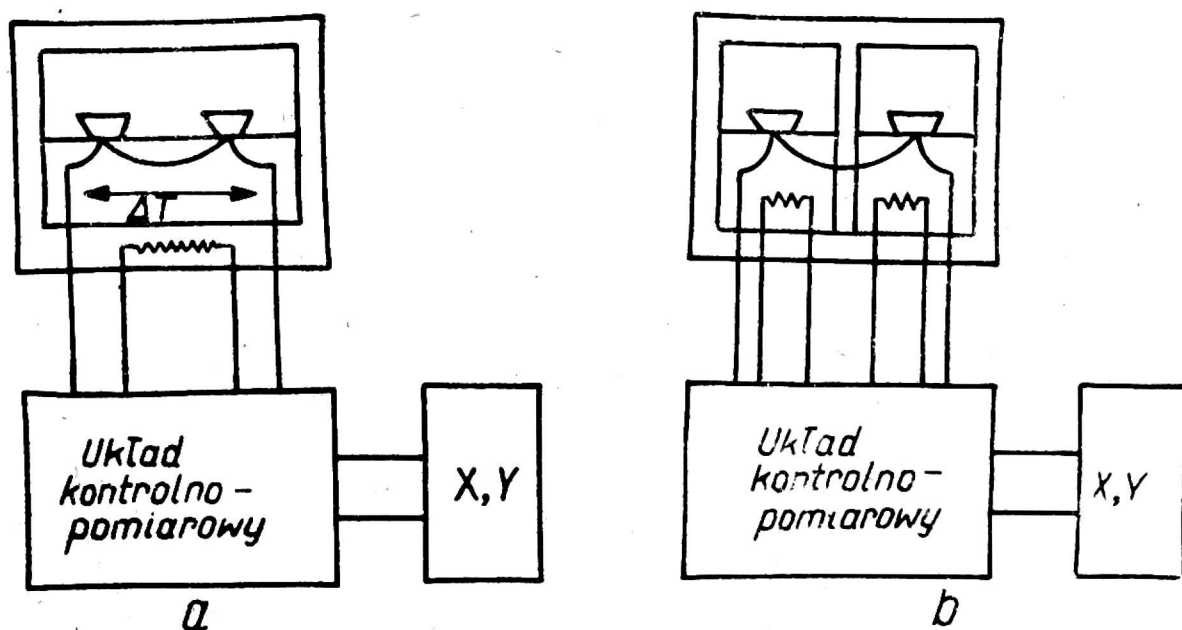


BOŻENNA RÓŻYCKA-ROSZAK, ANDRZEJ HENDRICH, BOGDAN MAZGIS
Akademia Rolnicza we Wrocławiu

ZASTOSOWANIE KALORYMETRII W NAUCE O ŻYWNOŚCI I ROLNICTWIE *

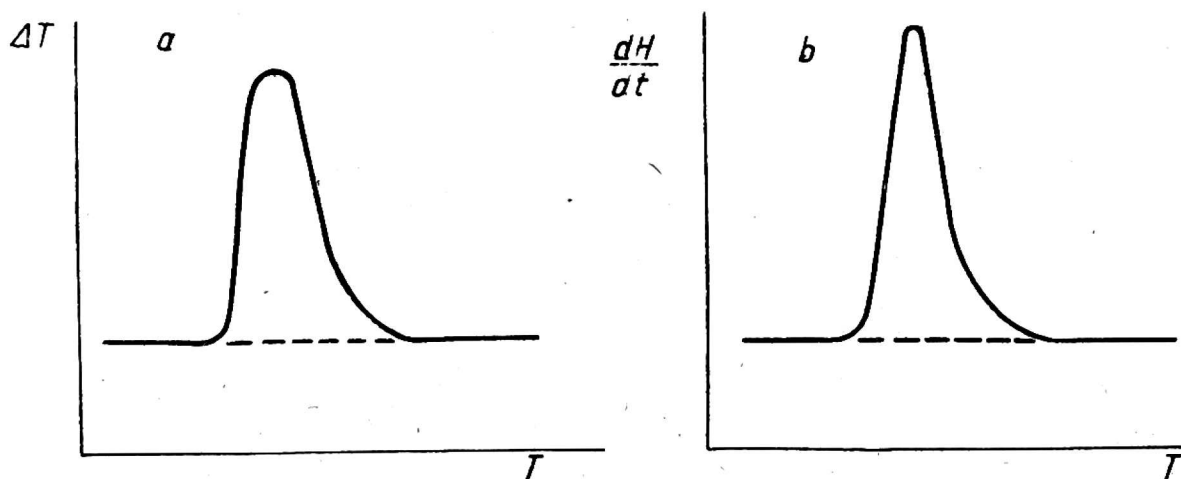
Wielu procesom mającym znaczenie w rolnictwie i w przemyśle spożywczych a przebiegającym w organizmach żywych i w produktach żywnościowych pochodzących z tych organizmów, towarzyszą efekty cieplne. Dlatego kalorymetria zajmująca się pomiarami ciepła znajduje coraz szersze zastosowanie w badaniu tych procesów. Istnieje wiele różnych typów kalorymetrów za pomocą których można otrzymać dane dotyczące ogólnych właściwości badanych substancji jak np. ich przewodnictwa cieplnego, bardziej szczegółowych danych określających parametry fizykochemiczne układów a także możliwe jest śledzenie skomplikowanych procesów biochemiczno-biofizycznych zachodzących w badanych próbkach. Różnicowa analiza termiczna (DTA) już od dawna znalazła szerokie zastosowanie w badaniu tych procesów. W ostatnich latach coraz szersze zastosowanie znajdują także inne metody kalorymetryczne a w szczególności metoda różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC). Mimo pewnego podobieństwa metody DSC i DTA różnią się istotnie, co znalazło odbicie w budowie odpowiednich przyrządów.



Rys. 1. Ogólne schematy przyrządów: a — do DTA; b — do DSC.

* Praca sfinansowana przez PAN w ramach problemu 30.10.

Ogólny schemat budowy przyrządów do DTA i DSC wykazuje wiele podobieństw (rys. 1a, b). Zarówno DTA jak i DSC posiadają po dwa pojemniki i układy kontrolno-pomiarowe. W pojemnikach umieszczone są substancja badana oraz materiał termicznie bierny w badanym zakresie temperatur stanowiący odniesienie dla próbki. Zasadnicza różnica pomiędzy omawianymi aparatami polega na sposobie ogrzewania pojemników. W przypadku DTA stosowany jest jeden podgrzewacz powodujący wzrost temperatury zarówno próbki jak i substancji odniesienia. Gdy w substancji badanej zaczyna zachodzić proces endo- lub egzotermiczny temperatura pojemnika zaczyna różnić się od temperatury pojemnika z substancją odniesienia a różnica temperatur rejestrowana jest przez układ kontrolno-pomiarowy. Typowy przykład krzywej uzyskiwanej za pomocą tej metody przedstawiony jest na rys. 2a. Z krzywej tej można odczytać temperaturę w której zachodzi badany proces jak i obliczyć związaną z nim zmianę entalpii. Obliczanie entalpii z pola zawartego pod krzywą jest jednak dość skomplikowane i obarczone dużym błędem. W przypadku DSC każdy z pojemników podgrzewany jest przez oddzielny podgrzewacz. Układ kontrolno-pomiarowy steruje mocą dostarczaną do podgrzewaczy tak by przyrosty temperatur obu pojemników były jednakowe. W chwili gdy w badanej próbce zaczyna zachodzić proces egzo- lub endotermiczny moc dostarczana do jej podgrzewacza staje się różna od tej dostarczonej do podgrzewacza pojemnika z substancją odniesienia. Różnica w dostarczanych mocach rejestrowana jest przez układ kontrolno-pomiarowy. Typowy przykład krzywej otrzymywanej za pomocą tej metody przedstawiony jest na



Rys. 2. Typowe krzywe uzyskiwane w pomiarach:

- a — metodą DTA — przebieg zmian różnicy temperatur pomiędzy próbką a substancją będącą odniesieniem w funkcji temperatury
- b — metodą DSC — przebieg zmian mocy absorbowanej lub wydzielonej przez próbkę w funkcji temperatury

rys. 2b. W tym wypadku pole pod krzywą jest wprost proporcjonalne do zmiany entalpii układu podczas badanego procesu, co ułatwia jej obliczenie. Z krzywej tej można również odczytać temperaturę w której zachodzi badany proces.

Ponieważ metoda DTA jest na ogół dobrze znana celem niniejszego przeglądu jest przybliżenie polskiemu czytelnikowi trudno dostępnej literatury zagranicznej dotyczącej zastosowań DSC i innych metod kalorymetrycznych w nauce o żywności i rolnictwie. Wydaje się to celowe ze względu na dostępność w Polsce kalorymetrów różnych typów produkcji krajowej i innych krajów RWPG jak również przyrządów własnej konstrukcji.

Badania podstawowych składników żywności

Do podstawowych składników żywności należą białka, węglowodany, tłuszcze i woda. Poznanie właściwości tych składników oddzielnie i w zespole z innymi pozwala na lepsze zrozumienie zachowania się badanego produktu żywnościowego poddawanego procesom technologicznym i na optymalizację tych ostatnich.

Białka

Metoda DSC jest często stosowaną, użyteczną metodą badania procesu termicznej denaturacji białek. Z licznych prac dotyczących denaturacji białek globularnych: owalbuminy [97], albuminy z surowicy krwi [98], rybonukleazy [17], mioglobiny [99], cytochromu [68], lizozymu [92, 93, 94] można wyciągnąć następujące wnioski [100]:

1. Ciepło właściwe białek w postaci natywnej dla białek różnego typu jest podobne.

2. Ciepło właściwe wszystkich białek rośnie powoli wraz ze wzrostem temperatury.

3. Ciepło właściwe białek zdenaturowanych jest wyższe od ciepła właściwego białek nasywnych.

4. Termostabilność białek zależy od pH roztworu w którym są badane, wraz ze wzrostem termostabilności rośnie także entalpia denaturacji.

5. Z porównania ΔH_{cal} i ΔH_{vH} (ΔH_{vH} — zmiana entalpii van't Hoffa) można wnioskować, że denaturacja termiczna białek globularnych jest procesem kooperatywnym, obejmującym całą globulę białka.

Posługując się parametrami otrzymanymi z analizy krzywych DSC można obliczyć zależność funkcji termodynamicznych: entalpii, entropii, energii swobodnej białek od temperatury i pH [92, 93, 94].

Przy użyciu metody DSC badane były także białka ważne z powodu ich obecności w produktach spożywczych: miozyna [27, 120, 127, 128], aktyna [27, 122], owomukoid — polipeptyd z białka jaja kurzego [54]. W pracach [54, 128] wykazano, że maksima denaturacji termicznej fragmentów białek po złożeniu dają obraz denaturacji całego białka, co potwierdziło przypuszczenia o domenowej strukturze tych białek.

Cały szereg prac, w których stosowano metodę DSC dotyczy badań związanych z przetwarzaniem bądź przechowywaniem produktów spożywczych. Badano wpływ fosforanów stosowanych do konserwacji mięsa na proces denaturacji termicznej miozyny [128], wpływ autolizy rozdrobnionego mięsa kałamarnicy na jego właściwości smakowo-użytkowe [111].

Przyswajalność białek zależy zarówno od ich fizykochemicznych właściwości w stanie natywnym jak i od zmian jakie w nich zachodzą podczas obróbki surowca lub izolowania poszczególnych jego składników. Armstrong [3] opracował metodę wykorzystania DSC do określania ilości natywnego białka w preparatach białkowych z soi. Podczas przygotowywania koncentratów białkowych lipidy z surowca są często wypłukiwane przy użyciu rozpuszczalników organicznych. Haegerdal [55] badał wpływ acetonu na rozpuszczalność mioglobiny w wodzie. Wykazał, że istnieje związek pomiędzy rozpuszczalnością a zmianami w obrazie termicznej denaturacji mioglobiny. Białko to umieszczone w różnych stężeniach acetonu było dobrze rozpuszczalne w wodzie wówczas gdy rozpuszczalnik nie likwidował maksimum termicznej denaturacji mioglobiny. Podobne badania dotyczące wpływu alkoholi na denaturację lizozymu przedstawiono w pracy Fujita [50]. Stwierdzono, że alkohole jednowodorotlenowe obniżają a wielowodorotlenowe zwiększają termostabilność białka. Związane jest to zapewne z odpowiednio hydrofilowym i hydrofobowym charakterem tych alkoholi. Badania wpływu anionowych polisacharydów na proces denaturacji mioglobiny i albuminy z surowicy krwi [61] pokazały, że w zależności od siły jonowej i pH roztworu polisacharydy zmieniały entalpię denaturacji. Badania DSC pozwoliły w tym przypadku na dobranie optymalnych wartości siły jonowej i pH dla procesu wytrącania białek przy użyciu polisacharydów.

Donovan [37] pokazał, że termostabilność białek z jaja kurzego układa się w następującą sekwencję: owalbumina > lizozym > konowalbumina. W pracach [37, 39] badano także wpływ sacharozy na proces denaturacji białek towarzyszący wypiekowi ciastek (angel cake). Wykazano, że obecność sacharozy zwiększa termostabilność białek, powodując dodatkowo, że maksimum denaturacji poszczególnych składników ciasta zlewają się w jedno maksimum w 95°C. Prace dotyczące wypieku ciast będą omówione także w części dotyczącej węglowodanów.

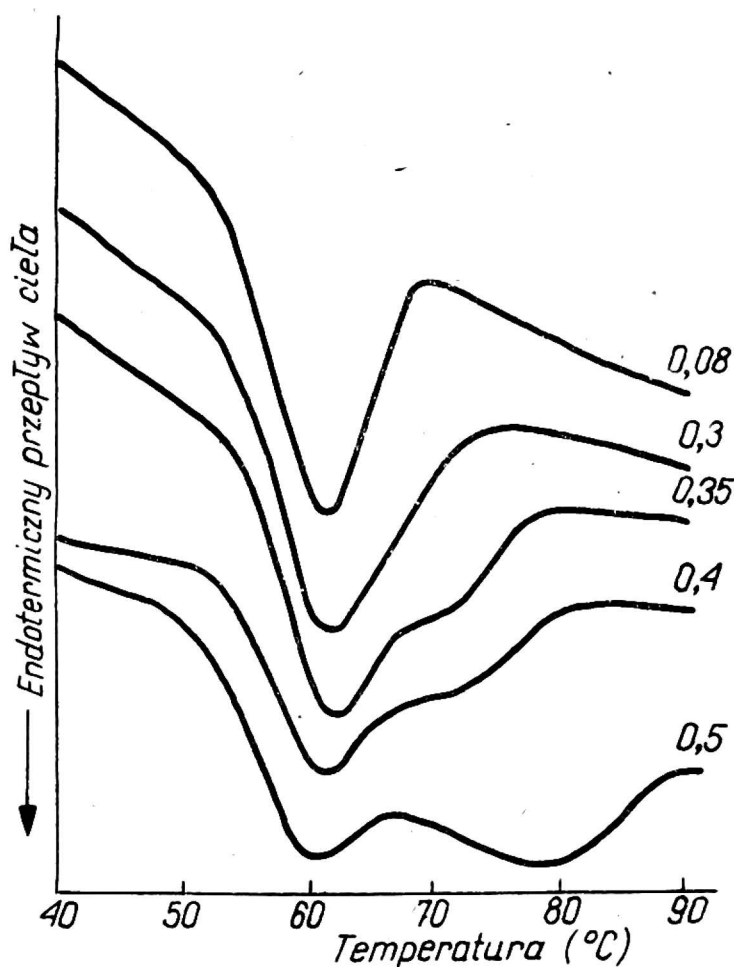
Owalbumina w jajach przechowywanych przez dłuższy czas przemie-

nia się nieodwracalnie w S-owalbuminę — formę białka bardziej stabilną termicznie. Określenie obecności S-owalbuminy za pomocą DSC [38] może być testem świeżości jaj.

Oprócz badania denaturacji termicznej białek metody mikrokalorymetryczne mogą być wykorzystywane do badania ciepła właściwego produktów lub półproduktów spożywczych w szerokim przedziale temperatur. Przykładem takich badań jest praca [13], w której wyznaczono ciepło właściwe serwatki w przedziale temperatur $-40 \pm +20^{\circ}\text{C}$. Określenie ciepła właściwego w tym przypadku potraktowane było jako przygotowanie do opracowania technologii zagęszczania serwatki wykorzystującej metodę wymrażania-wysuszania (freeze-drying). Metodami kalorymetrycznymi innymi niż DSC badane było także ciepło właściwe produktów mięsnych [82, 91] oraz żeli żelatynowych [85].

Węglowodany

Skrobia, ze względu na jej szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, jest najczęściej badany przy użyciu metody DSC węglowodanem. Podczas ogrzewania koloidalnego roztworu skrobi w wodzie zachodzi proces żelatynowania. Jak pokazały badania przeprowadzone w stosunku do skrobi pochodzącej z ziemniaków [21, 40, 124], pszenicy [21, 41, 32, 124], grochu [52], soczewicy [21], bobu [21], fasoli [52], ryżu [89] termogramy obrazujące proces żelatynowania 45–50% wagowych wodnych roztworów skrobi zawierają dwa maksima. W pracach [21, 89] stwierdzono, że w zależności od zawartości wody w badanych próbkach obraz termiczny żelatynowania jest różny. Typową zależność zmiany ciepła właściwego układu skrobia—woda w zależności od ilości wody przedstawia rys. 3. Gdy ilość wody w mieszaninie jest duża obserwuje się pojedyncze maksimum, dla większości skrobi występujące w przedziale temperatur 60–70°C [21, 40, 89]. Zmniejszanie ilości wody powoduje stopniowe zmniejszanie się tego maksimum i pojawienie się drugiego, bardziej rozmytego i położonego w wyższych temperaturach. To maksimum w miarę zmniejszania ilości wody przesuwa się w stronę wyższych temperatur, podczas gdy położenie pierwszego pozostaje stałe aż do jego zaniku. Taki obraz żelatynowania można powiązać z semikrystalicznym charakterem części granuli skrobi [21, 40]. Maksimum obserwowane przy dużych ilościach wody związane jest z hydratacją i utratą struktury krystalicznej przez część łańcuchów skrobi. Procesowi temu towarzyszy puchnięcie granuli skrobi — wypychanie fragmentów łańcuchów poza granulę oraz rozwijanie się heliksów. Maksimum pojawiające się przy małych ilościach wody jest związane z „prawdziwym” topnieniem łańcuchów skrobi, procesowi temu nie towa-



Rys. 3. Przebieg zależności ciepła właściwego układu skrobia-woda w zależności od ilości wody (według [89]). Liczby przy poszczególnych krzywych oznaczają ułamek wagowy wody w próbce.

rzyszy puchnięcie granuli. Przesuwanie się temperatury drugiego maksimum jest zgodne z teorią Flory'ego-Hugginsa, która wyjaśnia zmiany temperatury topnienia semikrystalicznych polimerów w zależności od ilości rozpuszczalnika [42].

Jeśli skrobia nie jest odtłuszczona, termogramy wykazują istnienie trzeciego maksimum występującego w temperaturach jeszcze wyższych niż to drugie [41, 70]. Fakt pojawienia się tego maksimum wiązany jest z możliwością tworzenia się kompleksów amyloza—lipid. Dla skrobi odtłuszczonych nie obserwuje się trzeciego maksimum. Kugimiya i Donovan [71] opracowali metodę mikrokalorymetrycznego określania ilości amylozy w skrobi na podstawie badania procesu tworzenia się kompleksów amylozy i lipidów. Dodanie do ciasta chlebowego sonifikowanej dyspersji polarnych lipidów (wielowarstwowych pęcherzyków) powoduje wzrost objętości wypieku [108]. Wykorzystanie tego faktu pozwala na dodawanie do mąki pszennej mąki ryżowej, która dodana bez dyspersji lipidów powodowała słabsze wyrastanie chleba. Termogramy ciasta otrzymanego z mąki pszennej, ryżowej i lipidów wykazały, że proces żelatynowania zachodził w temperaturze podobnej do temperatury żelatynowania ciasta z samej

mąki pszennej. W skrobi znajdującej się w stanie żelu w miarę upływu czasu następuje zjawisko rekrytalizacji łańcuchów (retrogradacja) [89, 33]. Badania retrogradacji w skrobi ryżowej [89] pokazały, że przebieg tego procesu zależy od temperatury przechowywania zżelowanej skrobi. W niższych temperaturach rekrytalizacja przebiega szybciej. Termogramy ponownego żelatynowania (po odpowiednio długim okresie przechowywania próbki) wykazują, że w zależności od temperatury przechowywania powstają zapewne różne struktury semikrystaliczne łańcuchów. Colwell [33] ustalił ścisłą zależność pomiędzy zachodzeniem procesu retrogradacji a czerstwieniem chleba.

Techniką DSC badano rolę sacharozy w procesie wypieku ciast [1, 39, 125]. Stwierdzono, że sacharoza powoduje podniesienie temperatury żelatynowania. Wpływ ten może być spowodowany zmniejszeniem aktywności wody. Świadczyć o tym mogą wyniki uzyskane w pracy [1] pokazujące, że na podniesienie temperatury żelatynowania skrobi zbożowej wpływa nie tylko sama obecność sacharozy ale także stosunek ilościowy sacharozy do wody. Jak pokazano w pracy [119] istotna jest także długość łańcuchów cukru oddziaływującego na skrobię. Cukry o długich łańcuchach silniej wpływały na temperaturę żelatynowania niż cukry o łańcuchach krótkich. Podnoszenie temperatury przejścia w stan żelu w obecności cukrów tłumaczono w tej pracy zmianą aktywności wody oraz stabilizującym wpływem cukrów na amorficzne rejony granuli skrobi.

Tłuszcze

Tłuszcze stanowią dużą grupę związków organicznych, której jedną z cech charakterystycznych jest polimorfizm, czyli występowanie kilku różnych form krystalicznych tej samej substancji. Dla trójglicerydów stwierdzono istnienie czterech form upakowania cząsteczek tłuszczu w podstawową komórkę krystaliczną [67], polimorfizm tłuszczu naturalnych może obejmować większą ilość form upakowania.

Przejście pomiędzy dwoma formami upakowania odbywa się między innymi na skutek zmiany temperatury układu, co pokazano w pracach [28, 72, 110]. Termotropowe zachowanie się dyspersji wodnych lipidów oraz wpływ różnych czynników (np. obecności cholesterolu, jonów, dodatku innych lipidów) badane było w szeregu prac [29, 53, 59, 95, 116, 118].

Technika DSC znalazła szerokie zastosowanie w badaniach dotyczących konsystencji i własności reologicznych tłuszczu spożywczych. W przypadku tłuszczu stałych badania dotyczą głównie dobrania takich składników tłuszczu aby uzyskać pożądany zestaw właściwości tłuszczu [18, 31, 57]. Czynniki które mogą wpływać na właściwości produktu są między

innymi: stosunek ilości kwasów tłuszczowych do trójglicerydów [31], uwodornienie (utwardzenie) tłuszczu [22, 79], obecność nienasyconych łańcuchów węglowodorowych [14, 15]. Banks i wsp. badali przy użyciu mikrokalorymetru DSC wpływ stosowania dodatków z oleju sojowego do paszy krów na właściwości reologiczne masła [15] oraz właściwości tłuszczu z mleka krowiego w zależności od ich składu chemicznego [14]. Za pomocą metody DSC badano także zmiany zachodzące w oliwie z oliwek pod wpływem procesu reestryfikacji [51].

Woda

Woda jest jednym z głównych składników produktów spożywczych, jej zawartość może dochodzić do 75—95% masy produktu (świeże ryby, jarzyny, mięso). Podczas zamrażania produktów spożywczych część w nich zawartej wody zamarza a część nie. Ta niezamarznięta woda nosi nazwę wody związanej i w zamrożonych produktach znajduje się w stanie szklistym [90, 117]. Zawartość wody związanej w produktach spożywczych określa się często za pomocą DSC. W tym celu mierzy się ilość ciepła potrzebną do stopienia wody zawartej w próbkach zamrożonych do temperatury przynajmniej -50°C . Przy małej zawartości wody, która odpowiada obecności tylko wody związanej na krzywej DSC nie występuje maksimum spowodowane topnieniem wody. Badając próbki o zmieniającej się zawartości wody można określić tę ilość wody, która nie zamarza tzn. wodę związaną [117]. W większości produktów spożywczych zawartość wody związanej wynosi 0,2—0,5 g wody na 1 g produktu [36, 90, 126].

W przypadku białek poza wodą związaną, która stanowi pierwszą warstwę hydratacyjną mogą jeszcze występować dalsze warstwy hydratacyjne. Woda zawarta w drugiej warstwie hydratacyjnej przy oziębieniu ulega zamrożeniu, topi się jednak w innej temperaturze (a raczej w szerokim przedziale temperatur) i z innym efektem cieplnym niż ma to miejsce w przypadku zwykłej wody. Pierwsza warstwa hydratacyjna zawiera 0,3 g wody na 1 g białka, co odpowiada około 250 moli wody na 1 mol białka a druga warstwa hydratacyjna od 0,3 do około 0,8 g wody na 1 g białka, czyli od 250 do około 700 moli wody na 1 mol białka [56, 112, 113].

Hydratacja wywiera wpływ na proces termicznej denaturacji białek. Badania termicznej denaturacji białek występujących w mleku mają duże znaczenie dla poznania struktury i stabilności tych białek, jak również zmian zachodzących w mleku i jego produktach podczas obróbki termicznej. Proces denaturacji α i β albuminy otrzymanej z mleka badano metodą DSC przy zmieniającej się zawartości wody [56, 112]. Stwierdzono, że temperatura i entalpia procesu denaturacji silnie zależą od zawartości wody

w białku ale tylko wtedy gdy zawartość wody nie przekracza 700 moli wody na 1 mol białka. Oznacza to, że na proces termicznej denaturacji białka wywiera wpływ tylko woda z pierwszej i drugiej warstwy hydratacyjnej. Wniosek ten potwierdzają również badania wpływu zmieniającej się ilości wody i wody ciężkiej na proces termicznej denaturacji lizozymu otrzymanego z białka jaja kurzego [48, 49].

Wiele prac kalorymetrycznych dotyczy badania procesu desorpcji wody z produktów spożywczych oraz ich składników a w szczególności białek [2, 19, 20, 53, 76, 99]. Stwierdzono, że entalpia desorpcji zależy od zawartości wody w białkach i maleje wraz z jej wzrostem. Wykazano, że istnieją warstwy hydratacyjne o tej samej wartości entalpii desorpcji [53]. Przy zawartości wody powyżej 0,7 g wody na 1 g białka entalpia desorpcji odpowiada ciepłu parowania wody.

Szczególnie duże znaczenie posiadają prace dotyczące desorpcji wody z mleka w proszku. Przechowywanie mleka w proszku w warunkach względnie dużej wilgotności powoduje przejście bezpostaciowej laktozy w krystaliczny monohydrat. Fakt ten można stwierdzić kalorymetrycznie wskutek obecności na krzywej kalorymetrycznej maksimum w temperaturze 135°C, które spowodowane jest dehydratacją laktozy [20].

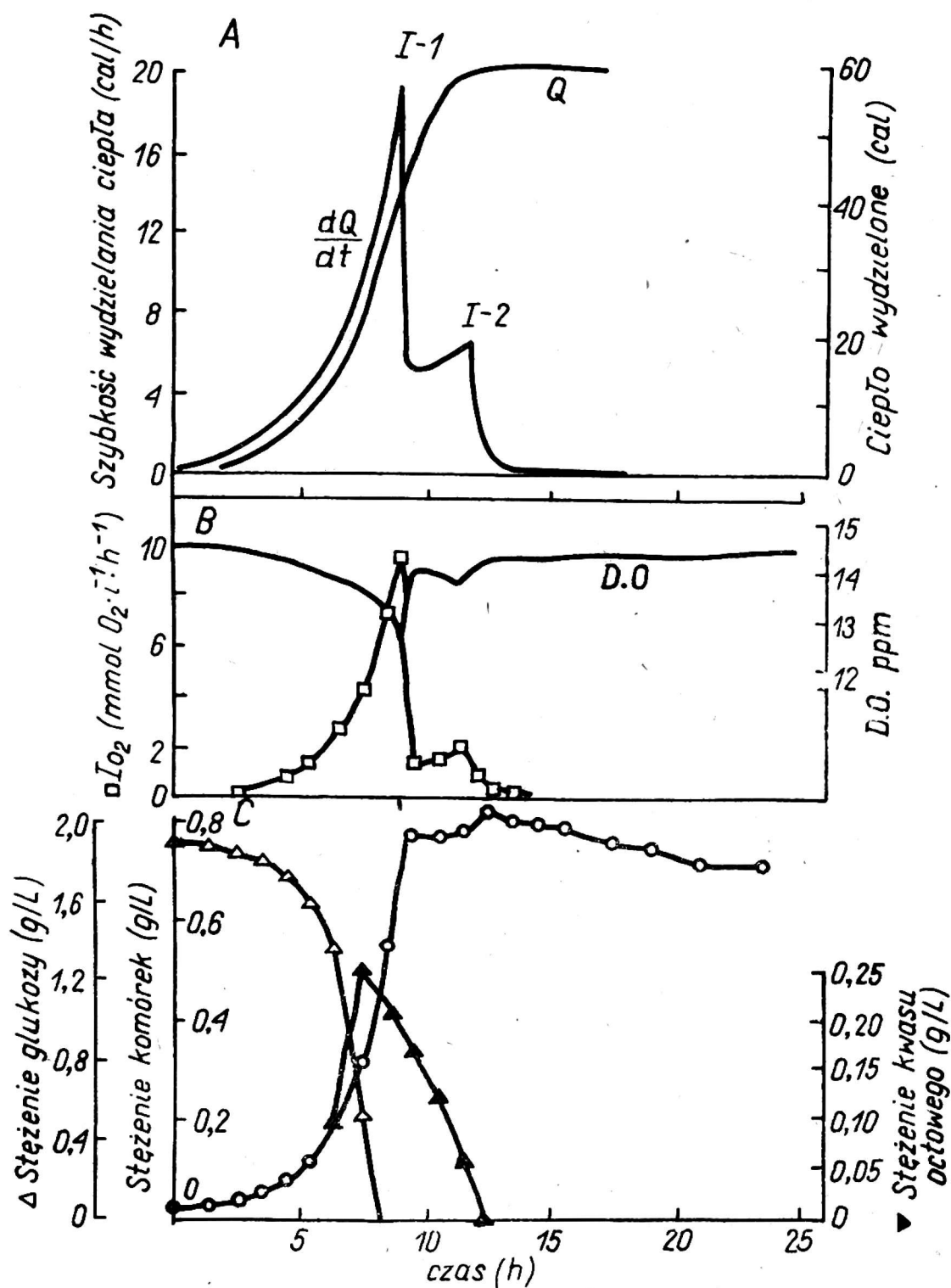
Badania drobnoustrojów

W badaniach drobnoustrojów od dawna stosowana jest kalorymetria [45]. Kalorymetrycznie można nie tylko śledzić metabolizm i procesy wzrostu ale także identyfikować bakterie [23, 86].

Kalorymetry stosowane w badaniach drobnoustrojów można najogólniej podzielić na kalorymetry przepływowe i nieprzepływowe. W kalorymetrach nieprzepływowych, np. typu Calveta [73, 114] czy też często stosowanych kalorymetrach własnej konstrukcji [43, 46, 63] badana kultura drożdży znajduje się bezpośrednio w naczyniu kalorymetrycznym. Wobec tego pomiary parametrów procesu (zmętnienia, stężenia glukozy i alkoholu) dokonuje się w oddzielnej hodowli drożdży, która znajduje się w takich samych warunkach jak ta umieszczona w kalorymetrze. Natomiast kalorymetr przepływowy, często typu LKB [16, 24, 25, 26, 121], połączony jest z fermentatorem. Dzięki temu pomiary kalorymetryczne i pomiary stężenia glukozy, alkoholu oraz zmętnienia wykonuje się w tej samej kulturze drożdży. Jest to niewątpliwie dużą zaletą tej metody jednak, jak zwrócił na to uwagę Shoda [62], istnieje niebezpieczeństwo związane z możliwościami zmian w metabolizmie oraz wyczerpaniem się składników odżywczych podczas przepływu drożdży z fermentatora do kalorymetru.

Badania metabolizmu

Fujita i wsp. [46, 47] badali bezkomórkowy wyciąg drożdży, z dodatkiem i bez dodatku glukozy, w warunkach aerobowych i anaerobowych. Stwierdzili, że zawiesina drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) w roztworze



Rys. 4. A — termograma wzrostu *E. coli*, B i C — zmiany parametrów procesu wzrostu.

dQ/dt — szybkość wydzielania ciepła, Q — całkowity efekt cieplny, DO — stężenie rozpuszczonego tlenu, O — biomasa, Δ — stężenie glukozy, \blacktriangledown — stężenie octanów, \square — szybkość pobierania tlenu (według [115]).

buforowym bez dodatku glukozy wydziela ciepło. Wskazuje to na istnienie endogennego metabolizmu w drożdżach. Ilość wydzielonego ciepła w warunkach aerobowych jest proporcjonalna do suchej masy drożdży w zawieszynie. W obecności glukozy w zawieszynie drożdży zachodzi proces glikolizy, który znajduje swe odbicie w termogramie.

Forrest i wsp. [44] wykazali również, że istnieje endogenny metabolizm u innego drobnoustroju — *Streptococcus faecalis*.

Badania procesu wzrostu

Liczne badania [24, 25, 26, 34, 58, 62, 63, 64, 73, 88, 114, 115] procesu wzrostu drożdży i bakterii wykazały, że krzywe kalorymetryczne dobrze korelują ze zmianami biomasy jak i parametrami tego procesu. Na rys. 4 przedstawiono typowy termogram dla wzrostu *Escherichia coli* i porównano go ze zmianami parametrów procesu wzrostu. Krzywa szybkości wydzielanie ciepła posiada dwa maksima. Pierwsze jest związane z glikolizą a drugie z przemianą octanów. Krzywa szybkości wydzielania ciepła jest zgodna z krzywą pobierania tlenu a krzywa całkowitego efektu cieplnego jest bardzo podobna do krzywej zmian biomasy. Wskazuje to, że pomiary kalorymetryczne mogą zastąpić pomiary stopnia zużycia tlenu i służyć do kontroli procesu fermentacji. Również proces wzrostu ciągłej hodowli drożdży można kontrolować w podobny sposób, w oparciu o analizę krzywych kalorymetrycznych [115]. Kalorymetrycznie można również badać kinetykę i wyznaczyć energię aktywacji i entalpię procesu wzrostu drożdży [65].

Mikrobiologia rolnicza

Bakterie spełniają bardzo ważną rolę w mineralizacji związków organicznych w glebie oraz w krążeniu pierwiastków biogennych. Metody kalorymetryczne okazały się przydatne w badaniach aktywności bakterii w glebie [87]. Badania takie prowadzono w zmodyfikowanym kalorymtrze typu LKB. Badane próbki gleby sterylizowano w autoklawie. Stwierdzono, że kolejne sterylizacje obniżały wartość obserwowanego efektu cieplnego, podobnie jak wielokrotne napromieniowywanie próbek promieniowaniem γ . Wykazano, że efekt cieplny jest głównie spowodowany aktywnością mikrobiologiczną a tylko w nieznacznym stopniu przez biologiczne reakcje w glebie. Metoda pomiaru efektu cieplnego umożliwia różnicowanie gleby ze względu na różne poziomy aktywności mikrobiologicznej.

Badania odporności roślin na mróz

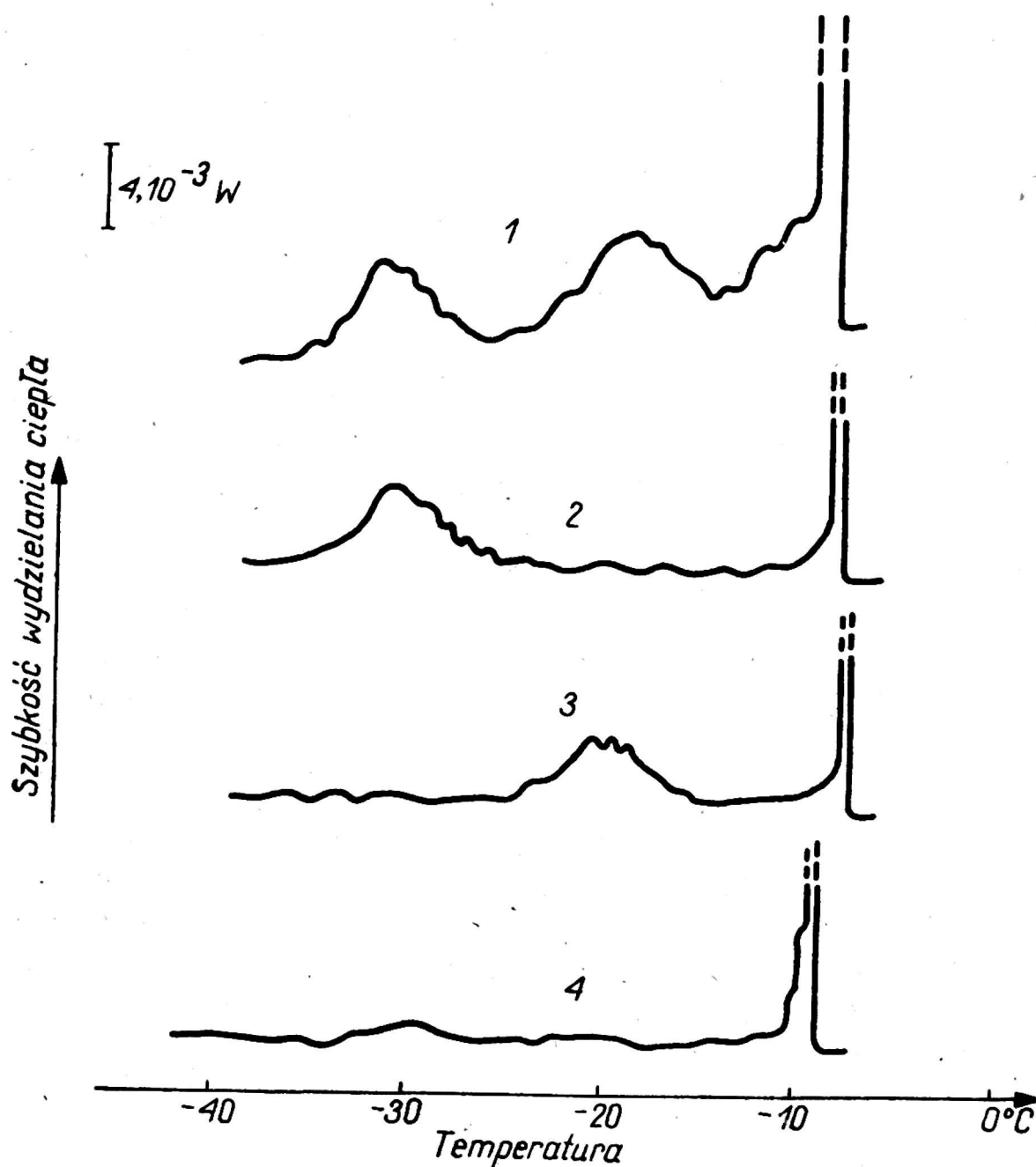
Ważną dziedziną w której DSC może znaleźć zastosowanie jest kriobiologia. Centralnym jej problemem jest określenie zespołu czynników warunkujących przeżywalność żywych komórek i tkanek poddanych działaniu niskich temperatur. W odniesieniu do rolnictwa rozpatrywane jest zagadnienie odporności roślin na mróz. Czynniki warunkującymi odporność roślin są [74]: tolerancja na zamarzanie wody zewnątrzkomórkowej i uniknięcie zamarzania wody wewnątrzkomórkowej.

Mechanizm zamarzania wody w tkance roślinnej badano przy użyciu metod optycznych, dylatometrycznych i kalorymetrycznie [74]. Badania te, choć nie przyniosły zadowalających ustaleń zależności odporności komórek na mróz od różnych czynników [104], pokazały jednak, że woda wewnątrz komórek może utrzymywać się w stanie silnego przechłodzenia. Podkreśliły one również rolę właściwości osmotycznych badanych komórek i zwróciły uwagę na wpływ rozmiarów komórek, szybkość schładzania oraz sposób i szybkość następującego rozmrażania [35, 80, 83, 84, 104]. Wykazano między innymi, że dla przeżycia komórki konieczne jest niezbędne minimum nie zamarzającej wody (35% dla krwinek ludzkich) [81 cyt. za 30].

Krystalizacja wody wewnątrzkomórkowej (niezwiązanej) może nastąpić wewnątrz komórki albo na zewnątrz, dokąd przechłodzona woda wychodzi wskutek odwrócenia ciśnień osmotycznych po krystalizacji wody zewnątrzkomórkowej [74, 80, 104].

Proces zamarzania wody w tkankach pędów winorośli badano kalorymetrycznie, przy użyciu DSC [5—12]. Badano międzywęzłowe odcinki jednorocznych pędów winorośli (gruzińskiej odmiany „rkaciteli”) jak i poszczególne tkanki pędu: rdzeń, ksylem, floem z kambium. Uzyskane krzywe kalorymetryczne przedstawiono na rys. 5. W pierwszym etapie w prawie jednakowych temperaturach dla wszystkich tkanek krystalizuje niezwiązana woda w przedziałach międzykomórkowych. Drugi etap krystalizacji zachodzący w przedziałach temperatur charakterystycznych dla poszczególnych tkanek dotyczy niezwiązanej wody wewnątrzkomórkowej. Termogramy DSC [9] rozmrażania próbek pędów winorośli uprzednio oziębionych (jedna do temperatury -12°C a druga do temperatury -45°C) wykazały wyższą temperaturę przejścia fazowego lód—woda dla próbki silniej oziębionej, w której zamrożona była praktycznie cała woda niezwiązana. Wskazuje to, że woda wewnątrzkomórkowa ulega krystalizacji po opuszczeniu wnętrza komórki. Wychodzenie wody z komórki pod wpływem odwróconej różnicy ciśnień osmotycznych może być znacznie osłabione dużą sztywnością ściany komórkowej i silnym „przyklejeniem” plazmolemmy do tej ściany. Jednak niewielkie ilości wody wydostające się z ko-

mórek badanej tkanki w tej części i procesu (na rys. 5 poziomy odcinek termogramu pomiędzy maksimami dla krzywych 2 i 3) zamarzają natychmiast wydzielając ciepło rejestrowane w postaci poziomej linii przez mikrokalorymetr. Na podstawie dokładnie zarejestrowanego i opisanego termogramu i dzięki stałości szybkości wydzielania ciepła w rozpatrywanym przedziale temperatur można wyznaczyć ilość ciepła związaną z wypływem wody z komórek [12]. Na tej podstawie można określić zmiany objętości komórek w tkance przy ich sprężystym reagowaniu. To i wyliczone



Rys. 5. Zapisy mikrokalorymetryczne (DSC) procesu krystalizacji wody: dla całkowitej próbki pędu winorośli (1), dla rdzenia (2), dla ksylemu (3), i dla całkowitej próbki pędu poddanej powtórnemu chłodzeniu (4). Szybkość chłodzenia: 5Kh^{-1} wg [6].

na podstawie [10] wartości ciśnienia w funkcji temperatury pozwalają wyznaczyć średni moduł sprężystości komórki, oszacować założone stałe sprężystości oddziaływania plazmolemy ze ścianą komórkową i wyznaczyć, zależne od rozmiarów komórek, ich liniowe odkształcenia.

Komórki określonej tkanki i rozmiarów (rozmiary mogą mieć tu decydujące znaczenie) wytrzymują pewne maksymalne ujemne ciśnienia turgorowe. Po ich przekroczeniu, tj. dalszym przechłodzeniu próbki, następuje plazmoliza polegająca na tym, że część plazmolemy „odkleja” się od ściany uzyskując swobodę deformacji. Powoduje to gwałtowne odwodnienie, śmierć komórki i trwałe uszkodzenie układu plazmolemy — ściana [12]. Mechanizm ten potwierdzałby fundamentalną rolę ścian komórkowych w roślinach w aspekcie ich odporności na mrozy.

Zaobserwowane zjawisko hartowania pędów winorośli małymi przymrozkami (do -5°C) pozwala im znosić mrozy o $5\div 10$ stopni silniejsze, co wynika z przesunięć maksimów spowodowanych krystalizacją wody komórkowej w poszczególnych tkankach [8]. Hartowanie zapewne wpływa na powstanie silniejszych powiązań pomiędzy plazmolemą a ścianą komórkową.

Badano również kalorymetrycznie proces zamarzania wody w tkankach jednorocznych pędów winorośli innych odmian [96] a uzyskane termogramy podobne były do pokazanych na rysunku 5.

Metodą częściej stosowaną niż DSC w badaniach odporności roślin na mróz jest DTA (różnicowa analiza termiczna), której możliwości przystosowania do badania wyżej wspomnianych problemów pokazano w pracach [69, 105, 106, 123]. Metodę tę stosowano między innymi do badania procesów zachodzących podczas działania niskich temperatur na uspięte pączki kwiatowe (najczęściej drzew owocowych) [4, 102, 106, 107, 109], liście ozimego żyta [75], jednoroczne pędy winorośli (łodygi i pączki) [96]. DTA jest zalecana [96, 102, 106] jako użyteczna i prosta metoda diagnostyczna sprawdzania wytrzymałości roślin na niskie temperatury. Pokazano na przykład, że niewielki niedobór wody w pędach winorośli dopuszcza niższe temperatury, na które tkanki rośliny mogą być odporne [96, 109]. Zwraca się uwagę na możliwości wykorzystania tej informacji w określonych sytuacjach uprawowych.

LITERATURA

1. Abboud A. M., Hosene y R. C.: Cereal Chem. 61, 34, 1984.
2. Amberg C. H.: J. Amer. Chem. Soc. 79, 3980, 1957.
3. Armstrong D. L., Stanley D. W., Maurice T. J.: w „Functionality and protein structure”, red. A. Pour-El, Amer. Chem. Soc., vol. 92 Washington 1979.
4. Ashworth E. N.: Plant Physiol. 74, 862, 1984.
5. Bakradze N. G., Moiscrapiszvili K. M., Koszelaszvili L. V.: Biofizika 25, 54, 1980.

6. Bakradze N. G., Moiscrapiszvili K. M., Koszelaszvili L. V.: *Biofizika* 26, 119, 1981.
7. Bakradze N. G., Balla Ju. A., Metreveli I. M.: *Biofizika* 26, 719, 1981.
8. Bakradze N. G., Moiscrapiszvili K. M., Koszelaszvili L. V.: *Biofizika* 27, 736, 1982.
9. Bakradze N. G., Moiscrapiszvili K. M., Koszelaszvili L. V.: *Biofizika* 28, 888, 1983.
10. Bakradze N. G., Koszelaszvili L. V., Moiscrapiszvili K. M., Namcevadze E. M.: *Biofizika* 29, 143, 1984.
11. Bakradze N. G. i in.: *Biofizika* 29, 105, 1984.
12. Bakradze N. G. i in.: *Biofizika* 29, 670, 1984.
13. Bakshi A. S., Johnson R. M.: *J. Food Sci* 48, 1279, 1983.
14. Banks W., Claperton J. L., Ferrie M. E.: *J. Soc. Dairy Technol.* 29, 86, 1976.
15. Banks W. i in.: *J. Sci. Food Agric.* 31, 368, 1980.
16. Beezer A. E., Newell R. R., Tyrrell H. J. V.: *J. Appl. Bacteriol.* 41, 197, 1976.
17. Beck K., Gill S. J., Downing M.: *J. Amer. Chem. Soc.* 87, 901, 1965.
18. Berger K. G., Akehurst E. E.: *J. Food Technol.* 1, 237, 1966.
19. Berlin E., Kliman P. G.: *J. Colloid Interface Sci.* 17, 488, 1970.
20. Berlin E., Kliman P. G., Pallansch M. J.: *J. Dairy Sci.* 54, 300, 1971.
21. Biliaderis C. G., Maurice T. J., Vose J. R.: *J. Food Sci.* 45, 1669, 1980.
22. Bonsal J., LeMan J. M.: *J. Food Sci.* 47, 2004, 1982.
23. Boling E. A., Blanchard G. G., Russell W. J.: *Nature* 241, 472, 1973.
24. Brettel R. i in.: *Studia Biophys.* 34, 71, 1972.
25. Brettel R., Lamprecht I., Schaarschmidt B.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11, 205, 1981.
26. Brettel R., Lamprecht I., Schaarschmidt B.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11, 211, 1981.
27. Burdzchanadze T. V. i in.: w „*Biophysics of muscular contraction*”, red. G. M. Frank, Izd. Nauka, Moskwa 1966.
28. Chapman D., Collin D. T.: *Nature* 206, 189, 1965.
29. Chapman D., Williams R. M., Ladbroke B. D.: *Chem. Phys. Lipids* 1, 445, 1967.
30. Chen T. H. H. i in.: *Plant. Physiol.* 75, 720, 1984.
31. Chikany B.: *Szappan Olaj Kozmetika* 31, 52, 1982.
32. Colonna P., Buleon A., Mercier C.: *J. Food Sci.* 46, 888, 1981.
33. Colwell K. H.: *J. Sci. Food Agric.* 20, 550, 1969.
34. Coony C. L., Wang D. L. C., Mateles R. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 11, 269, 1968.
35. Darryl M.: *Plant Physiol.* 60, 374, 1977.
36. Davies R. J., Webb T.: *Chem and Ind.* 16, 1138, 1969.
37. Donovan J. V. et al.: *J. Sci. Food Agric.* 26, 73, 1975.
38. Donovan J. V.: *J. Sci. Food Agric.* 27, 197, 1976.
39. Donovan J. V.: *J. Sci. Food Agric.* 28, 571, 1977.
40. Donovan J. V.: *Biopolymers* 18, 263, 1979.
41. Eliasson A. C.: *Starch* 32, 270, 1980.
42. Flory P. J.: w „*Principles of polymer chemistry*”, Cornell Univ. Press, Ithaca.
43. Forrest W. W.: *J. Sci Instrum.* 38, 143, 1961.
44. Forrest W. W., Walker D. J.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 13, 217, 1963.

45. Forrest W. W.: w „Biochemical Microcalorimetry” red. H. D. Brown, Acad. Press, London 1969.
46. Fujita T. i in.: J. Gen. Appl. Microbiol. 22, 43, 1976.
47. Fujita T., Nunomura K.: w „Application of calorimetry in life sciences”, red. Lamprecht, I. and Schaarschmidt B., W. de Gruyter, Berlin 1977.
48. Fujita T., Noda Y.: Bull. Chem. Soc. Japan 51, 1567, 1978.
49. Fujita T., Noda Y.: Bull. Chem. Soc. Japan 52, 2349, 1979.
50. Fujita T. i in.: Bull. Chem. Soc. Japan 52, 3650, 1979.
51. Gegiou D., Georgouli M.: Fette, Seifen, Austringmittel 84, 359, 1982.
52. Ghasi K. i in.: Cereal Chem. 59, 258, 1982.
53. Ginzburg B. Z.: J. Colloid Interface Sci. 85, 422, 1982.
54. Griko Y. V., Privalov P. L.: Biofizika 29, 194, 1984.
55. Haegerdal B.: J. Food Sci. 43, 22, 1978.
56. Haly A. R., Smith J. W.: Biopolymers 10, 1681, 1971.
57. Hansvijk J., Haighton A. J.: J.A.O.C.S. 35, 457, 1958.
58. Hashimoto M., Takahashi K.: Agric. Biol. Chem. 46, 1559, 1982.
59. Hinz H. J., Sturtevant J. M.: J. Biol. Chem. 247, 3697, 1972.
60. Iglesias H. A., Chirife J.: Lebensmittel-Wiss. Technol. 9, 116, 1976.
61. Imeson A. P., Ledward D. A., Mitchell J. R.: J. Sci. Food Agric. 28, 661, 1977.
62. Ishikawa Y., Shoda M., Maruyama H.: Biotechnol. Bioeng. 23, 2629, 1981.
63. Ishikawa Y., Nonoyama Y., Shoda M.: Biotechnol. Bioeng. 23, 2825, 1981.
64. Ishikawa Y., Shoda M.: Biotechnol. Bioeng. 25, 1817, 1983.
65. Itoh S., Takahashi K.: Agric. Biol. Chem. 48, 271, 1984.
66. Jain M. K., Wagner M. C.: w „Introduction to biological membranes”, J. Wiley, New York 1980.
67. Jones M. N.: w „Studies in modern thermodynamics”, red. M. N. Jones, Elsevier, Amsterdam, 1979.
68. Kecinaszvilii N. N., Privalov P. L.: Biofizika 18, 1973.
69. Krasavcev O. A.: Fiziol. biochim. kult. rast. 11, 176, 1979.
70. Kugimiya M., Donovan J. V., Wong R. Y.: Starch 32, 265, 1980.
71. Kugimiya M., Donovan J. V.: J. Food Sci. 46, 765, 1981.
72. Ladbroke B. D., Chapman D.: Chem. Phys. Lipids 3, 304, 1969.
73. Lamprecht I., Schaarschmidt B., Stein W. D.: Biophysik 10, 177, 1973.
74. Levitt J.: w „Cryobiology” red. H. T. Meryman, Acad. Press, London s. 495 1966.
75. Lindstrom O. M., Huner N. P. A., Carter J. V.: Botan. Gaz. 144, 234, 1983.
76. Mabrey S., Sturtevant J. M.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 3862, 1976.
77. Mabrey S., Sturtevant J. M.: w „Methods in membrane biology” vol. 9, s. 237, red. E. D. Korn, Plenum Press, New York 1978.
78. Mabrey-Gaud S.: w „Liposomes: from physical structure to therapeutic applications”, red. C. G. Knight, Elsevier, Amsterdam 1981, s. 105.
79. Marcus J. G., Puri P. S.: J.A.O.C.S. 55, 610A, 1978.
80. Mazur P.: w „cryobiology” red. H. T. Meryman, Acad. Press, London 1966.
81. Mazur P. i in.: Cryobiology 16, 587, 1979.
82. McProud L. M., Lund D. L. B.: J. Food Sci. 48, 687, 1983.
83. Meryman H. T.: Cryobiology 5, 489, 1968.
84. Meryman H. T.: w „The frozen cell”, red. Wolstenholme i O’Connor, Churchill, London 1970, s. 51.

85. Molino S. W. i in.: *Food Technol* 15, 228, 1961.
86. Monk P., Wadsö J.: *J. Appl. Bacteriol.* 38, 71, 1975.
87. Mortensen U., Noren B., Wadsö J.: w „Modern methods in the study of microbial ecology”, red. T. Rosewall, Rotobekman, Stockholm 1972.
88. Mou D. G., Cooney C. L.: *Biotechnol. Bioeng.* 18, 1371, 1976.
89. Nakazawa F. i in.: *Agric. Biol. Chem.* 48, 201, 1984.
90. Pardacci L. G., Duckworth R. B.: *J. Food Technol.* 7, 423, 1972.
91. Perez M. G. R., Calvelo A.: *J. Food Sci.* 49, 152, 1984.
92. Pfeil W., Privalov P. L.: *Biophys. Chem.* 4, 23, 1976.
93. Pfeil W., Privalov P. L.: *Biophys. Chem.* 4, 33, 1976.
94. Pfeil W., Privalov P. L.: *Biophys. Chem.* 4, 41, 1976.
95. Phillips M. C., Ladbroke B. D., Chapman D.: *Biochim. Biophys. Acta* 193, 35, 1970.
96. Pogosjan K. S. i in. *Fiziol. biochim. kult. rast.* 16, 171, 1984.
97. Privalov P. L.: *Biofizika* 8, 308, 1963.
98. Privalov P. L., Monaselidze D. R.: *Biofizika* 8, 420, 1963.
99. Privalov P. L., Kecinaszvoli N. N., Atanasov B. P.: *Biopolymers* 10, 1865, 1971.
100. Privalov P. L.: *FEBS Letters* 404 Supl. 1408, 1974.
101. Privalov P. L., Kecinaszvoli N. N.: *J. Mol. Biol.* 86, 665, 1974.
102. Probsting E. L., Sokai A.: *Hort. Sci.* 14, 597, 1979.
103. Puszkas N. S. i in.: *Cryobiology* 17, 403, 1980.
104. Puszkas N. S., Belous A. M., Cvetkov C. D.: w „Teoria i praktika kriogennogo i sublimacjonnoho konservirovanija”, Naukova Dumka, Kijów 1984 (rozdz. V).
105. Quamme H. A., Stushoff C., Weiser C. J.: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97, 608, 1972.
106. Quamme H. A. i in.: *Hort. Sci.* 10, 521, 1977.
107. Quamme H. A.: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103, 57, 1978.
108. Rajapaksa D., Eliasson A. C., Larsson K.: *J. Cereal Sci.* 1, 53, 1983.
109. Raznopolov O. N., Turkulova L. P., Krasavcev O. A.: *Fiziol. biochim. kult. rast.* 16, 161, 1984.
110. Rek J. H. M.: w „Differential Thermal Analysis”, red. R. C. McKenzie, vol. 2, Acad. Press New York 1972.
111. Roger G. i in.: *J. Food Sci.* 49, 117, 1984.
112. Rugg M., Lüscher M., Blanc B.: *J. Dairy Sci.* 59, 387, 1974.
113. Rugg M., Moor U., Blanc B.: *Biochim. Biophys. Acta*, 400, 334, 1975.
114. Schaarschmidt B., Lamprecht I.: *Experientia* 29, 505, 1973.
115. Shoda M., Ishikawa Y.: w „Modelling and control of biotechnical processes”, red. A. Halme, Pergamon Press, Oxford 1983.
116. Silvius J. R., McElhaney R. N.: *Biochim. Biophys. Acta* 555, 175, 1979.
117. Simatos D. i in.: w „Water relations in foods”, red. Duckworth, R. B., Acad. Press, New York 1975.
118. Small D. M., Bourges M.: *Mol. Cryst.* 1, 541, 1966.
119. Spies R. D., Hosney R. C.: *Cereal Chem.* 59, 128, 1982.
120. Stabursvik E., Martens H.: *J. Sci. Food Agric.* 31, 1034, 1980.
121. Takahashi K.: *Agric. Biol. Chem.* 37, 2743, 1973.
122. Tatunaszvoli L. V., Privalov P. L.: *Biofizika* 29, 583, 1984.
123. Tumanov I. I.: „Fiziologija zakalivanija i morozostojkosti rastenij”, Izd. Nauka, Moskwa 1979.

124. Welsh E. J. in: *Progr. Food and Nutr.* 6, 44, 1982.
125. Wootton M., Bamunuarachchi A.: *Starch* 32, 126, 1980.
126. Wootton M., Bamunuarachchi R.: *Starch* 31, 262, 1979.
127. Wright D. J., Leach I. B., Wilding P.: *J. Sci. Food. Agric.* 28, 557, 1977.
128. Wright D. J., Wilding P.: *J. Sci. Food Agric.* 35, 357, 1984.