

ELWIRA WOROBIEJ, ANETA WUJKOWSKA, BEATA DRUŻYŃSKA,
RAFAŁ WOŁOSIAK

AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA HANDLOWYCH PREPARATÓW BIAŁEK SERWATKOWYCH

Streszczenie

W pracy badano właściwości przeciwutleniające handlowych preparatów białek serwatkowych różniących się zawartością białka i laktozy. Aktywność przeciwutleniającą preparatów określano wobec kationorodników ABTS^{•+} i nadtlenu w emulsji kwasu linolowego.

Oznaczenia przeprowadzone w celu scharakteryzowania białek preparatów serwatkowych wykazały, że preparat WPI 95 cechował się zarówno największą powierzchnią hydrofobowość aromatyczną, jak i największą zawartością dostępnych grup tiolowych i lizyny. Wszystkie preparaty charakteryzowały się dobrą aktywnością przeciwrodnikową wobec syntetycznych kationorodników ABTS^{•+}. Najskuteczniejszą dezaktywację rodników ABTS^{•+} wykazały preparaty WPC 60 i WPC 80 (ok. 76 %), a najmniejszą preparat WPI 95 (ok. 65 %). Spośród badanych preparatów największą aktywność przeciwutleniającą wobec emulsji kwasu linolowego stwierdzono w przypadku WPC 34 i WPC 60, w których oprócz białek występuje w znacznych ilościach laktoza. Może to świadczyć o interakcji tych składników i ich wzmożonym wpływie na aktywność przeciwutleniającą.

Słowa kluczowe: białka serwatkowe, przeciwutleniacze, utlenianie kwasu linolowego

Wprowadzenie

Jakość produktów spożywczych zależy nie tylko od podstawowych surowców, ale i od dodatków. Wysoką wartość żywnościową, a także doskonałe właściwości funkcjonalne wykazują preparaty białek serwatkowych [3]. Białka serwatkowe stosuje się głównie jako substancje modyfikujące cechy fizykochemiczne produktów spożywczych m.in. poprzez żelowanie, emulgowanie, a także poprawiające ich smak i zapach. Preparaty białek serwatkowych znalazły zastosowanie jako dodatki do żywności w przemyśle mleczarskim (jogurty, sery), mięsny (produkty strukturyzowane), piekarskim, cukierniczym (wafle, ciasta) i koncentratów spożywczych (zupy w proszku).

Dr inż. E. Worobiej, mgr inż. A. Wujkowska, dr inż. B. Drużyńska, dr inż. R. Wołosiak, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

Obecnie postrzegane są one również jako wartościowe składniki odżywcze w żywności dietetycznej czy składniki biologicznie aktywne w żywności funkcjonalnej. Wyniki ostatnich badań wykazały, że dodatkową funkcją białek, dotychczas niewykorzystywaną, może być przedłużenie trwałości żywności przez zapobieganie procesom oksydacyjnym [10, 16, 17].

Celem pracy było porównanie właściwości przeciwutleniających preparatów białek serwatkowych o różnej zawartości białka i laktozy.

Material i metody badań

Badania przeprowadzono na czterech handlowych preparatach białek serwatkowych różniących się zawartością białka i laktozy. Koncentraty i izolaty białek serwatkowych oznaczono skrótami podanymi przez ich producentów i dystrybutorów, wynikającymi z zawartości białka: WPC 34, WPC 60 (PPHU Laktopol), WPC 80 (MSM Ostrowia), WPI 95 (Lacma).

W celu scharakteryzowania preparatów oznaczano: zawartość białka ogółem i rozpuszczalnego (metodą Kjeldahla), powierzchnię hydrofobowość aromatyczną białek (metodą spektrofotometryczną z kwasem 8-anilino-1-naftalenosulfonowym; ANSA) [4], zawartość dostępnych grup tiolowych w reakcji z 2,2'-ditiobis (5-nitropirydyną) (DTNP) [9, 14] i lizyny (metodą spektrofotometryczną) [1], zdolność do chelatowania jonów żelaza(II) metodą spektrofotometryczną z ferrozyną [7], a także przeprowadzono rozdział elektroforetyczny frakcji (SDS-PAGE) [6].

Aktywność przeciwrodnikową preparatów białek serwatkowych (przy zastosowanym dodatku 100 mg% białka) oznaczano wobec kationorodników ABTS^{•+}, które uzyskiwano z kwasu 2,2'-azynobis-3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego (Sigma) w reakcji z nadtlenosiarczanem potasu [13]. Ponadto określano zdolność badanych preparatów do inhibicji utleniania emulsji kwasu linolowego w reakcji katalizowanej nieenzymatycznie (hemoglobina) [5].

Do oznaczeń stosowano 0,1 % ekstrakty białek w buforze fosforanowym o pH 7,0, które uzyskiwano w wyniku wytrząsania próbek przez 60 min i odwirowania (10 000 obr./min przez 10 min).

Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują, że wszystkie badane preparaty zawierały nieznacznie więcej białka ogółem od minimalnej wartości deklarowanej przez producenta (tab. 1). Największą zawartością laktozy charakteryzował się preparat WPC 34 (50%), natomiast w preparacie WPI 95 laktoza nie występowała lub była obecna w ilościach śladowych.

Tabela 1

Zawartość białka i laktozy w preparatach serwatkowych.
Content of protein and lactose contained in the whey protein preparations.

Preparaty Preparations	Zawartość białka ogółem [% s.m.] Content of total protein [% d.m.]	Zawartość białka rozpuszczalnego [%] Content of soluble protein [%]	Zawartość laktozy* [%] Content of lactose [%]
WPC 34	39,2 ± 0,5	32,4 ± 0,2	50
WPC 60	64,4 ± 0,4	57,0 ± 0,3	20
WPC 80	85,3 ± 0,3	70,0 ± 0,6	6
WPI 95	97,4 ± 1,1	89,0 ± 0,3	-

* - wartości deklarowane przez producenta / values as declared by the manufacturer

Powierzchniowa hydrofobowość aromatyczna białek ma istotny wpływ na ich właściwości funkcjonalne, gdyż decyduje o zdolności białka do wchodzenia w reakcje ze związkami niepolarnymi (lipidami). Białka mleka wykazują stosunkowo niską hydrofobowość w stanie natywnym, ponieważ hydrofobowe fragmenty ukryte są wewnątrz cząsteczek białkowych [12]. Na podstawie wyników badań (tab. 2) stwierdzono, że największą powierzchniową hydrofobowość aromatyczną (460 j.u. FI/g białka) wykazały białka preparatu WPI 95, a najmniejszą białka preparatu WPC 34 (388 j.u. FI/g białka). W przypadku pozostałych oznaczeń wykonanych w ramach charakterystyki białek stwierdzono, że największa zawartość dostępnych grup sulfhydrylowych (ok. 15 μ M -SH/g białka) i lizyny (151 j.u. FI) występowała także w białkach preparatu WPI 95, a najmniejsza w preparatach WPC 34 i WPC 60. Ilość dostępnych grup sulfhydrylowych i reszt lizyny w cząsteczkach białka ma wpływ na ich działanie przeciwutleniające, które związane jest z redukcją wolnych rodników poprzez oddanie labilnego atomu wodoru [11].

W zastosowanych warunkach oznaczenia badane preparaty białek serwatkowych nie wykazywały zdolności wiązania jonów żelaza – katalizatorów reakcji utleniania, mimo że rozdziały elektroforetyczne (rys. 1) preparatu WPI 95 wskazują na obecność laktoferyny, dobrego chelatora tych jonów.

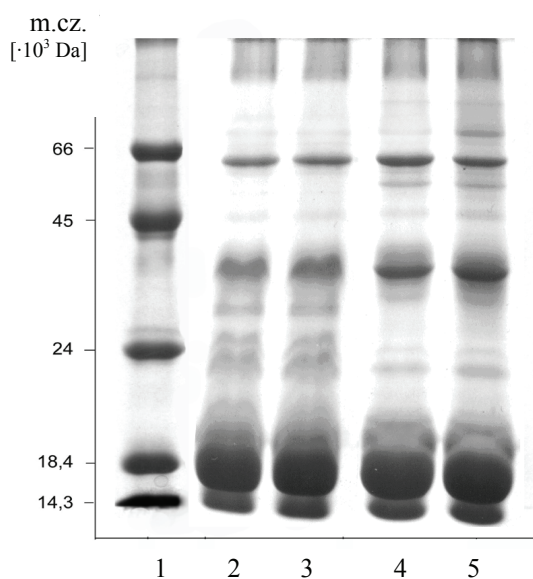
Rozdziały elektroforetyczne białek (rys. 1) wykazały, że wszystkie preparaty cechował podobny udział głównych frakcji - β -laktoglobuliny ($18 \cdot 10^3$ Da) i jej dimeru ($37 \cdot 10^3$ Da) oraz albuminy surowicy wołowej ($66 \cdot 10^3$ Da), ponadto w większości preparatów stwierdzono obecność frakcji o m. cz. $24 \cdot 10^3$ i $32 \cdot 10^3$ Da.

Tabela 2

Charakterystyka białek preparatów serwatkowych.
Profile of proteins of whey preparations.

Preparaty Preparations	Powierzchniowa hydrofobowość aromatyczna Surface aromatic hydrophobicity [j.u. FI/g białka]	Zawartość dostępnych grup tiolowych Content of available thiol groups [$\mu\text{mol -SH/g białka /}$ protein]	Intensywność fluorescencji lizyny Fluorescence intensity [j.u. FI]
WPC 34	$387,72 \pm 8,7$	nw*	$103,86 \pm 5,23$
WPC 60	$397,99 \pm 7,1$	$5,45 \pm 0,32$	$90,11 \pm 9,25$
WPC 80	$403,44 \pm 9,1$	$11,12 \pm 0,28$	$129,75 \pm 6,37$
WPI 95	$460,46 \pm 10,1$	$15,16 \pm 1,07$	$150,84 \pm 8,22$

nw* - nie wykazano / not detected



1 – marker; 2 – WPC 34; 3 – WPC 60; 4 – WPC 80; 5 – WPI 95.

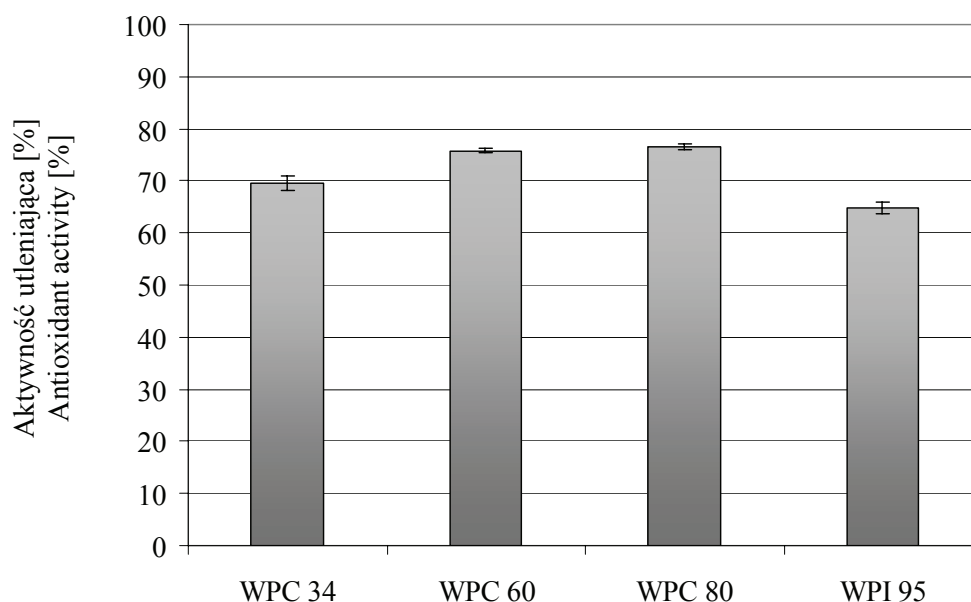
Rys. 1. Elektroforetyczny rozdział preparatów białek serwatkowych.

Fig. 1. Gel electrophoresis patterns of whey protein preparations.

Badane preparaty zawierały również frakcje wysokocząsteczkowe (m.in. immunoglobuliny), widoczne w górnej części żelu. Natomiast jedynie na elektroforogramie

preparatu WPI 95 zaobserwowano niewielką frakcję o m. cz. ok. $80 \cdot 10^3$ Da, którą zidentyfikowano jako laktoferynę [2].

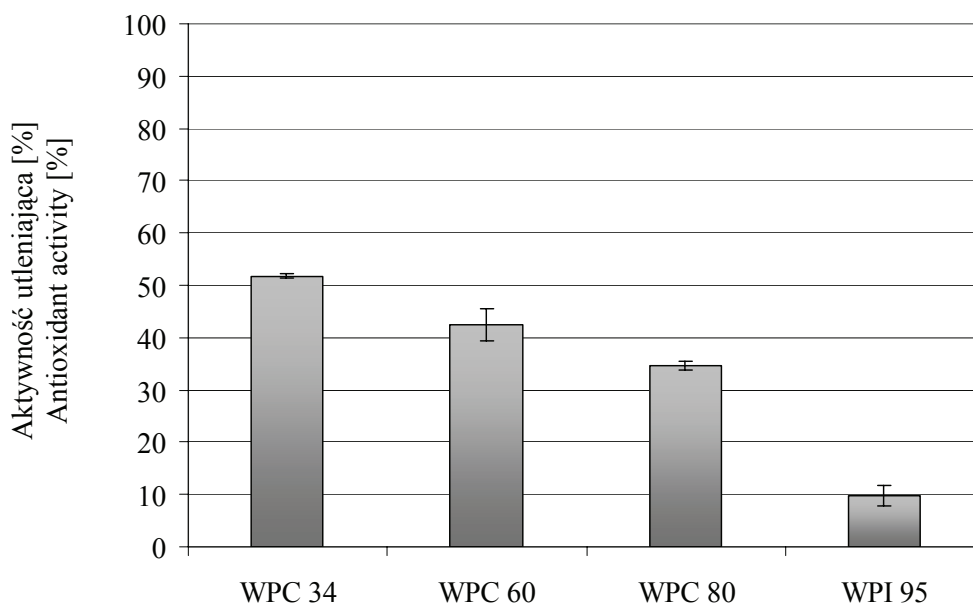
Wszystkie preparaty charakteryzowały się dobrą aktywnością przeciwutleniającą wobec syntetycznych kationorodników $ABTS^{\bullet+}$ (rys. 2). Najwyższa aktywność cechowała preparaty WPC 60 i WPC 80 - ok. 76%, co może wynikać z obecności w nich laktozy i jej wpływu na zmiany konformacyjne w białku [8], przyczyniające się do poprawy skuteczności dezaktywacji rodników. Słabsza aktywność preparatu WPI 95 (ok. 65%), pomimo większej zawartości dostępnych grup tiolowych, może świadczyć o tym, że grupy te są jedynie częściowo odpowiedzialne za działanie przeciwutleniające białek serwatkowych [15].



Rys. 2. Aktywność przeciwutleniająca preparatów białek serwatkowych wobec kationorodników $ABTS^{\bullet+}$.
Fig. 2. Antioxidant activity of whey protein preparations towards $ABTS^{\bullet+}$.

Aktywność przeciwutleniającą preparatów białek serwatkowych wobec nadtlenków kwasu linolowego przedstawiono na rys. 3. Najsłabsze działanie wobec nadtlenków kwasu linolowego podczas autooksydacji wykazał wysokobiałkowy preparat (WPI 95) - ok. 10%, w przypadku którego stwierdzono najwyższą powierzchniową hydrofobowość aromatyczną, mającą istotne znaczenie dla zahamowania tego procesu. Najlepszą zdolność do inhibicji reakcji utleniania emulsji kwasu linolowego wykazały natomiast preparaty - WPC 34 (52 %) i WPC 60 (42 %), które zawierały znacznie więcej laktozy od pozostałych, co może świadczyć o wpływie na działanie przeciwu-

tleniające również interakcji białek z sacharydami. Modyfikacja sacharydami głównego białka serwatkowego (β -laktoglobuliny) przyczynia się bowiem do poprawy jego właściwości emulgujących (mimo zmniejszenia się hydrofobowości cząsteczki), wynikających ze zwiększenia stabilności warstwy hydratacyjnej na granicy międzyfazowej [8].



Rys. 3. Aktywność przeciwutleniająca preparatów białek serwatkowych wobec nadtlenuków kwasu linolowego.

Fig. 3. Antioxidant activity of whey protein preparations towards the linoleic acid peroxides.

Wnioski

1. Preparaty białek serwatkowych wykazują dobre właściwości przeciwutleniające wobec kationorodników ABTS^{•+} oraz słabsze wobec nadtlenuków w emulsji kwasu linolowego.
2. Najlepszą aktywność przeciwutleniającą spośród badanych preparatów stwierdzono w przypadku WPC 34 i WPC 60, w których oprócz białek występuje w znacznych ilościach laktoza, co może świadczyć o wpływie na działanie przeciwutleniające również interakcji tych składników.

Praca była prezentowana podczas VI Konferencji Naukowej nt. „Nowoczesne metody analityczne w zapewnieniu jakości i bezpieczeństwa żywności”, Warszawa, 6 - 7 grudnia 2007 r.

Literatura

- [1] Boehlen, P., Stein, S., Dairman, W., Udenfriend, S.: Fluorometric assay of proteins in the nanogram range. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, **155**, 213-220.
- [2] Carbonaro M., Bonomi F., Iametti S., Cappelloni M., Carnovale E.: Aggregation of proteins in whey from raw and heat-processed milk: formation of soluble macro-aggregates and nutritional consequences. *Lebensm-Wiss.u.-Technol.*, 1998, **31**, 522–529.
- [3] Grabiński K., Przedpełski M.: Białka serwatkowe – zdrowie i funkcjonalność. *Przem. Spoż.*, 2004, **5**, 32.
- [4] Hayakawa S., Nakai S.: Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.*, 1985, **50**, 486-491.
- [5] Kuo J.M., Yeh D.B., SunPan B.: Rapid photometric assay evaluating activity in edible plant material, *J. Agric. Food Chemistry*, 1999, **47**, 3206-3209.
- [6] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- [7] Lai, L.-S., Chou, S.-T., Chao, W.-W.: Studies on the antioxidative activities of hsian-tiao (*Mesona procumbens Hems!*) leaf gum. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 963-968.
- [8] Leman J.: Struktura białka i jego właściwości funkcjonalne. *Przem. Spoż.*, 1988, **10**, 285-288.
- [9] Martinaud A., Mercier Y., Marinova P., Tassy C., Gatellier P., Renere M.: Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 2481-2487.
- [10] McCarthy T. L., Kerry J. P., Kerry J. F., Lynch P. B., Buckley D. J.: Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Sci.*, 2001, **57**, 45–52.
- [11] Okada Y., Okada M.: Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46(2)**, 401–406.
- [12] Pagliarini E., Iametti S., Peri C., Bonomi F.: An analytical approach to the evaluation of heat damage in commercial milks. *J. Dairy Sci.*, 1990, **73 (1)**, 41–44.
- [13] Re R., Pellergrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, **26**, 1231–1237.
- [14] Soyer, A., Hultin, H.O.: Kinetics of oxidation of the lipids and proteins of cod sarcoplasmic reticulum. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 2127-2134.
- [15] Tong L.M., Saski S., McClements D.J., Decker E.A.: Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey, *J. Agric. Food Chemistry*, 2000, **48**, 1473-1478.
- [16] Ulu H.: Effect of wheat flour, whey protein concentrate and soya protein isolate on oxidative processes and textural properties of cooked meatballs. *Food Chem.*, 2004, **87**, 523-529.
- [17] Yamamoto Y., Kataoka A., Kitora M.: Enhancing effect of β -lactoglobulin on the antioxidative activity of α -tocopherol in an emulsion of linoleic acid. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1998, **62 (10)**, 1912–1916.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COMMERCIAL PREPARATIONS OF WHEY PROTEINS**S u m m a r y**

In the study, the antioxidant properties were investigated of commercial preparations of whey proteins that varied in the contents of protein and lactose. Antioxidant activity of those preparations was determined towards the ABTS radical cations and the peroxides in the linoleic acid emulsion.

The determinations performed to characterize the proteins contained in the commercial preparations of whey proteins proved that the WPI 95 preparation was characterized by both the highest aromatic surface hydrophobicity and the highest contents of available groups of thiol and of lysine. All the preparations exhibited a high antiradical activity towards ABTS. The WPC 60 and WPC 80 preparations showed the most effective deactivation of the ABTS radicals (approx. 76 %), whereas the lowest – the WPI 95 preparation (approx. 65 %). Among the preparations investigated, the highest antioxidant activity towards the linoleic acid emulsion was found in the case of WPC 34 and WPC 60, in which, except for proteins, the lactose was present in high amounts. This may suggest the interaction of those components and their increased impact on antioxidant activity.

Key words: whey proteins, antioxidants, linoleic acid oxidation 