

GRAŻYNA LEWANDOWICZ
PRZEMYSŁAW KOWALCZEWSKI
WOJCIECH BIAŁAS
ANNA OLEJNIK
JOANNA RYCHLIK

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Rozdział frakcji soku ziemniaczanego różniących się masą cząsteczkową i charakterystyka ich aktywności biologicznej*

Separation of the fractions of potato juice of different molecular weight and characterization of their biological activities

Współcześnie realizowane badania kliniczne z użyciem świeżego soku z ziemniaka wskazują na jego przydatność terapeutyczną w leczeniu zaburzeń funkcjonowania przewodu pokarmowego. Dane literaturowe nie rozstrzygają jednak jakie składniki soku z ziemniaka wykazują działanie lecznicze. Celem pracy była ocena aktywności biologicznej soku ziemniaczanego wysuszonego w suszarce rozpyłowej oraz jego frakcji rozdzielonych ze względu na różnice w masie cząsteczkowej. Świeży sok z ziemniaka poddano alternatywnie procesowi suszenia rozpyłowego lub kriokoncentracji w wyniku której otrzymano surowiec pięciokrotnie zatężony. Tak przygotowany koncentrat poddano separacji metodą chromatografii żelowej. Wyizolowane frakcje analizowano w aspekcie ich zdolności do hamowania wzrostu i ograniczania żywotności ludzkich komórek nowotworowych. Oznaczenia wykonano również na komórkach prawidłowych. Przeprowadzone badania wykazały, że produkty przetworstwa soku ziemniaczanego, podobnie jak świeży surowiec, posiadają potencjał cytotoksyczny w odniesieniu do komórek nowotworowych żołądka i jelita grubego. Wykazano, że proces suszenia rozpyłowego w niewielkim stopniu obniża aktywność biologiczną soku z ziemniaka. Proces kriokoncentracji pozwala na pięciokrotne zatężenie składników soku ziemniaczanego, które następnie mogą być efektywnie separowane na frakcje różniące się masą cząsteczkową w procesie filtracji żelowej. Największą cytotoksycznością skierowaną specyficznie na komórki nowotworowe cechuje się niebiałkowa, odporna na obróbkę termiczną, frakcja o masie cząsteczkowej poniżej 1 kDa.

Słowa kluczowe: cytotoksyczność, kriokoncentracja, separacja, sok z ziemniaka, suszenie rozpyłowe

The clinical trials on the medicinal use of potato juice proved its efficiency in the therapy of gastrointestinal disorders. However, the literature data don't determine which substances actually

* Praca została wykonana w ramach projektu nr POIG 01.01.02-00-061/09 pt. „Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych” realizowanego w Programie Operacyjnym Innowacyjna Gospodarka, 2007–2013

reveal the therapeutic effect. The aim of the work was estimation of the biological activity of potato juice sprayed in the spray dryer, as well as its fractions of different molecular mass. Fresh potato juice was spray dried or alternatively, cryoconcentrated. As the result of the latter process fivefold concentrated potato juice has been obtained. This product was separated by means of gel permeation chromatography. The isolated fractions were analysed in terms of their capability to inhibit the proliferation and to reduce viability of human cancer cell lines. Human normal cell lines were used as a reference. Our studies proved that processed potato juice, similar to the fresh one, reveals cytotoxicity potential to stomach and colon cancer cells. The spray drying only slightly decreased biological activity of potato juice. It is possible to obtain fivefold concentrated potato by application of cryoconcentration process. That product could be effectively separated by means gel filtration process. The highest cytotoxicity, specifically targeted to the cancer cells, was revealed in non-protein, thermally stable fraction of molecular mass below 1 kDa.

Key words: cytotoxicity, cryoconcentration, potato juice, separation, spray drying

WSTĘP

Aktywność biologiczna soku z ziemniaka oraz jego frakcji jest przedmiotem licznych kontrowersji. W europejskiej medycynie ludowej sok z ziemniaka (*Solanum tuberosum*) stosowany jest do leczenia stanów zapalnych przewodu pokarmowego (Vlachojannis i in., 2010). Również w tradycyjnej medycynie chińskiej oraz indyjskiej sok z *Solanum nigrum* jest stosowany do leczenia raka przewodu pokarmowego (Yi i in., 2008; Saleem i in., 2009). Aktualnie jednak woda sokowa wytwarzana w znacznej ilości przez przemysł ziemniaczany w toku kampanii krochmalniczej jest traktowana jako uciążliwy ściek, który może być w najlepszym przypadku (po wyizolowaniu zeń frakcji białkowej) zastosowana w żywieniu zwierząt (Pastuszewska i in., 2007; Tuśnio i in., 2011). Jest to związane z powszechnie znanym faktem toksycznego działania glikoalkaloidów (Pęksa i in., 2002; Pęksa i in., 2006, Rytel, 2010; Zgórska i in., 2006). Powszechnie stosowana technologia izolacji białka ziemniaczanego z wody sokowej polegająca na koagulacji kwasowo-termicznej pozwala co prawda na uzyskanie produktu o zmniejszonej zawartości glikoalkaloidów, jednak właściwości użytkowe tak otrzymanego produktu są dalece niezadowolające (Pastuszewska i in., 2007, Tuśnio i in., 2011). Stąd też konieczność prowadzenia prac nad poprawą jego właściwości (Løkra i in., 2009, Miedzianka i in., 2010, Miedzianka i in., 2012; Zwijnenbergh, 2002). Współcześnie realizowane badania kliniczne z użyciem świeżego soku z ziemniaka wskazują na jego przydatność terapeutyczną w leczeniu zaburzeń funkcjonowania przewodu pokarmowego (Chrubasik i in., 2006; Vlachojannis i in., 2010). Dominującym trendem jest przypisywanie aktywności przeciwzapalnej niektórym białkom zawartym w soku ziemniaka (Pouvreau i in., 2001, Ruseler-van Embden i in., 2004.). Niemniej jednak opublikowane zostały również badania *in vitro* wskazujące na aktywność substancji o charakterze glikoalkaloidów w stosunku do komórek nowotworowych (Kuo i in., 2000). Na uwagę zasługuje fakt, że glikoalkaloidy w których aglikonem jest solasodyna są już aktualnie stosowane przy leczeniu rakowych narośli skórnych (Jerzykiewicz, 2007). Z punktu widzenia aktywności biologicznej soku z ziemniaka najważniejsze są dane dotyczące zdolności do indukowania apoptozy komórek nowotworowych przez solaninę i chakoninę (Saleem i in., 2009; Ji i in., 2008).

Ziemniak mimo swej popularności jest rośliną niedocenianą, pomimo powszechnej świadomości jego wysokiej wartości odżywczej (Burlingame i in., 2009; Lotaladio i Castaldi, 2009; Rytel, 2010). W znacznym stopniu wynika to z niejednoznaczności danych na temat jego faktycznej aktywności biologicznej, zwłaszcza w odniesieniu do frakcji niskocząsteczkowej zawierającej glikoalkaliody (Korpan i in., 2004). Istnieje zatem konieczność prowadzenia dalszych badań z zastosowaniem nowych metod badawczych pozwalających na rzetelną ocenę przydatności nie tylko odżywczej ale również medycznej tej rośliny. Nasze wcześniejsze badania wskazują, że świeży sok z ziemniaka hamuje proliferację i ogranicza przeżywalność nowotworowych komórek pochodzących z żołądka (Hs476T) i jelita grubego (HT-29 i Caco-2). Natomiast w mniejszym stopniu wpływa na aktywność metaboliczną komórek raka wątroby (HepG2). Z punktu widzenia ewentualnego zastosowania spożywczego lub farmaceutycznego soku z ziemniaka niezwykle istotna jest wiedza jakie składniki soku z ziemniaka wykazują aktywność biologiczną oraz czy procesy technologiczne szczególnie przebiegające w podwyższonej temperaturze mają na nią wpływ.

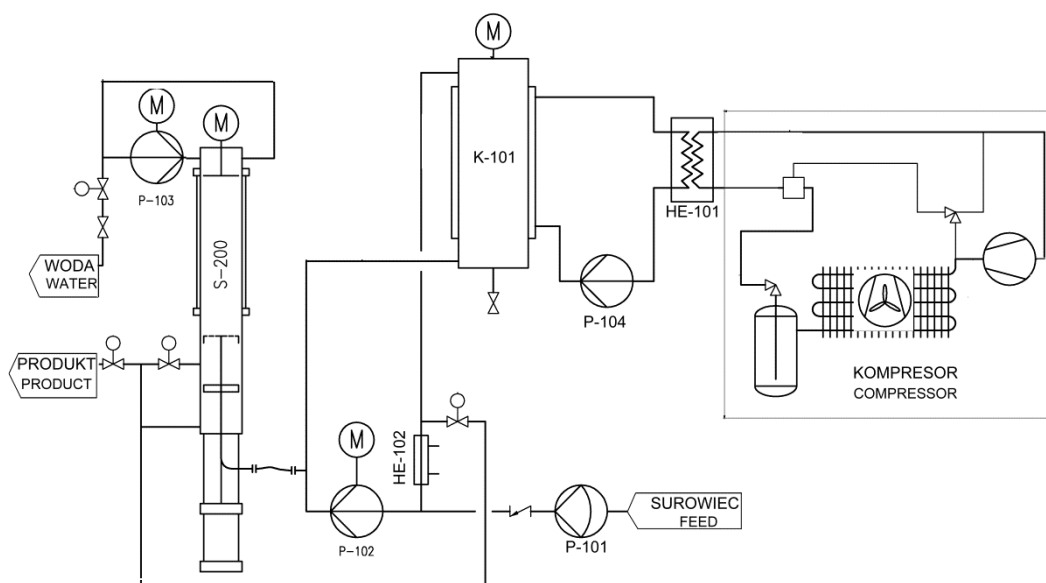
Celem pracy była ocena aktywności biologicznej soku ziemniaczanego wysuszonego w suszarce rozpyłowej oraz jego frakcji rozdzielonych ze względu na różnice w masie cząsteczkowej.

MATERIAŁY I METODY

Materiałem badawczym był świeży sok z ziemniaka pobrany w toku kampanii ziemniaczanej 2010 roku z Zakładu Produkcyjnego w Stawie należącego do Wielkopolskiego Przedsiębiorstwa Przemysłu Ziemniaczanego w Luboniu. Bezpośrednio po pobraniu sok był schładzany w zbiorniku magazynowym do temperatury 4°C i po przetransportowaniu do Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności poddany procesowi kriokoncentracji. Część świeżego soku utrwalono metodą suszenia rozpyłowego.

Suszenie rozpyłowe prowadzono na suszarni półtechnicznej P-6.3 firmy Niro Atomizer (Dania) przy zastosowaniu temperatur powietrza: 170°C na wlocie do komory suszarniczej, 95°C na wylocie oraz szybkości podawania soku 12 l/h otrzymując susz soku ziemniaczanego o wilgotności $10,69 \pm 0,24\%$. Oznaczenie suchej substancji metodą wagową wykonano zgodnie z Polską Normą PN-90/A-75101/03, w temperaturze 90°C.

Proces kriokoncentracji prowadzony był z wykorzystaniem systemu Pilot Plant Cold Concentration Unit (Freeze Tec, Holandia), którego uproszczony schemat przedstawiono na rysunku 1. Proces zateżnienia składał się z czterech etapów: przygotowania instalacji, optymalizacji parametrów separacji, produkcji oraz mycia. W fazie optymalizacji uwzględniono następujące zmienne procesowe: czas trwania cyklu oraz kompresji złoża lodu, temperatura wody płuczającej złożę lodu, czas pracy pompy płuczającej, sekwencja czasowa sterująca pracą zaworu odpowiedzialnego za usuwanie wody z systemu trakcie kolejnych cykli pracy kolumny.



Rys. 1. Schemat systemu Pilot Plant Cold Concentration Unit. P-101, 102, 103, 104 – pompy, K-101 – krystalizator, M – silnik, HE-101, 102 – wymienniki ciepła
Fig. 1. Diagram of the Pilot Plant Cold Concentration Unit system. P-101, 102, 103, 104 – pumps, K-101 – crystalliser, M – engine, HE-101, 102 – heat exchangers

Proces separacji koncentratu soku ziemniaczanego metodą chromatografii żelowej wykonywano wykorzystując do tego celu chromatograf preparatywny ÄKTA Explorer firmy Amersham Pharmacia (Szwecja) wyposażony w detektor UV-VIS i dwie kolumny połączone szeregowo: HiLoad 26/60 Superdex 75 pg oraz HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (Amersham Pharmacia, Szwecja). Kolumny umożliwiły rozdział molekuł o masach cząsteczkowych zawartych w zakresie $3 \times 10^3 - 6 \times 10^5$ Da. Analizy wykonano w temperaturze 25°C przy objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej wynoszącej 1ml/min. Objętość próbki wynosiła 10ml. Jako fazę ruchomą stosowano 0,05 M bufor fosforanowy o pH 7,0 zawierający 0,15 M NaCl. W trakcie rozdziału stosowano kolektor frakcji (Frac-900, Amersham Pharmacia, Szwecja). Frakcje o objętości 10 ml zbierano do probówek typu Falcon i przechowywano w stanie zamrożenia w temperaturze -80°C . Krzywą wzorcową rozkładu mas cząsteczkowych sporządzono wykorzystując Gel Filtration Calibration Kits (GE Healthcare) składający się z 10 białek o masach cząsteczkowych od $6,5 \times 10^3$ Da do $6,69 \times 10^5$ Da oraz Blue Dextran 2000.

Frakcje odpowiadające poszczególnym pikom uzyskanym w wyniku separacji metodą sączenia żelowego poddano analizie elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Rozdziały elektroforetyczne prowadzono w układzie składającym się z 5% żelu zagęszczającego oraz 12,5% żelu rozdzielającego. Próbki przed naniesieniem na żel poddawano denaturacji w temperaturze 100°C , przez 10 min. Objętość próbek nanoszonych na żel wynosiła $5 \mu\text{l}$. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 150 mV. Po zakończeniu rozdziału, żełe barwiono metodą srebrową według Blum i in. (1987).

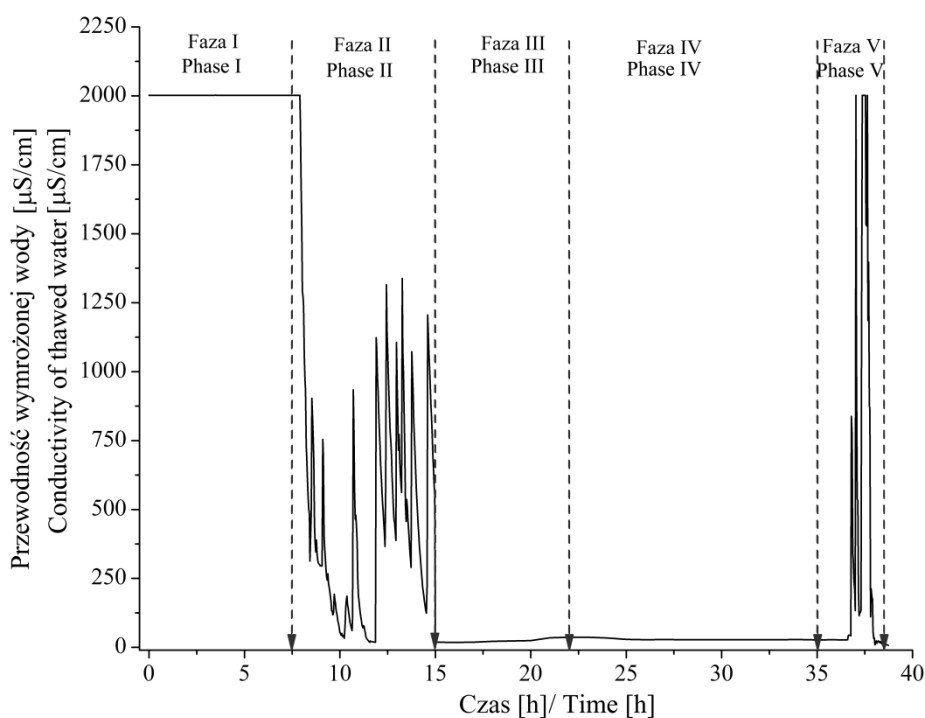
Cytotoksyczność soku z ziemniaka po kriokoncentracji i suszeniu rozpyłowym, oraz frakcji otrzymanych po separacji metodą chromatografii żelowej dla prawidłowych i nowotworowych komórek przewodu pokarmowego oznaczano testem MTT wg procedury opisanej przez Mosmann (1983). Do analizy zastosowano ludzkie komórki nowotworowe pochodzące z raka żołądka (linia HsT476), jelita grubego (linia Caco-2 i HT-29) i wątroby (linia HepG2). Oznaczenia wykonano również na prawidłowych komórkach nabłonka jelita cienkiego (linia IEC-6) oraz jelita grubego (linia NCM460). Hodowle komórek prowadzono w pożywce DMEM z dodatkiem mieszaniny niezbędnych aminokwasów (1%), płodowej surowicy bydlęcej (10%) i gentamycyny (50 mg/l) w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂ i 95% powietrza. Na podstawie wyników badań wyznaczono dawki cytotoksyczne IC₅₀, określające stężenie produktów powodujące 50% inhibicję proliferacji i aktywności metabolicznej komórek.

WYNIKI I DYSKUSJA

Świeży sok z ziemniaka stanowi roztwór zawierający około 1% związków mineralnych oraz 4% związków organicznych, głównie o charakterze białkowym (ok. 2%) (Nowotny, 1972). Wykorzystanie tego surowca w charakterze źródła substancji bioaktywnych wymaga jego uprzedniego zatężenia. W przemyśle spożywczym efekt ten uzyskuje się zwykle poprzez odparowanie wody za pomocą stacji wyparych, koncentrację za pomocą technik membranowych oraz poprzez kriokoncentrację (Dembczyński i in., 2009). Ostatnia z wymienionych metod jest szczególnie interesująca, bowiem podczas tego procesu następuje wymrożenie wody w postaci kryształów lodu, które są następnie usuwane z układu za pomocą kolumn separacyjnych. Proces zatężenia przebiega w temperaturze poniżej 0°C, co pozwala na zachowanie praktycznie wszystkich substancji bioaktywnych obecnych w badanym surowcu (Fellows, 2000).

Proces kriokoncentracji składał się z kilku faz. Po wstępnym myciu oraz napełnieniu instalacji surowcem następowało jej odpowietrzenie oraz powolne schłodzenie do temperatury około 0°C (rys. 2, Faza I). Szybkość, z jaką prowadzi się schładzanie jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości suchej substancji w surowcu. W trakcie tej fazy na wewnętrznej powierzchni krystalizatora rozpoczyna się formowanie niewielkich kryształów lodu, których średnica wynosi około 10 µm (rys. 1, K-101).

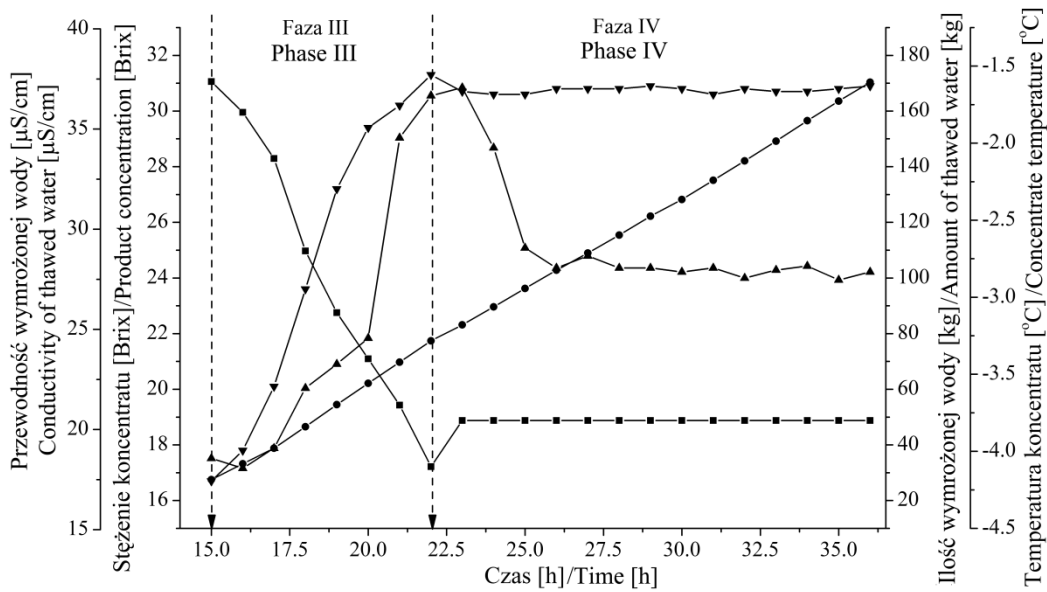
Kolejna faza procesu (rys. 2, Faza II) polega na optymalizacji parametrów pracy kolumny separacyjnej, stanowiącej kluczowy element instalacji produkcyjnej (rys. 1, S-200). Kolumna zbudowana jest cylindra wyposażonego w ruchomy tłok zakończony sitem, na powierzchni którego następuje separacja lodu od koncentratu. Celem optymalizacji jest uzyskanie kryształów o wielkości 200–300 µm oraz uformowanie stabilnego i odpowiednio skompresowanego złoża wypełniającego kolumnę. O efektywności pracy kolumny decyduje siedem wzajemnie ze sobą powiązanych zmiennych.



Rys. 2. Zmiany przewodności wody wymrożonej w trakcie kriokoncentracji soku z ziemniaka. Faza I – przygotowanie instalacji, Faza II – optymalizacja parametrów pracy systemu (zawracanie wody do zbiornika z surowcem), Faza III – kriokoncentracja w układzie okresowym, Faza IV – kriokoncentracja w układzie ciągłym z jednoczesnym zrzutem wody oraz zateżonego produktu, Faza V – mycie instalacji

Fig.2. Changes of conductance of water frozen during cryoconcentration of potato juice. Phase I – preparation of the installation, Phase II – optimisation of process parameters (recycling of water into container of raw material), Phase III - batch cryoconcentration, Phase IV – continuous cryoconcentration with removing of water and concentrated product, Phase V – cleaning of the installation

Poza tym parametry pracy kolumny są zależne od rodzaju surowca, jego składu chemicznego oraz lepkości. Przy błędnie dobranych zmiennych procesowych, np. przy zbyt krótkim czasie trwania cyklu oraz zbyt wysokiej temperaturze wody płuczającej złoża lodu obserwuje się zjawisko kanalikowania (ang. channeling) oraz nierównomierny rozkład strefy podziału pomiędzy lodem a koncentratem (ang. viscous fingering). W rezultacie następuje mieszanie się koncentratu z wodą usuwaną z systemu, co objawia się okresowymi zmianami w przewodności (rys. 2, Faza II). Na podstawie obserwacji zmian w przewodności oraz oceny stabilności złoża lodu wyznaczano optymalne parametry procesu: czas trwania cyklu: 40s; czas kompresji: 10s; temp. wody płuczającej złoża lodu: 3,5°C; czas pracy pompy płuczającej: 15s; czas otwarcia i zamknięcia zaworu spustowego w trakcie każdego cyklu pracy kolumny odpowiednio 9 i 5s.



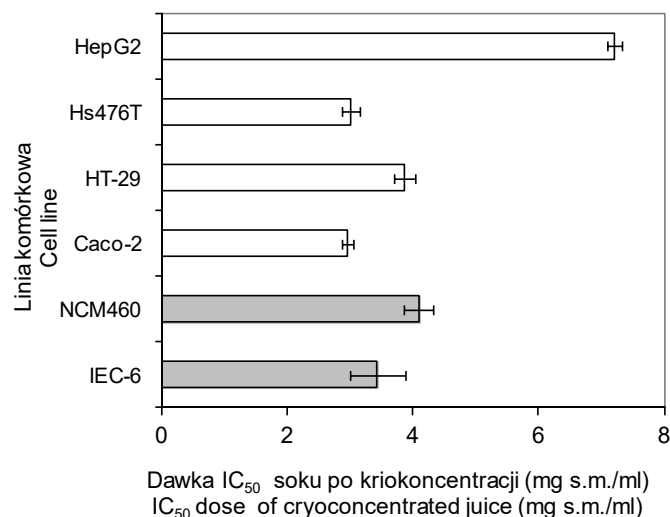
Rys. 3. Zmiany wybranych parametrów w trakcie III i IV fazy procesu kriokoncentracji. ▲ - przewodność wymrożonej wody, ▼ - stężenie koncentratu, ■ - temperatura koncentratu, ● - ilość wymrożonej wody

Fig. 3 Changes of some parameters of II and IV cryoconcentration phase. ▲ - conductance of frozen water, ▼ - concentration of concentrate, ■ - temperature of concentrate, ● - the amount of frozen water

W III fazie zatężania, po uzyskaniu stabilnego złoża lodu w kolumnie rozpoczęto usuwanie wody z układu, co powodowało wzrostu stężenia koncentratu (rys. 3). Proces prowadzono tą metodą aż do uzyskania stężenia na poziomie 31°Brix, co odpowiadało blisko pięciokrotnemu zagęszczeniu soku. Wraz ze wzrostem zagęszczenia następował także wzrost przewodności wody, co wiązało się prawdopodobnie ze wzrostem lepkości koncentratu. Zbyt wysoka lepkość koncentratu powoduje, że spada wydajność produkcji lodu oraz pojawiają się problemy z wydajnym przemywaniem złoża, co prowadzi do wzrostu strat zatężanych substancji bioaktywnych. Celem ograniczenia wspomnianych strat rozpoczęto zrzut koncentratu przy jednoczesnym uzupełnianiu systemu świeżym sokiem (Faza IV, praca w systemie ciągłym). Temperatura produktu podczas fazy zrzutu oraz średnia przewodność wody usuwanej z układu wynosiła odpowiednio $-3,8^{\circ}\text{C}$ i $29,24 \pm 2,81 \mu\text{S/cm}$. W wyniku procesu kriokoncentracji, z 200 litrów świeżego soku z ziemniaka o zawartości ekstraktu 6°Brix uzyskano około 40 litrów koncentratu o stężeniu ekstraktu $30,5^{\circ}\text{Brix}$.

Procesy obróbki niskotemperaturowej takie jak kriokoncentracja czy liofilizacja nie zmieniają na aktywności biologicznej (rozumianej jako potencjał antyoksydacyjny oraz toksyczność w stosunku do niektórych, nowotworowych, linii komórkowych) świeżego soku ziemniaczanego (Kowalczewski i in., 2012, Olejnik i in., 2011). Jak wynika z danych przytoczonych na rysunku 4 kriokoncentrat soku ziemniaczanego okazał się szczególnie toksyczny w stosunku nowotworowych linii komórkowych Hs476T oraz Caco-2

pochodzących odpowiednio z żołądka i jelita grubego. Mniejszą aktywność cytotoksyczną obserwowano w odniesieniu do prawidłowych komórek nabłonka jelita cienkiego IEC-6 i jelita grubego NCM460. Najłabsze działanie wykazano w stosunku do komórek wątroby HepG2 pochodzenia nowotworowego, wykazujących wiele funkcjonalnych cech typowych dla prawidłowych hepatocytów.

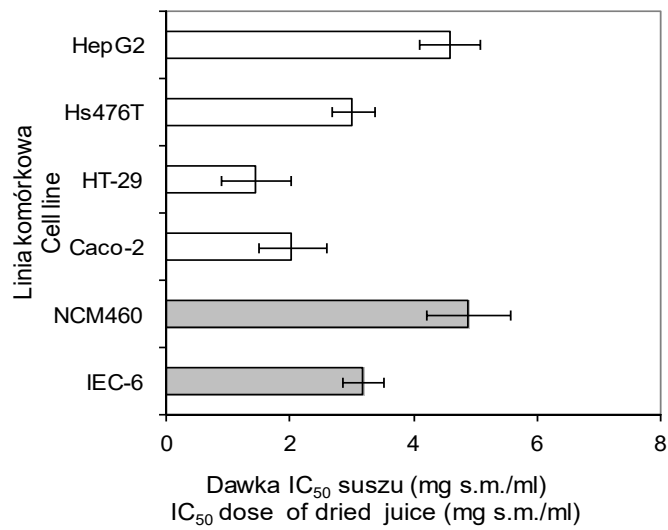


Rys. 4. Dawki cytotoksyczne obliczone dla komórek prawidłowych (linii IEC-6 i NCM460) i nowotworowych (linii Hs476T, Caco-2, HT-29 i HepG2) pochodzących z przewodu pokarmowego, eksponowanych na sok z ziemniaka po procesie kriokoncentracji

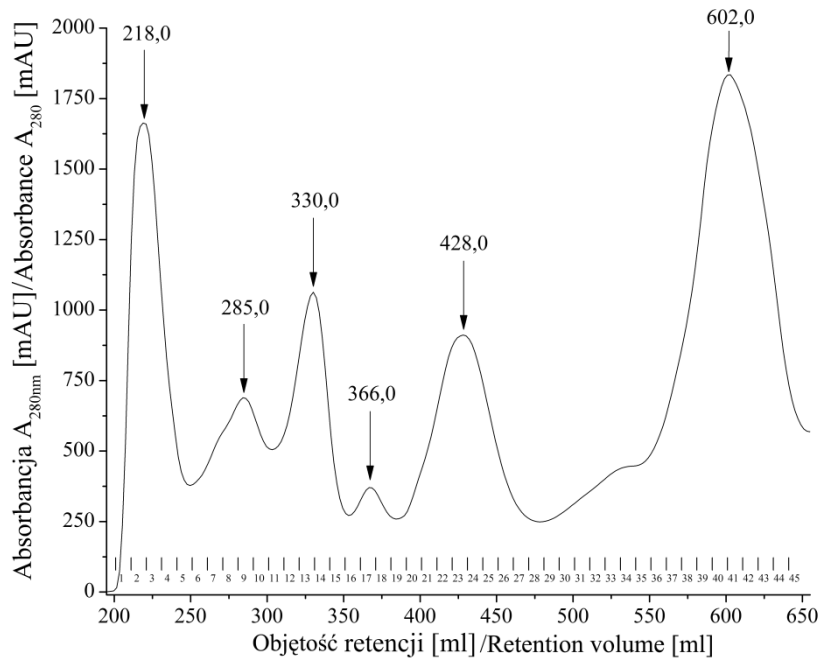
Fig. 4. Cytotoxic doses calculated in normal cells (IEC-6 and NCM460 cell line) and cancerous cells (Hs476T, Caco-2, HT-29 and HepG2 cell line) derived from gastrointestinal tract, exposed to potato juice after cryoconcentration process

Podobnie jak proces kriokoncentracji, również zabieg suszenia rozpyłowego nie wpłynął znacząco na aktywność cytotoksyczną soku ziemniaczanego (rys. 5). Susz, analogicznie do kriokoncentratu, okazał się najbardziej cytotoksyczny w stosunku do komórek nowotworowych jelita grubego i żołądka. Natomiast najmniejszy wpływ wywierał na proliferację i żywotność prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego NCM460 oraz hepatocytów HepG2.

Uzyskane wyniki sugerują, że za aktywność cytotoksyczną ukierunkowaną na komórki nowotworowe odpowiadają prawdopodobnie związki zawarte w soku ziemniaczanym odporne na podwyższoną temperaturę. Sformułowana hipoteza wyklucza działanie wysokocząsteczkowych substancji białkowych, ponieważ aktywność biologiczna białek jest ściśle powiązana z ich strukturą natywną. W celu weryfikacji postawionej tezy komórki nowotworowe nabłonka jelita grubego linii HT-29, wykazujące największą wrażliwość na działanie suszu soku ziemniaczanego, poddano ekspozycji na frakcje otrzymane w procesie separacji metodą preparatywną filtracji żelowej. Procesowi temu poddano sok zatężony uprzednio metodą kriokoncentracji.



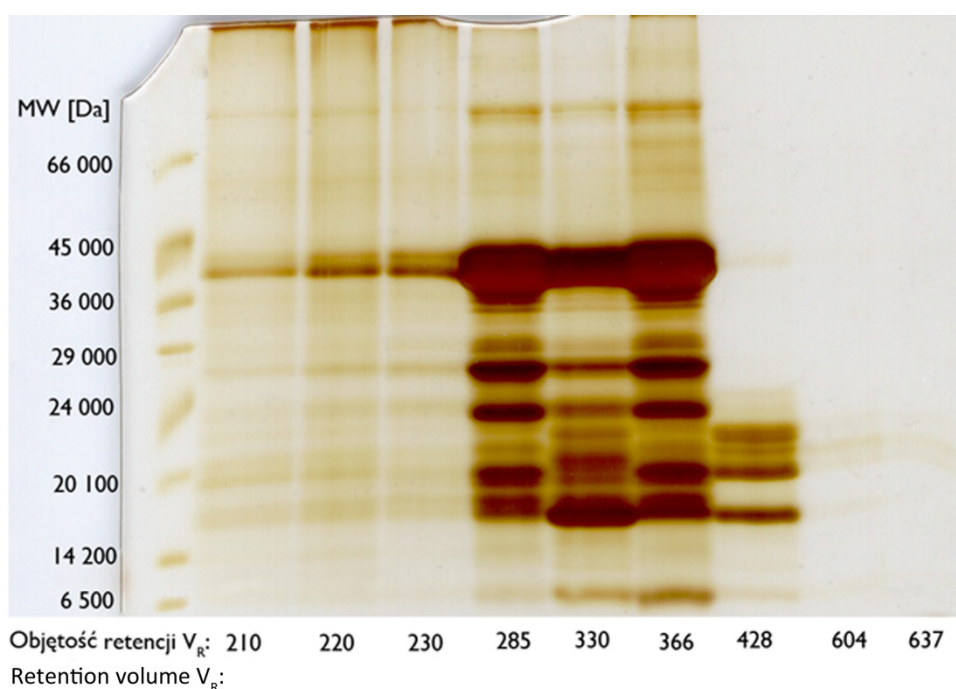
Rys. 5. Dawki cytotoksyczne obliczone dla komórek prawidłowych (linii IEC-6 i NCM460) i nowotworowych (linii Hs476T, Caco-2, HT-29 i HepG2) pochodzących z przewodu pokarmowego, ekspozowanych na sok z ziemniaka po suszeniu rozpyłowym
Fig. 5. Cytotoxic doses calculated in normal cells (IEC-6 and NCM460 cell line) and cancerous cells (Hs476T, Ccao-2, HT-29 and HepG2 cell line) derived from gastrointestinal tract, exposed onto potato juice after spray drying process



Rys. 6. Rozdział, metodą GPC, próbki soku z ziemniaka zatężonego metodą kriokoncentracji
Fig. 6. GPC separation of cryoconcentrated potato juice

Ze względu na małą objętość stosowanych kolumn ($V_0 = 200$ ml) właściwy proces rozdzielania obejmował objętość retencji w zakresie 200–650 ml eluatu. Pozwoliło to na zebranie 45 frakcji (rys. 6). Na chromatogramie GPC (rys. 6) zaobserwowano 6 pików o średnich masach cząsteczkowych od 0,6 kDa (objętość retencji 602 ml) do ponad 600 kDa (objętość retencji 602 ml).

Fracje odpowiadające poszczególnym pikom uzyskanym w wyniku separacji metodą sączenia żelowego poddano analizie elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (rys. 7). Wykazała ona, że pięć spośród sześciu analizowanych frakcji zawiera substancje białkowe. W przypadku ostatnich dwóch próbek o objętości retencji 604 i 637 ml nie stwierdzono obecności białek, mimo wysokiej absorpcji zarejestrowanej podczas rozdzielania chromatograficznego. Ich średnia masa cząsteczkowa wskazuje, że mogą to być zarówno witaminy, aminokwasy jak i toksyczne alkaloidy.



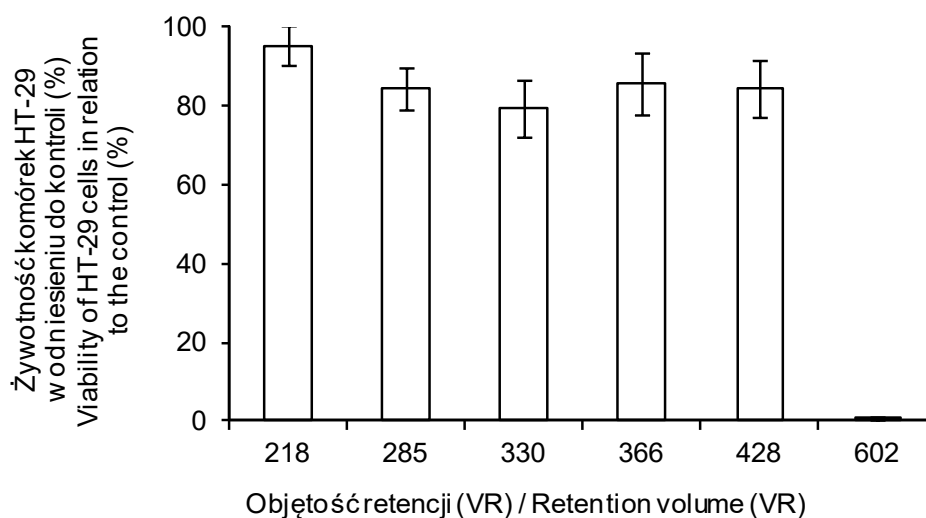
Rys. 7. Elektroforetyczny rozdział frakcji uzyskanych po sączeniu żelowym krikoncentratu soku z ziemniaka

Fig. 7. Electrophoresis of the fractions obtained in gel filtration separation of potato juice

Badania cytotoksyczności dla komórek nabłonka jelita grubego HT-29, frakcji odpowiadających pikom na chromatogramie GPC wykazały, że największą aktywnością charakteryzowała się niskocząsteczkowa frakcja (odpowiadająca 602. ml retencji) zawierająca m.in. glikoalkaloidy (rys. 8). Frakcje białkowe (odpowiadające 218., 285., 330., 366. i 428. ml retencji), mimo iż nie zostały zdenaturowane w procesach przetwórczych, wykazywały niewielki potencjał cytotoksyczny w stosunku do komórek

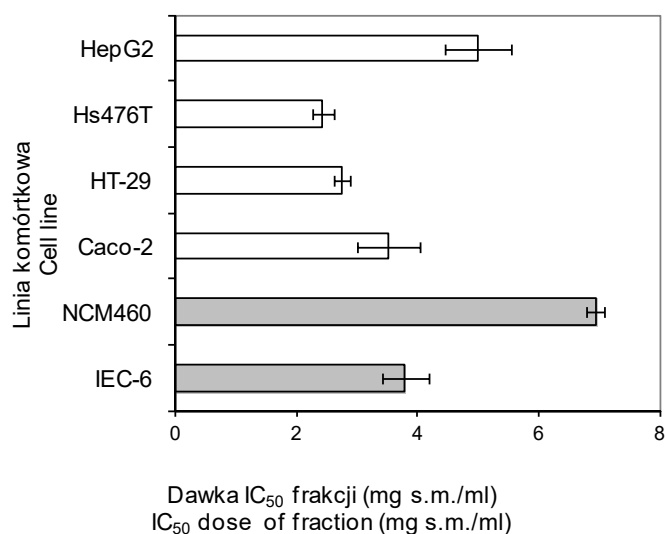
linii HT-29. Uzyskane wyniki wskazały na celowość oceny poziomu toksyczności niskocząsteczkowej frakcji soku z ziemniaka dla pozostałych komórek przewodu pokarmowego, w tym również dla prawidłowych kultur komórkowych.

Dane przedstawione na rysunku 9 wskazują na aktywność cytotoksyczną frakcji zawierającej związki niskocząsteczkowe i potwierdzają wyniki otrzymane w analizach wykonanych dla kriokoncentratu i suszu soku ziemniaczanego. Frakcja niskocząsteczkowa, podobnie jak produkty przetworzone, w największym stopniu ograniczała proliferację i aktywność metaboliczną komórek nowotworowych Hs476T i HT-29, izolowanych z raka żołądka i jelita grubego. Najmniejszą toksyczność frakcji stwierdzono dla prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego NCM460, następnie dla hepatocytów linii HepG2.



Rys. 8. Przeżywalność komórek HT-29 w obecności frakcji w stężeniu 20% v/v
Fig. 8 Viability of HT-29 cells cultured in the presence of fractions at concentration of 20% v/v

Przedstawione rezultaty badań wskazują na potencjalną zdolność niskocząsteczkowych związków zawartych w soku z ziemniaka, odpornych na obróbkę termiczną, do ograniczania proliferacji i żywotności komórek nowotworowych, szczególnie w obrębie żołądka oraz jelit. Wyniki wstępnych badań stanowią przesłankę do podjęcia kolejnych bardziej szczegółowych prac dotyczących wpływu związków bioaktywnych soku ziemniaczanego na regulację cyklu komórkowego oraz indukcję procesu apoptozy. Oznaczenia cytotoksyczności i aktywności biologicznej *in vitro* wymagają kontynuacji i potwierdzenia wyników w testach *in vivo* na modelach zwierzęcych oraz w badaniach klinicznych.



Rys. 9. Dawki cytotoksyczne obliczone dla komórek prawidłowych (linii IEC-6 i NCM460) i nowotworowych (linii Hs476T, Caco-2, HT-29 i HepG2) pochodzących z przewodu pokarmowego, eksponowanych na frakcję zawierającą związki niskocząsteczkowe, otrzymaną po rozdziale kriokoncentratu soku ziemniaczanego metodą GPC

Fig. 9. Cytotoxic doses calculated in normal cells (IEC-6 and NCM460 cell line) and cancerous cells (Hs476T, Caco-2, HT-29 and HepG2 cell line) derived from gastrointestinal tract, exposed to low molecular mass fraction obtained during GPC separation of cryoconcentrated potato juice

WNIOSKI

Przeprowadzone badania wykazały, że produkty przetwórstwa soku ziemniaczanego, podobnie jak świeży sok, posiadają potencjał cytotoksyczny w odniesieniu do komórek nowotworowych żołądka i jelita grubego. W szczególności wykazano że:

- proces suszenia rozpyłowego w niewielkim stopniu obniża aktywność biologiczną soku z ziemniaka
- proces kriokoncentracji pozwala na pięciokrotne zatężenie składników soku ziemniaczanego, które następnie mogą być efektywnie separowane na frakcje różniące się masą cząsteczkową w procesie filtracji żelowej
- największą cytotoksycznością skierowaną specyficznym na komórki nowotworowe cechuje się niebiałkowa, odporna na obróbkę termiczną frakcja o masie cząsteczkowej poniżej 1 kDa.

LITERATURA

- Blum H., Beier H., Gross H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93 — 99.
- Burlingame B., B Mouille B., Charrondiere R. 2009. Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *Critical Review. J. Food Compos. Anal.* 22: 494 — 502.

- Chrubasik S., Chrubasik C., Torda T., Madish A. 2006. Efficacy and tolerability of potato juice in dyspeptic patients: A pilot study. *Phytomedicine* 13: 11 — 15.
- Dembczyński R., Białas W., Biegańska-Marecik R., Jankowski T. 2009. Wpływ metody zagęszczania na właściwości wybranych soków owocowych. *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna* 1: 63 — 69.
- Fellows P.J., 2000. *Food Processing Technology*, 2nd ed. Woodhead Publishing, Cambridge, England. Part II–IV.
- Jerzykiewicz J. 2007. Alkaloidy roślin z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*). *Postepy Biochem.* 53 (3): 287 — 296.
- Ji Y.B., Gao S.Y., Ji C.F., Zou X. 2008. Induction of apoptosis in HepG2 cells by solanine and Bcl-2 protein. *J. Ethnopharmacol.* 115: 194 — 202.
- Korpan Y.I. Nazarenko E.A. Skryshevskaya, Martelet C., Jaffrezic-Renault N., El'skaya A.V. 2004. Potato glycoalkaloids: true safety or false sense of security. *Trends Biotechnol.* 22: 147 — 151.
- Kowalczewski P., Celka K., Białas W., Lewandowicz G. 2012. Antioxidant activity of potato juice. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 11 (2): 175 — 181.
- Kuo K-W., Hsu S-H., Lin W-L., Liu L-F., Chang L-C. Lin C-C., Lin C-N., Sheu H-M. 2000. Anticancer Activity Evaluation of the Solanum Glycoalkaloid Solamargine, *Biochem. Pharmacol.* 60: 1865 — 1873.
- Lutaladio NB., Castaldi L. 2009. Potato: The hidden treasure. *J. Food Compos. Anal.* 22: 491 — 493.
- Løkra S., Schüller R.B., Egelanddal B., Engebretsen B., Straetkvern K.O. 2009. Comparison of composition, enzyme activity and selected functional properties of potato proteins isolated from potato juice with two different expanded bed resins. *LWT — Food Sci. Technol.* 42: 906 — 913.
- Miedzianka J., Pęksa A., Smolarczyk E. 2010. Zastosowanie przemysłowego soku ziemniaczanego do otrzymywania preparatów białka arylowanego. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 557: 261 — 273.
- Miedzianka J., Pęksa A., Aniołowska M. 2012. Properties of acetylated potato protein preparations. *Food Chem.* 133: 1283 — 1291.
- Mosnmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for estimation for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55 — 63.
- Nowotny F. 1972. *Technologia przetwórstwa ziemniaczanego*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa.
- Olejnik A., Białas W., Tomczyk J., Lewandowicz G. 2011. Cytotoksyczność i genotoksyczność soku z ziemniaka. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu* nr 205: 118 — 125.
- Pastuszewska B., Taciak M., Tuśnio A. 2007. Koncentrat białka ziemniaczanego w żywieniu zwierząt monogastrycznych. *Postępy Nauk Rolniczych* 5: 91 — 106.
- Pęksa A., Gołubowska G., Rytel E., Lisińska G., Aniołowski K. 2002. Influence of harvest date on the glycoalkaloid contents of three potato varieties. *Food Chem.* 78: 313 — 317.
- Pęksa A., Gołubowska G., Aniołowski K., Lisińska G., Rytel E., 2006. Changes of glycoalkaloids and nitrate contents in potatoes during chip processing. *Food Chem.* 97: 151 — 156.
- Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S. R., van den Broek A. M., van Koningsveld G.A., Voragen A. G. J. 2001. Relative Abundance and Inhibitory Distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *J. Agr. Food Chem.* 49: 2864 — 2874.
- Ruseler-van Embden J. G. H., van Lieshout L. M. C., Laman J.D., 2004, Methods and means for preventing or treating inflammation or prurities. Patent USA 6: 723,354.
- Rytel E. 2010. Wybrane substancje odżywcze i antyżywnieniowe ziemniaka i zmiany ich zawartości podczas przetwarzania na produkty spożywcze. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 557: 43 — 61.
- Saleem T.S.M., Chetty C.M., Ramkanth S., Alagusundaram M., Gnanaprakash K., Rajan V.S.T., Angalaparameswari S. 2009. *Solanum nigrum* Linn. — A review. *Pharmacogn. Rev.* 3 (6): 342 — 345.
- Tajner-Czopek A., Rytel E., Kita A., Pęksa A., Hamouz K. 2012. The influence of thermal process of coloured potatoes on the content of glycoalkaloids in the potato products. *Food Chem.* 133: 117 — 1122.
- Tuśnio A. Pastuszewska B. Swiech E. Taciak M. 2011. Response of young pigs to feeding potato protein and potato fibre — nutritional, physiological and biochemical parameters. *J. Anim. Feed Sci.* 20 (3): 361 — 378.

- Vlachojannis, J.E., Cameron M., Chrubasik S. 2010. Medicinal Use of Potato-derived Products, A Systematic Review. *Phytother. Res.* 24.
- Zgórska K., Czerko Z., Grudzińska M. 2006. Wpływ wybranych czynników na zawartość glikoalkaloidów w bulwach ziemniaka. *Żyw. Nauk. Technol. Ja. 1 (46) Supl.:* 229 — 234.
- Zwijnenbergh H.J. Kemperman A.J.B. Boerrigter M.E. Lotz M. Dijksterhuis J.F. Poulsen P.E., Klops G.-H. 2002. Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. *Desalination* 144: 331 — 334.