

Enzymatyczna hydroliza białek mięśniowych kręgosłupów dorsza bałtyckiego^{*)}

ELŻBIETA SKIERKA, MARIA SADOWSKA, JOANNA MAŃKOWSKA,
AGATA LIPIŃSKA-BEYER

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej,
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Skierka E., Sadowska M., Mańkowska J., Lipińska-Beyer A.
Enzymatic hydrolysis of muscle protein of Baltic cod backbones

Summary

Enzymatic hydrolysis was conducted to recover the potentially addible high protein hydrolysate from cod backbones. The commercially available alcalase and trypsyne was used for hydrolysis at enzyme concentrations of 2.5; 5; 10; 15; 20; 30 and 40 mg/g backbones. The enzymatic deproteinization was conducted for 24 and 48 h. All procedures were performed at pH 7.0 and 4°C. The yield of enzymatic hydrolysis increases with the growth of trypsyne and alcalase concentration up to 20 and 10 mg/g backbone, respectively. The increase of these values did not influence the yield of enzymatic deproteinization. After the treatment by trypsyne, maximum recovery of protein from cod backbone was 60%, while by alcalase it was 55%. The yield of enzymatic hydrolysis was the same after 24 and 48 h. Collagen losses did not exceed 0.2%.

Keywords: fish, protein, by-products, backbone

W Polsce w ciągu roku otrzymuje się 4565 ton kręgosłupów ryb, w tym 1500 ton z dorsza bałtyckiego (13). Kręgosłup dorsza stanowi ok. 15% masy ryby (7, 22). Jest on bogatym źródłem białek mięśniowych oraz kolagenu. Ok. 75% masy kręgosłupów powstałych po filetowaniu stanowi tkanka mięśniowa.

Białka sarkoplazmatyczne oraz miofibrylarne mięśni ryb charakteryzują się dużą wartością odżywczą. Zawierają wszystkie niezbędne aminokwasy w proporcjach zalecanych przez wzorzec FAO, z wyjątkiem mniejszej zawartości tryptofanu. Strawność białka jest duża i wynosi ok. 90%. Ryby są zatem bogatym źródłem cennego białka o bardzo dobrych właściwościach biologicznych, które spożywane razem z produktami zbożowymi ubogimi w lizynę i treoninę wzbogacają ogólny skład aminokwasowy diety. Dzięki temu organizm człowieka może optymalnie wykorzystać również mniej wartościowe biologicznie białka roślinne (23).

Białka mięśniowe można oddzielić od elementów kostnych kręgosłupów na drodze wyczerpującej ekstrakcji 0,1 M roztworem NaOH (24) bądź enzymatycznie. Ostatnio opublikowano wiele prac na temat enzymatycznego wydzielania białek mięśniowych z odpadowych surowców łącznotkankowych, między innymi z dorsza (3, 25), krewetki (8, 28), tuńczyka (9, 10) oraz z wnętrzości owcy (4). Wydajność hydrolizy enzymatycznej

zależy m.in. od stosowanego enzymu, rodzaju i stężenia substratu, czasu inkubacji, pH oraz od temperatury. Gildberg i wsp. (7) porównywali wydajność izolacji białek z kręgosłupów dorsza w zależności od zastosowanego enzymu (alkalazy, neutrazy, protamexu, trypsyny z dorsza i wieprzowej). Enzymy bakteryjne (alkalaza, neutraza i protamex) hydrolizują białka z dużo większą wydajnością (ok. 44%) niż trypsyna (ok. 27%). Zależnie od stosowanego enzymu i czasu hydrolizy można uzyskać hydrolizaty białkowe o różnych właściwościach sensorycznych. Wraz ze wzrostem stopnia hydrolizy bydlęcych krwinek zwiększa się gorzkość produktu (26). Hydrolizaty białkowe otrzymane przy użyciu alkalazy, neutrazy i protamexu zawierają więcej gorzkich peptydów niż preparaty otrzymane przy udziale trypsyny (7). Hydrolizę enzymatyczną wykorzystuje się do wytwarzania peptonów dla celów mikrobiologicznych i jako dodatki zwiększające wartość odżywczą żywności (6, 14, 19, 27, 30). Hydrolizat białkowy może być stosowany jako składnik dietetycznej żywności dla dzieci, ludzi starszych lub osób ze schorzeniami przewodu pokarmowego, wątroby, trzustki i nerek (6, 20, 27). Hydrolizaty białkowe z ryb są również składnikiem substytutu mleka lochy dla odstawionych prosiąt i są stosowane jako pokarm dla ryb i innych zwierząt (21). Są one również źródłem peptydów o działaniu przeciwutleniającym i powierzchniowo czynnych (11, 12) oraz peptydów hamujących proliferację komórek raka piersi (16). Zatem hydrolizat białek mięśniowych jest potencjalnym

^{*)} Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, umowa nr N312 058 32/2848.

źródłem aktywnych peptydów o różnorodnym zastosowaniu.

Drugim, cennym składnikiem kręgosłupów dorsza bałtyckiego jest kolagen. Aby go wydzielić, należy najpierw usunąć towarzyszące mu białka. Celem badań było określenie przydatności hydrolizy enzymatycznej do odzyskiwania białek mięśniowych z kręgosłupów dorsza bałtyckiego w takich warunkach, aby kolagen pozostał w nienaruszonym stanie.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na kręgosłupach dorsza bałtyckiego (*Gadus morhua*), po mechanicznym filetowaniu. Kręgosłupy rozdrobniono w wilku przez siatkę o ϕ oczek 0,5 cm. Materiał dokładnie wymieszano, zapakowano do woreczków polietylenowych i przechowywano w temperaturze -18°C do czasu badań. W surowcu oznaczono zawartość suchej masy, popiołu zgodnie z metodami AOAC (2); azotu ogółem metodą Kjeldahla (17) oraz hydroksyproliny metodą kolorymetryczną zalecaną przez ISO (1), po 6-godzinnej hydrolizie materiału w roztworze 6 M kwasu solnego.

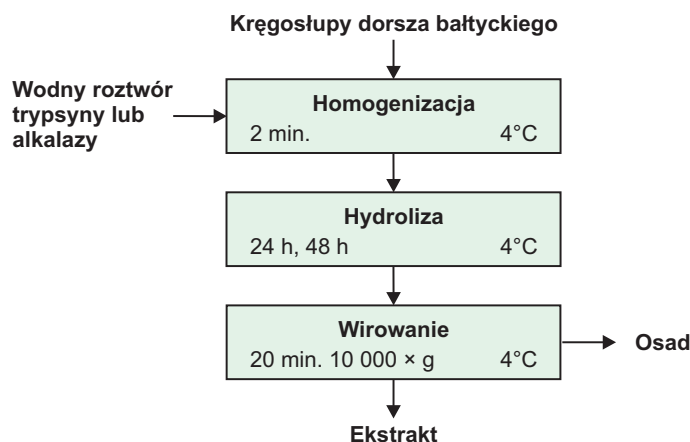
Białka mięśniowe kręgosłupów dorsza hydrolizowano wg schematu przedstawionego na ryc. 1. Stosowano trypsynę z trzustki wieprzowej firmy Fluka o aktywności 95 U/mg oraz alkalazę firmy Novo Industri A/S o aktywności 1,5 U/g w stężeniach: 2,5; 5; 10; 15; 20; 30; 40 mg/g surowca. Enzym rozpuszczano w wodzie w takiej objętości, aby stosunek surowca do rozpuszczalnika wynosił: 1 : 2, 1 : 6 i 1 : 10 (w : v). Stężenie substratu (białka mięśniowe) w mieszaninie reakcyjnej przy tych stosunkach wynosiło, odpowiednio: 39,0, 16,7 i 10,6 mg/cm³. Próbkę homogenizowano przez 2 min. przy 4 tys. obr./min., a czas hydrolizy enzymatycznej wynosił 24 i 48 h. Próbkę odwirowano, osad odrzucano, natomiast w ekstrakcie oznaczano zawartość białka metodą Lowry'ego (15). Reakcja przebiegała w środowisku obojętnym.

Określono również wydajność hydrolizy enzymatycznej w zależności od temp. i czasu. Hydrolizę prowadzono w temperaturze 4, 10 i 36°C. Stosunek surowca do rozpuszczalnika wynosił 1 : 2 (w : v), a stężenie enzymu 30 mg/g surowca.

Wyniki wyrażone są stopniem ekstrakcji białek (SE), który wyznaczano ze wzoru: $SE = C/C_0 \times 100\%$; gdzie: C_0 – stężenie białek mięśniowych w mieszaninie reakcyjnej, C – stężenie produktów enzymatycznej hydrolizy białek w ekstrakcie.

Przeprowadzono po trzy doświadczenia dla każdego stężenia enzymu, stężenia substratu i czasu hydrolizy.

Analizę elektroforetyczną produktów enzymatycznej hydrolizy białek prowadzono wg Bollag i Edelstein (5) w aparacie firmy Biometria, stosując 5% żel SDS – poliakrylamidowy zagęszczający i 15% żel rozdzielający. Na żel nanoszono 10 μl próby o stężeniu od 10 do 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Rozdział prowadzono przez ok. 0,5 h przy napięciu 70 mV i następnie przez ok. 1 h przy napięciu 150 mV. Próby, przed nanoszeniem na żel, termostatowano przez 5 min. w temperaturze 60°C w buforze Tris-HCl o pH 6,8. Rozdzielone produkty enzymatycznej hydrolizy barwiono w Coomassine Brilliant Blue R-250 przez 0,5 h. Żele odbarwiano wg Webera i Osborna (31). Stosowano wzorce masy białek firmy Fermentas o masach: 66,2 kDa (albumina bydłowej flazy); 45,0 kDa (owoalbumina z białka jaja kurzego); 35,0 kDa (dehydrogenaza laktazowa z mięśni); 25,0 kDa (*E. coli* RE Bsp981); 18,4 kDa (β -laktoglobulina z mleka krowiego) i 14,4 kDa (lizozym z białka jaja kurzego).

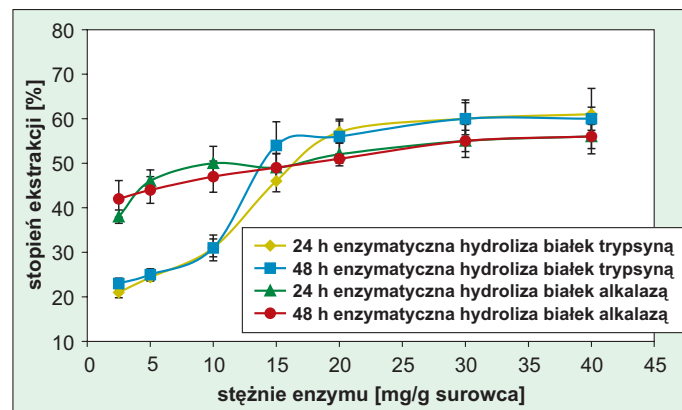


Ryc. 1. Schemat procesu technologicznego wydziałania białek mięśniowych z rozdrobnionych kręgosłupów

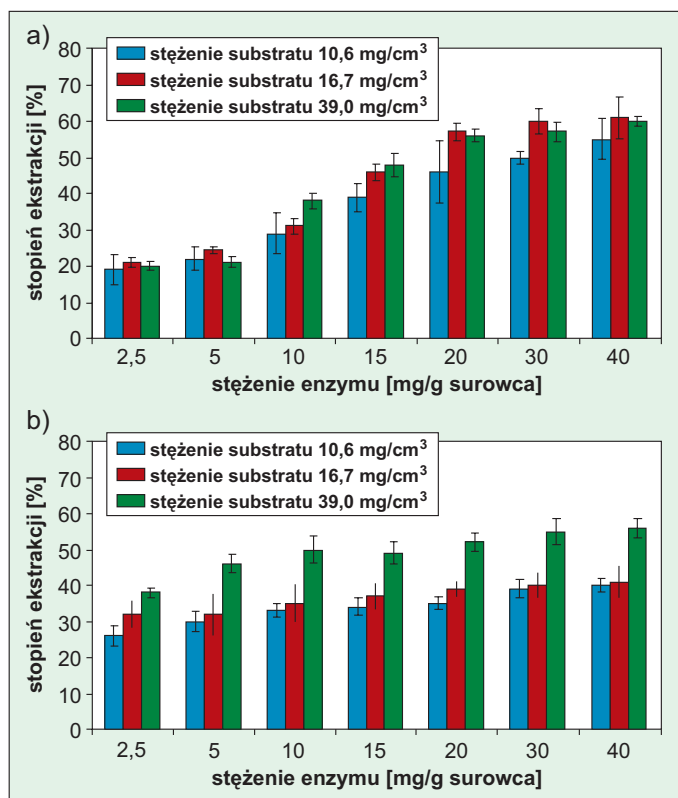
Wyniki i omówienie

Kręgosłupy dorsza bałtyckiego zawierały: 22% s. m., 6,2% popiołu, 16,7% białka surowego, z czego 5,2% stanowi kolagen. Uzyskane wyniki są podobne do składu podstawowego kręgosłupów dorsza przedstawionego przez Gildberga i wsp. (7). Zawartość kolagenu jest zbliżona do wyników uzyskanych przez Szynalewską (29). Z przedstawionego składu podstawowego wynika, że kręgosłupy dorsza bałtyckiego zawierają około 76% białka surowego w s. m., z czego 2/3 stanowią białka mięśniowe.

Na ryc. 2 przedstawiono wydajność enzymatycznej hydrolizy białek w zależności od czasu hydrolizy i stężenia enzymów. Wraz ze wzrostem stężenia trypsyny i alkalazy w zakresie stężeń, odpowiednio, od 2,5 do 20 mg/g surowca i od 2,5 do 10 mg/g surowca wydajność hydrolizy białek wzrasta. Zwiększanie stężenia trypsyny powyżej 20 mg/g surowca i alkalazy powyżej 10 mg/g surowca nie jest celowe, gdyż nie powoduje to wzrostu wydajności reakcji. Stosując trypsynę w stężeniu 2,5 mg/g surowca z kręgosłupów dorsza bałtyckiego można wydzielić ok. 20% białek mięśniowych, podczas gdy przy użyciu tego samego stężenia alkalazy – 40%. Natomiast przy stężeniu enzymu 20 mg/g surowca zhydrolizowano o 40% więcej białek w przypadku trypsyny i o ok. 20% więcej w przypadku alkalazy. Traktując doświadczalne kręgosłupy trypsyną można mak-



Ryc. 2. Stopień ekstrakcji białek w zależności od czasu i stężenia enzymu, stosunek surowca do rozpuszczalnika 1 : 6 (w : v)



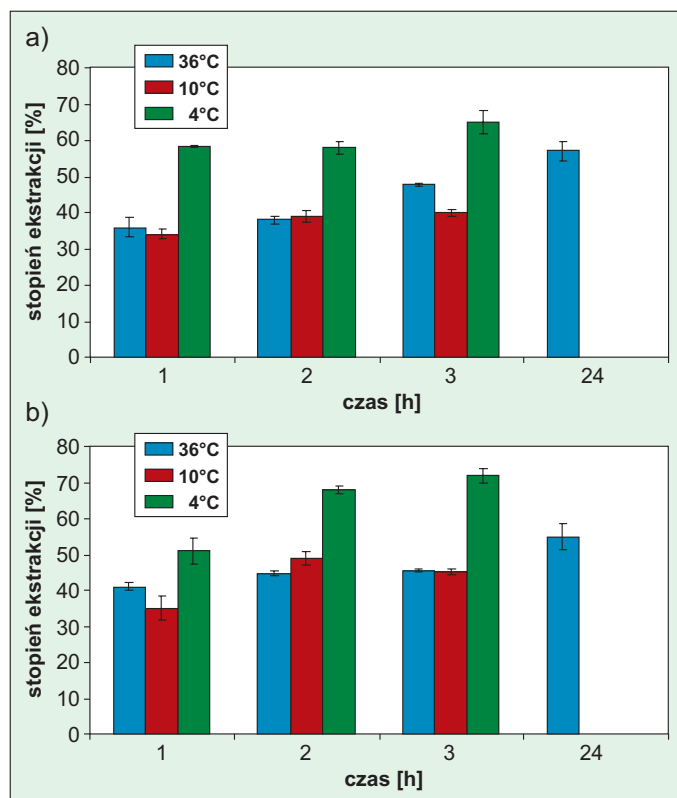
Ryc. 3. Wpływ stężenia substratu na stopień ekstrakcji: a) trypsyną, b) alkalazą

symalnie zhydrolizować ok. 60% białek mięśniowych, a przy użyciu alkalazy 55%. Gildberg i wsp. (7), stosując alkalazę i trypsynę, już po 2 h ekstrakcji w temperaturze 40°C stwierdzili zhydrolizowanie, odpowiednio, 44% i 27% białek kręgosłupów dorsza. Poddając głowy i pancerze krewetek działaniu alkalazy w temperaturze 40°C można zhydrolizować 55% białek już po 2 h procesu (8). Hydrolizując wnętrzości dorsza alkalazą w temperaturze 55°C po 1 h trawienia można wydzielić z nich 90% zhydrolizowanych produktów białek (3). Większa wydajność jest wynikiem zastosowania optymalnej temperatury dla enzymu. Stopień ekstrakcji białka w temperaturze 4°C nie zależy od czasu trwania reakcji i jest taki sam po 24 h, jak i po 48 h (ryc. 2).

Podczas hydrolizy kręgosłupów dorsza trypsyną lub alkalazą rozpuszcza się bardzo mało kolagenu – od 0,05 do 0,16%. Można zatem uznać, że w stosowanych warunkach kolagen jest praktycznie nierozpuszczalny.

Ryc. 3a przedstawia wyniki wpływu stężenia substratu na stopień ekstrakcji białka trypsyną. Przy stężeniu trypsyny 2,5 i 5 mg/g surowca stężenie substratu nie wpływa na stopień ekstrakcji białka. Natomiast w zakresie stężeń tego enzymu od 10 do 20 mg/g surowca wydajność hydrolizy wzrasta ze wzrostem stężenia substratu. Powyżej 20 mg/g surowca stopień ekstrakcji nie zależy od stężenia substratu i osiąga stałą wartość. W przypadku alkalazy (ryc. 3b) wzrost stężenia substratu z 10,6 do 39,0 mg/cm³ powoduje wzrost wydajności hydrolizy enzymatycznej o ok. 45%.

Wpływ temperatury i czasu na wydajność enzymatycznej hydrolizy białek przedstawiono na ryc. 4a, b. Najefektywniej enzymy działały w temperaturze 36°C.

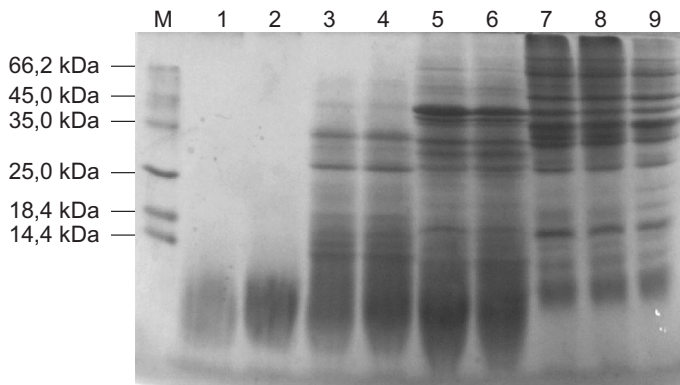


Ryc. 4. Stopień ekstrakcji białek mięśniowych w zależności od temperatury: a) trypsyną, b) alkalazą

Jest to optymalna temperatura dla trypsyny. Alkalaza najefektywniej działa w temperaturze 50°C (18). Podwyższenie temperatury z 4°C do 10°C nie wpływa na wydajność procesu. Stopień ekstrakcji białek trypsyną lub alkalazą po 3 h hydrolizie enzymatycznej jest tylko o ok. 10% niższy niż po 24 h. Możliwe, że taki sam stopień hydrolizy, który osiągnięto po 24 h można uzyskać w krótszym czasie, lecz dłuższym niż 3 h. Wszystkie badania prowadzono w temperaturze 4°C. Trypsyna i alkalaza są enzymami nieswoistymi dla kolagenu i działają jedynie na jego zdenaturowaną formę. Kolagen ryb zimnolubnych w 36°C ulega denaturacji, dlatego też w badaniach zastosowano niską temperaturę.

W celu sprawdzenia stopnia hydrolizy enzymatycznej białek przeprowadzono charakterystykę elektroforetyczną otrzymanych hydrolizatów białkowych (ryc. 5). Równocześnie przygotowano próbę odniesienia, homogenizując surowiec przez 2 min. z wodą destylowaną.

Masy cząsteczkowe i ilość produktów hydrolizy enzymatycznej nie zależą od czasu reakcji i są takie same po 24 i 48 h zarówno dla trypsyny, jak i alkalazy. Stosując trypsynę w stężeniu 2,5 mg/g surowca można wyekstrahować jedynie frakcję białek sarkoplazmatycznych. Po zastosowaniu alkalazy (w tym samym stężeniu) w hydrolizacie znajdują się głównie produkty hydrolizy białek o m.c. < 35 kDa. Trudno jednak stwierdzić, czy są to już produkty hydrolizy białek sarkoplazmatycznych, czy/i miofibrylarnych, ponieważ masy cząsteczkowe tych białek mieszczą się w szerokim zakresie 18 ÷ 2800 kDa. Ze wzrostem stężenia enzymów maleje wielkość produktów hydrolizy i zwiększa się ich ilość.



Ryc. 5. Elektroforetyczna charakterystyka hydrolizatów białkowych

Objaśnienia: M – wzorce masy białek; 1 – 48 h hydroliza alkaloza, 40 mg enzymu/g surowca; 2 – 24 h hydroliza alkaloza, 40 mg enzymu/g surowca; 3 – 48 h hydroliza alkaloza, 2,5 mg enzymu/g surowca; 4 – 24 h hydroliza alkaloza, 2,5 mg enzymu/g surowca; 5 – 48 h hydroliza tripsyna, 40 mg enzymu/g surowca; 6 – 24 h hydroliza tripsyna, 40 mg enzymu/g surowca; 7 – 48 h hydroliza tripsyna, 2,5 mg enzymu/g surowca; 8 – 24 h hydroliza tripsyna, 2,5 mg enzymu/g surowca; 9 – próba odniesienia

Analogiczną zależność zaobserwowali Guérard i wsp. (9), hydrolizując żołądki tuńczyka z użyciem alkalozy. Wzrost stężenia tripsyny do 40 mg/g surowca powoduje zwiększenie udziału produktów o m.c. < 45 kDa. Po zastosowaniu alkalozy o tym samym stężeniu, w hydrolizacie znajdują się już jedynie produkty o masie cząsteczkowej < 14,0 kDa. Podobne wyniki uzyskali Gildberg i wsp. (7), traktując kręgosłupy dorsza alkaloza otrzymali hydrolizaty białkowe z większą zawartością oligopeptydów o m.c. < 2,5 kD w porównaniu z hydrolizatem tripsynowym. Różnice w stopniu hydrolizy białek spowodowane są różną częstotliwością występowania w białkach miejsc restrykcyjnych specyficznych dla alkalozy i tripsyny. Wielkość produktów hydrolizy enzymatycznej można zatem regulować stężeniem i rodzajem zastosowanego enzymu.

Podsumowanie

Stopień ekstrakcji białek mięśniowych dorsza bałtyckiego przylegających do kręgosłupów zależy od stężenia enzymów (tripsyny i alkalozy) i substratu. Ze wzrostem stężenia tripsyny od 2,5 do 20 mg/g surowca oraz alkalozy od 2,5 do 10 mg/g surowca zwiększa się wydajność hydrolizy. Działając tripsyną na białka mięśniowe kręgosłupów można maksymalnie odzyskać ok. 60% białek, natomiast stosując alkalozę ok. 55%. Mała wydajność hydrolizy białek przy tak dużym zużyciu enzymu w stosunku do surowca sprawia, że ten sposób odmięśniania kręgosłupów jest nieefektywny i nieekonomiczny. Prawdopodobnie zamierzony cel odzyskania z kręgosłupów wszystkich białek mięśniowych można by osiągnąć stosując inne enzymy proteolityczne działające w obojętnym środowisku, szczególnie te uzyskane ze zwierząt bytujących w zimnych wodach. Wykazują one znaczną aktywność w temperaturze chłodniczej, jednakże handlowe preparaty tych enzymów nie są jeszcze dostępne.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Meat and meat products – determination of L – hydroxyproline content. Reference method. International Standard, ISO 3496 – 1978 (E).
2. AOAC (1990). Official method of analysis. Virginia: Association of Official Analytical Chemists.
3. Aspmo S. I., Horn S. J., Eijsink V. G. H.: Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. Proc. Biochem. 2005, 40, 1957-1966.
4. Bhaskar N., Modi V. K., Govindaraju K., Radha C., Lalitha R. G.: Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass. Biores. Technol. 2007, 98, 388-394.
5. Bollag D. M., Edestein S. J.: Protein Methods. Wiley – Liss, A John Wiley and Sons, Inc., Publication, New York 1991, 95-139.
6. Clemente A.: Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. Trends Food Sci. Technol. 2000, 11, 254-262.
7. Gildberg A., Arnesen J. A., Carlehög M.: Utilization of cod backbone by biochemical fractionation. Proc. Biochem. 2002, 38, 475-480.
8. Gildberg A., Stenberg E.: A new process for advanced utilization of shrimp waste. Proc. Biochem. 2001, 36, 809-812.
9. Guérard F., Dufossé L., De La Broise D., Binet A.: Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. J. Molec. Catal. B. 2001, 11, 1051-1059.
10. Guérard F., Guimas L., Binet A.: Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. J. Molec. Catal. B. 2002, 19-20, 489-498.
11. Je J. Y., Park P. J., Kim S. K.: Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. Food Res. International 2005, 38, 45-50.
12. Jun S. Y., Park P. J., Jung W. K., Kim S. K.: Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. Eur. Food Res. Technol. 2004, 219, 20-26.
13. Kolodziej K., Kolodziejski W.: Ilościowa i jakościowa charakterystyka surowców ubocznych przemysłu rybnego, jako potencjalnej bazy surowcowej do uzyskiwania kolagenu i żelatyny. Sprawozdanie z realizacji I etapu pracy pt.: Wytwarzanie biodegradowalnych materiałów opakowaniowych. Maszynopis, Politechnika Gdańska, Gdańsk 2005.
14. Kolodziejska I.: Enzymatyczne i funkcjonalne właściwości białek kalmarów. Charakterystyka i możliwości wykorzystania. Zesz. Nauk. Politechniki Gdańskiej, Chemia, 44, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej 1999.
15. Lowry O. H., Rosebrough H. I., Farr A. L., Randall R. I.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275.
16. Picot L., Bordenave S., Didelot S., Fruitier-Arnaudin I., Sannier F., Thorkelson G., Bergé J. P., Guérard F., Chabeaud A., Piot J. M.: Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. Proc. Biochem. 2006, 41, 1217-1222.
17. PN – 75/A – 04018. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko.
18. Shahidi F., Han X., Synowiecki J.: Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). Food Chem. 1995, 53, 285-293.
19. Shang-gui D., Zhi-ying P., Fang C., Ping Y., Tie W.: Amino acid composition and anti-anaemia action of hydrolyzed offal protein from *Harengula Zunasi* Bleeker. Food Chem. 2004, 87, 97-102.
20. Silva M. E. M. P. E., Mazzilli R. N., Cusin F.: Composition of hydrolysates from meat. J. Food Compos. Anal. 1999, 12, 219-225.
21. Simpson B. K., Nayeri G., Yaylayan V., Ashie I. N. A.: Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. Food Chem. 1998, 61, 131-138.
22. Sikorski Z. E.: Morskie surowce żywnościowe: dostępność, właściwości i przechowywanie chłodnicze. WNT, Warszawa 1992.
23. Sikorski Z. E.: Ryby i bezkręgowce morskie – pozyskiwanie. WNT, Warszawa 2004.
24. Skierka E., Sadowska M., Majewska J.: Optymalizacja odzyskiwania białek mięśniowych z kręgosłupów dorsza bałtyckiego. Medycyna Wet. 2005, 62, 579-582.
25. Śliżyte R., Daukšas E., Falch E., Storř I., Rustad T.: Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. Proc. Biochem. 2005, 40, 1415-1424.
26. Synowiecki J., Jagielka R., Shahidi F.: Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. Food Chem. 1996, 57, 435-439.
27. Synowiecki J., Sikorska-Wisniewska G.: Funkcjonalne właściwości i żywieniowe zastosowanie hydrolizatów białkowych. Żywn. Technol. Jakość. 1997, 3, 20-26.
28. Synowiecki J., Al-Khateeb N. A. A. Q.: The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards. Food Chem. 2000, 68, 147-152.
29. Szałewska H.: Możliwości wykorzystania kręgosłupów dorsza jako źródła kolagenu. Praca magisterska, Wyd. Chemiczny, PG, Gdańsk 2000.
30. Venugopal V.: Functionality and potential applications of thermostable water dispersion of fish meat. Trends Food Sci. Technol. 1997, 8, 271-276.
31. Weber K., Osborn M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 1969, 244, 4406-4412.

Adres autora: mgr inż. Elżbieta Skierka, ul. Zastawna 6, Pruszcz Gdański; e-mail: eszierka@chem.pg.gda.pl