.*, 25, 761–770.
56. Kauzmann W., (1959), *Adv. Protein Chem.*, 14, 1–13.
57. Damodaran S., Kinsella J. E., (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 3394–3403.
58. Hatefi T., Hanstein W. G., (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 62, 1129–1140.
59. Damodaran S., Kinsella J. E., (1980), *J. Biol. Chem.*, 255, 8503–8511.
60. Ross P. A., Subramanian S., (1981), *Biochemistry*, 20, 5396–5405.

Chemical modification of yeast protein

Summary

Several chemical methods i.e. succinylation, phosphorylation, sulfitolysis as well as cyclic anhydrides of β -diene structure (cis double bond) and chaotropic salts modifications for the reduction of nucleic acids in yeast protein isolates have been discussed. The mechanism of dissociation of yeast nucleoproteins and the effectiveness of the methods of the separation of nucleic acids for the isolation of yeast proteins in an undenatured form have also been presented. Besides, the acceptability and biological value of such chemically modified proteins have been considered.

Adres dla korespondencji:

Jacek Leman, Instytut Biotechnologii Żywności, Akademia Rolniczo-Techniczna, 10-957 Olsztyn-Kortowo bl. 43.