

Wykorzystywanie metabolomiki w analizie produktów rolnych i spożywczych

Ewa Jawień*

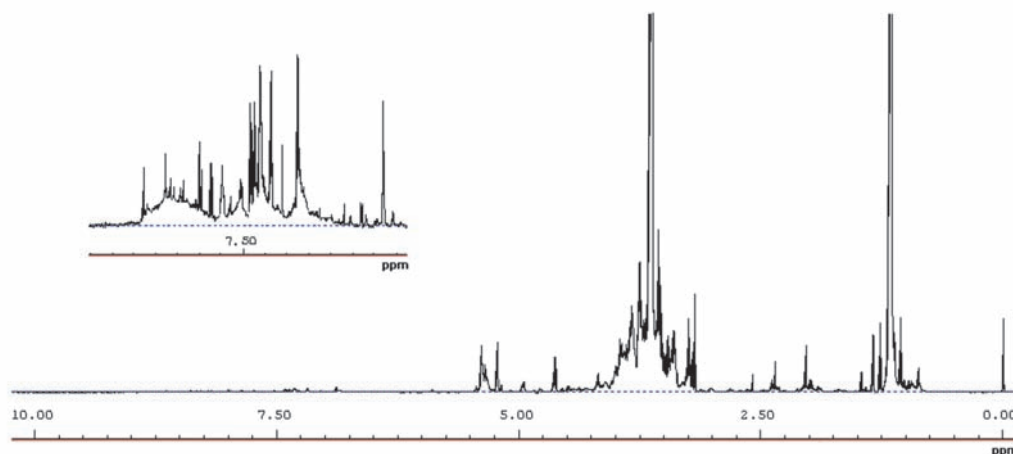
W artykule zamieszczonym w numerze 2/2012 dwumiesięcznika LAB zatytułowanym „Metabolomika jako potencjalna metoda diagnostyczna w medycynie” zostało opisane co to jest metabolomika, jakie metody analityczne i chemometryczne wykorzystuje oraz jakie problemy można za jej pomocą rozwiązywać w medycynie, badając profile niskocząsteczkowych związków (MW < 1500 Da). Do tych związków należą między innymi: aminokwasy, kwasy tłuszczowe, cukry, aminy, nukleotydy, kwasy organiczne, fenole etc., które są produktami funkcjonowania komórek, tkanek lub całych narządów, a ich skład jakościowy i ilościowy odzwierciedla stan organizmów [1].

Metabolomika pozwala nie tylko na badanie metabolitów pochodzących z organizmu ludzkiego, ale jest także bardzo przydatnym narzędziem do analizy jakościowej roślin i zwierząt hodowlanych, a co za tym idzie również żywności w szerokim tego słowa znaczeniu (produkty rolne oraz spożywcze) [2]. Metabolomikę należy w tym wypadku rozumieć jako zaawansowane narzędzie

analityczne, za pomocą którego można obserwować ilościowe i jakościowe zmiany związków chemicznych w żywności. Analizę taką można podzielić na analizę ukierunkowaną (*ang. targeted analysis*) i ogólną profilową (*ang. untargeted analysis*) [2]. Za pomocą analizy ukierunkowanej bada się grupę konkretnych, zidentyfikowanych związków chemicznych, które mogą być markerami różnych procesów biochemicznych, a tym samym mogą świadczyć np. o przydatności żywności do spożycia. Analiza profilowa jest podejściem całościowym,

co oznacza, że badaniu podlega profil wszystkich niskocząsteczkowych związków chemicznych obecnych w próbce, które nie zawsze muszą być zidentyfikowane. Jest to podejście holistyczne opisujące cechy danego produktu. Stosowane metody metabolomiczne w analizie żywności różnią się pomiędzy metabolomiką stosowaną w diagnostyce medycznej (badanie przede wszystkim płynów fizjologicznych), głównie w przygotowaniu próbki, które w przypadku badania żywności są niejednokrotnie bardziej skomplikowane

i częstokroć wymagają wielu wstępnych etapów: zateżnienia analizowanej próbki, różnego rodzaju ekstrakcji, derywatywacji, etc. [2]. Natomiast wykorzystywane metody analityczne, takie jak spektroskopia rezonansu magnetycznego NMR oraz spektrometria mas MS wraz z metodami chemometrycznymi pozostają takie same. Metabolomikę produktów rolnych oraz ich przetworów można stosować w bezpieczeństwie żywnościowym (zakażenia drobnoustrojami, badanie żywności genetycznie modyfikowanej, badanie wpływu procesów technolo-



Rys. 1. Widmo ^1H NMR piwa (badania własne) uzyskane za pomocą spektrometru Bruker Avance AMX 600 MHz 90% piwa:10% D_2O .

gicznych na jakość wytwarzanej żywności), badaniu jakości produktów rolnych oraz spożywczych, badaniu oryginalności (autentyczności) żywności [2,3,4]. W ostatnim przypadku należy pamiętać, że stężenie poszczególnych związków chemicznych może się zmieniać w zależności od różnych czynników typu: warunki uprawy, klimat, typ gleby, warunki składowania i przechowywania etc. [5]. Duży potencjał aplikacyjny metabolomiki występuje w badaniu mikrobiologicznym żywności w tym rozróżnieniu typów bakterii i grzybów w poszukiwaniu naturalnych konserwantów produktów spożywczych [2].

Badania metabolomiczne z przykładami

Za pomocą badań metabolomicznych można badać różnego rodzaju produkty rolne jak i produkty spożywcze m.in. owoce i warzywa, zboża, mleko, sery, miód, chleb, mięso, wyroby wędliniarskie, soki owocowe oraz napoje alkoholowe. Jednym z najbardziej popularnych tego typu napojów jest piwo, które w wielu pracach było analizowane pod różnymi względami. Jedną z najbardziej popularnych metod wykorzystywanych w metabolomice jest spektroskopia rezonansu magnetycznego NMR za pomocą, której można zanalizować większość związków chemicznych występujących w piwie oraz opracować otrzymane wyniki za pomocą metod chemometrycznych (rys. 1) [6,7].

Przeprowadzone badania z wykorzystaniem tej metody wykazały, że widmo $^1\text{H NMR}$ poza obszarem występowania sygnału od wody i etanolu można podzielić na trzy inne: alifatyczny (0,5–3,0 ppm), region cukrowy (3,0–6,0 ppm) oraz aromatyczny (6,0–10,0 ppm). W regionie od 0,5–3 ppm można wyróżnić alkohole, kwasy organiczne, a także aminokwasy.

W badanym zakresie mogą również występować kwasy tłuszczowe, które odpowiedzialne są za charakterystyczny smak piwa. Natomiast region cukrowy widma wskazuje na dużą zawartość różnego rodzaju węglowodanów prostych i złożonych (dekstryn). W ostatnim regionie aromatycznym można zaobserwować obecność aromatycznych aminokwasów, nukleozydów i alkoholi aromatycznych jak również związków polifenolowych [5].

Tak dokładna analiza pozwala na różnicowanie piw pod względem: gatunków, miejsca, partii oraz jakości drożdży użytych w procesach technologicznych oraz ich powtarzalności [6,7,9]. Analiza metabolomiczna sprawia, że za pomocą tych samych pomiarów można kontrolować bardzo dokładnie wiele parametrów tego napoju. Dodatkowo możliwe jest wskazanie na konkretne związki chemiczne – metabolity, które mogą odpowiadać za niepożądane właściwości organoleptyczne tego trunku. Konsekwencją tak zaawansowanej analizy mogą być zmiany w technologicznych procesach produkcyjnych,

IKA POL

Przedstawiciel w Polsce Firmy IKA WERKE GmbH

Działalność firmy obejmuje doradztwo techniczne, dystrybucję i handel sprzętem laboratoryjnym, pomiarowo-analitycznym i produkcyjnym:



▪ sprzęt laboratoryjny

- mieszadła magnetyczne, mieszadła mechaniczne, homogenizatory, wytrząsarki, młynki, łożnie wodne
- płyty grzewcze, pompy próżniowe i perystaltyczne, wyparki, ekstraktory substancji stałych, reaktory laboratoryjne

▪ sprzęt pomiarowo-analityczny

- zagniataarki, elektrolizery, termogravimetry, kalorymetry, analizatory laboratoryjne C, S, N, O, H, CO₂

▪ sprzęt produkcyjny

- pojemnościowy - homogenizatory, turbotrony, rototrony
- przepływowy - homogenizatory, dispax reaktory, młyny koloidalne
- emulgatory - mieszalniki (o poj. of 10 - 4000 l) - dla substancji o różnej lepkości



IKA POL

02-793 Warszawa, ul. Przy Bażantarni 4/6, Biuro Obsługi Klienta: 02-886 Warszawa; ul. Rybaków 14 tel.: 22/649 24 05; fax: 22/ 859 14 39, email: info@ikapol.pl, www.ikapol.pl, www.ika.com

IKA®



Designed to work perfectly

które wpływałyby na wzrost jakości piwa.

Następnym popularnym napojem jest zielona herbata, która również stała się przedmiotem badań metabolomicznych [10]. Badanie jakości herbaty jest bardzo trudne, gdyż zależy ono od bardzo wielu czynników tj. czynniki genetyczne rośliny, warunki klimatyczne, rodzaj gleby, wysokość wzrostu, czas zbiorów, przetwarzanie czy przechowywanie [10]. Jakość herbaty jest oceniana poprzez jej wygląd (kolor, intensywność i zmętnienie), smak, a także aromat [10]. W ostatnich latach zielona herbata była badana głównie pod kątem właściwości zdrowotnych. Pomimo to znanych jest jej kilka markerów jakościowych, do których należą: kofeina, kwas galusowy i teanina [10]. Le Galla wraz ze współpracownikami zbadali za pomocą metody ^1H NMR 191 rodzajów herbat pochodzących z Chin, Japonii, Wietnamu, Indii, Indonezji i Bangladeszu [10]. Przy użyciu jednowymiarowego (1D) i dwuwymiarowego (2D) widma NMR zidentyfikowali około 30 związków. Oprócz aminokwasów, cukrów czy kwasów tłuszczowych zostały zidentyfikowane fenole, flawonoidy oraz ksantyny [10]. Ze standardowych badań metabolomicznych wynika, iż skład herbat chińskich jest różnorodny i częściowo pokrywa się z herbatami z innych krajów. Autorzy tłumaczą ten fakt niewielkim zbiorem herbat pochodzących z poza Chin oraz dużą

różnorodnością warunków uprawy herbaty w samym Państwie Środka. Dopiero analiza klasterowa pozwoliła na ich rozróżnienie ze względu na pochodzenie geograficzne. Autorzy wskazali również na związki markerowe, które mogą służyć rozróżnianiu jakości herbaty. Opracowanie zbioru związków markerowych stwarza możliwość obiektywnej analizy herbat w oparciu o jej skład chemiczny jak i określania jej autentyczności.

Jak już wcześniej zostało napisane oprócz napojów przedmiotem badań mogą być również produkty rolnicze takie jak owoce i warzywa. Przykładem mogą być owoce jagodowe, których spożywanie daje wiele korzyści zdrowotnych, ponieważ zawierają witaminę C, rozpuszczalny błonnik i różnego rodzaju polifenole [11]. Stewart wraz ze współpracownikami przeprowadzili badania za pomocą spektrometrii mas MS mające na celu lepsze zrozumienie wpływu warunków hodowli malin na zawartość związków polifenolowych w nich zawartych. Przedmiotem badań były maliny hodowane w dwóch różnych środowiskach. Pierwsze było niskonakładowym zacienionym stanowiskiem. Drugie zaś było dobrze nasłonecznione, nawożone i traktowane środkami ochrony roślin [11]. Badania wykazały, że różnice w obu środowiskach głównie wpłynęły na zawartość witaminy C, natomiast zawartość związków polifenolowych

była zdeterminowana genetycznie [11].

Doskonałym przykładem zastosowania strategii metabolomicznej, która może być wykorzystana w każdego typu badaniach żywności są badania metabolomiczne pomidorów [7]. Autorzy pracy zastosowali nowatorskie podejście użycia kilku platform analitycznych: LC-MS, GC-MS i SPME-GC-MS (gdzie LC- chromatografia cieczowa, MS – spektrometria mas, GC- chromatografia gazowa, SPME – mikroekstrakcja do fazy stałej) [5]. Różne gatunki pomidorów pochodzące z różnych krajów zostały przebadane pod względem ich właściwości sensorycznych (wg normy ISO 8586) smaku, zapachu, posmaku, uczucia w ustach (jędrność miąższu), a także wyglądu i rozmiaru owocu [5]. Równolegle przeprowadzono analizę metabolomiczną pomidorów. Następnie wykazano istnienie kluczowych związków, które zostały skorelowane z cechami sensorycznymi tych warzyw. W ten sposób może zostać opracowane metabolomiczne narzędzie analityczne pozwalające na oszacowanie cech sensorycznych warzyw lub owoców.

Metabolomikę stosuje się również w stosunku do mięsa, która jest znacznie łatwiejsza i przystępniejsza niż badanie białek, a przy jej użyciu można rozróżnić np. mięso mrożone od świeżego [12,13] lub jego autentyczność [14], co może pozwolić na wyeliminowanie z rynku

nieuuczciwych sprzedawców tego surowca, a konsumenci mogą uzyskać informację o tym, czy kupowana przez nich żywność jest świeża i zdrowa.

Z przytoczonych przykładów wynika, że metabolomika jest interdyscyplinarną dziedziną nauki należąca do biologii systemowej, która może być wykorzystywana na dużą skalę począwszy od medycyny poprzez analitykę żywności, a skończywszy na analityce środowiskowej. W analityce produktów rolnych oraz produktów spożywczych może być praktycznie stosowana do uzyskiwania przeróżnych informacji, które mogą wpływać na końcowy produkt między innymi dotyczących: procesów technologicznych wytwarzania produktów, autentyczność, pochodzenie, wpływu na zdrowie, jakość zagrożenia biologicznego. Ze względu na ilość otrzymywanych informacji metabolomika może być rekomendowana jako wielce obiecujące narzędzie analizy produktów rolnych i spożywczych.

Literatura

- [1] Zhang A., Sun H., Wang P., Han Y., Wang X., *Modern analytical techniques in metabolomics analysis*, Analyst., 2012, 137, 293-300
- [2] Cevallos-Cevallos J.M., Reyes-De-Corcuera J. I., Etxeberria E., Danyluk M.D., Rodrick G.E., *Metabolomic analysis in food science: a review*, Trends in Food Science and Technology, 2009, 20, 557-566



[3] McGhie T.K., Rowan D.D., *Metabolomics for measuring phytochemicals, and assessing human and animal response to phytochemicals, in food science*, Mol. Nutr. Food Res., 2012, 56, 147-158

[4] Udayakumar M., Chandar D.P., Arun N., Mathangi J., Hemavathi K., Seenivasagam R., *PMDB: Plant Metabolome Database – A Metabolomic Approach*, Med. Chem. Res., 2012, 21, 47-52

[5] Thissen U., Coulier L., Overkamp K.M. i in., *A proper metabolomics strategy supports efficient food quality improvement: A case study on tomato sensory properties*, Food Quality and Preference, 2011, 22, 499-506

[6] Duerte, I.F.; Barros, A.; Belton, P.S.; Righelato, R.; Spraul, M.; Humpfer, E.; Gil, A.M. *High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Characterization of Beer*; J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 2475-2481

[7] Rodrigues J.A., Barros A.S., Carvalho B., Brandao T., Gil A.M.; *Probing beer aging chemistry by nuclear magnetic resonance and multivariate analysis*; Anal. Chim. Acta, 2011, 702, 178-187

[8] Khatib, A.; Wilson, E.G.; Kyong Kim, H.; Lefeber, A.W.M.; Erkelens, C.; Hae Choi, Y.; Verpoorte, R. *Application of two-dimensional J-resolved nuclear magnetic resonance spectroscopy to differentiation of beer*; Anal. Chim. Acta. 2006, 559, 264-270

[9] Almeida, C.; Duarte, I.F.; Barros, A.; Rodrigues, J.;

Spraul, M.; Gil, A.M. *Composition of Beer by ^1H NMR Spectroscopy: Effect of Brewing Site and Date of Production*; J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 700-706

[10] Gall G.L., Colquhoun I.J., Defernez M., *Metabolite Profiling Using ^1H NMR Spectroscopy for Quality Assessment of Green Tea, Camellia sinensis (L.)*, J. Agric. Food Chem., 2004, 52, 692-700

[11] Stewart D., McDougall G.J., Sungurtas J. i in., *Metabolomic approach to identifying bioactive compounds in berries: Advances toward fruit nutritional enhancement.*, Mol. Nutr. Food Res., 2007, 51, 645-651

[12] Leygonie C., Britz T.J., Hoffman L.C., *Meat quality comparison between fresh and frozen/thawed ostrich M. iliobficularis*, Meat Science, 2012, 91, 364-368

[13] Leygonie C., Britz T.J., Hoffman L.C., *Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review*, Meat Science, 2012, 91, 93

[14] Zaim N., Goto-Inoue N., Hayasaka T., Enomoto H., Setou M., *Authenticity assessment of beef origin by principal component analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric data*, Anal Bioanal Chem., 2011, 7, 1865-1871

* Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław



SPRAWDŹ NOWE CENY!

Testo – profesjonalne przyrządy do precyzyjnego pomiaru temperatury

- czujniki temperatury otoczenia, powierzchni i zanurzeniowo penetracyjne, w wykonaniu NTC, Pt100 i T/C
- termometry jedno- i wielokanałowe - możliwość jednoczesnego podłączenia nawet 6 sond temperatury
- najwyższa dokładność pomiaru, nawet do $\pm 0,05^\circ\text{C}$, przy rozdzielczości 0,001 $^\circ\text{C}$
- szeroki zakres pomiarowy -200...+1350 $^\circ\text{C}$
- pomiary bezprzewodowe, dzięki sondom radiowym

Testo Sp.z o.o., ul. Wiejska 2, 05-802 Pruszków,
tel.: +48 22 863 74 01/22, +48 22 292 76 80 do 83,
+48 22 863 24 41, fax: +48 22 863 74 15,
e-mail: testo@testo.com.pl, www.testo.com.pl