

MONIKA KARAŚ, ANNA JAKUBCZYK, EDYTA PACZOS-GRZĘDA

## WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCE HYDROLIZATÓW BIAŁEK Z ZIARNA UPRAWNYCH I DZIKICH GATUNKÓW OWSA (*AVENA L.*)

### Streszczenie

Owies i produkty owsiane są ważnym źródłem tłuszczów, błonnika pokarmowego, sacharydów, składników mineralnych, witamin oraz białka. Hydroliza enzymatyczna białek prowadzi do uwalniania peptydów, które mogą wykazywać różnorodną aktywność, w tym przeciwutleniającą. Przeprowadzone badania miały na celu określenie właściwości przeciwutleniających hydrolizatów białek owsa uzyskanych z 12 odmian (genotypów) uprawnych i dzikich heksa- i tetraploidalnych gatunków z rodzaju *Avena L.* Izolat białkowy (IBO9) otrzymany z ziaren dzikiej formy owsa należącej do gatunku *A. maroccana* CN 43136 charakteryzował się największą liczbą polimorficznych frakcji białkowych. Ponadto hydrolizat HBO9 otrzymany z białek ziaren owsa *A. maroccana* CN 43136 wykazywał najwyższą zdolność do neutralizacji wolnych rodników generowanych z ABTS (87,27 %) oraz DPPH (46 %). Natomiast największą zdolność do chelatowania jonów Fe (II) – 90,12 %, oznaczono w HBO7 (*A. sterilis* AVE 2116), forma dzika. Stwierdzono, że krzyżowanie międzygatunkowe podwyższa właściwości przeciwutleniające hydrolizatów białek owsa, a w konsekwencji korzystnie wpływa na właściwości prozdrowotne ziarna.

**Słowa kluczowe:** owies, izolaty białkowe, hydrolizaty białkowe, właściwości przeciwutleniające

### Wprowadzenie

Wzrost zainteresowania konsumentów produktami pochodzenia naturalnego, a w szczególności roślinnego, wpłynął na projektowanie nowych produktów spożywczych zawierających owies. Ziarniaki owsa (*Avena L.*) stanowią bogate źródło biologicznie aktywnych związków, takich jak: błonnik pokarmowy, oligosacharydy, aminokwasy, wielonienasycone kwasy tłuszczowe, witaminy, składniki mineralne oraz białka i peptydy o udowodnionych, korzystnych właściwościach prozdrowotnych [9]. Dieta bogata w produkty zawierające ziarno owsa może przyczynić się do obniżenia

---

*Dr M. Karaś, dr A. Jakubczyk, Katedra Biochemii i Chemii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, dr E. Paczos-Grzęda, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin*

nadmiernego poziomu cholesterolu w surowicy krwi [18], korzystnie oddziaływać w leczeniu cukrzycy, poprawiać perystaltykę jelit, sprawność psychofizyczną, wzmacniać odporność immunologiczną czy też niwelować niedobory białka [9].

Białka owsa różnią się w znacznym stopniu od białek innych zbóż. Dominującą frakcją stanowią w nich globuliny, których zawartość jest oceniana na około 50 - 80 % masy wszystkich białek, natomiast zawartość prolamin i glutelin wynosi 20 - 25 % [4].

Wykazano, że funkcjonalne i odżywcze właściwości białek żywności można poprawić na drodze enzymatycznej hydrolizy [2]. Ponadto, w wyniku procesu rozpadu białek otrzymuje się peptydy wykazujące różnorodną fizjologiczną aktywność w tym: antybakteryjną, przeciwnadciśnieniową, immunomodulacyjną, opioidową czy też przeciwutleniającą [13]. Dlatego też procesy enzymatycznej hydrolizy są wykorzystywane do produkcji preparatów i suplementów diety wykazujących pozytywny, ukierunkowany wpływ na organizm człowieka.

Wiele związków naturalnie występujących w żywności pochodzenia roślinnego wykazuje właściwości przeciwutleniające, należą do nich m.in. związki fenolowe, witaminy C i E oraz glutation [21, 29]. Jednak niewiele jest badań dotyczących potencjału antyoksydacyjnego izolatów i hydrolizatów białek owsa.

Celem niniejszej pracy było określenie potencjalnego wpływu krzyżowań międzygatunkowych na właściwości przeciwutleniające białek ziarna owsa oraz możliwości wykorzystania gatunków dzikich: *Avena maroccana*, *A. murphyi*, *A. fatua* i *A. sterilis* jako dawców genów odpowiedzialnych za poprawę tego parametru w odmianach owsa zwyczajnego. Genotypy reprezentujące wyżej wymienione gatunki dzikie (*A. maroccana*, *A. murphyi*, *A. fatua* i *A. sterilis*) są wykorzystywane w hodowli twórczej owsa, m.in. w celu zwiększenia zawartości białka i lipidów w ziarnie oraz poprawy odporności na choroby grzybowe [24, 25].

### **Materiał i metody badań**

Materiał doświadczalny stanowiły ziarniaki 12 genotypów owsa reprezentujących 5 gatunków z rodzaju *Avena* L.: trzy heksaploidalne: *A. sativa*, *A. fatua* i *A. sterilis* oraz dwa tetraploidalne: *A. maroccana* i *A. murphyi*. Ziarniaki badanych genotypów otrzymano w eksperymencie polowym, zlokalizowanym na poletkach Gospodarstwa Doświadczalnego UP w Lublinie, w Czesławicach koło Nałęczowa (tab. 1).

Doświadczenie przeprowadzono na glebie brunatnej wytworzonej z lessu zaliczanej do II klasy bonitacyjnej. Wiosną przeprowadzono bronowanie oraz zastosowano nawożenie mineralne w ilości 60 N kg·ha<sup>-1</sup>, 80 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg·ha<sup>-1</sup>, 100 K<sub>2</sub>O kg·ha<sup>-1</sup>. W dniu 12 kwietnia 2010 r. na poletka o długości i szerokości 1 metra ręcznie wysiano, w trzech powtórzeniach, po 100 ziarniaków owsa. Po zawiązaniu ziarniaków, na grupy wiech z form dzikich – osypujących, należących do gatunków *A. maroccana*, *A. murphyi*, *A. fatua* i *A. sterilis* nakładano izolatory z tomofanu w celu zapobieżenia

osypaniu kłosek lub ziarniaków. W fazie pełnej dojrzałości ziarniaków zebrano po 10 wiech z każdego poletka odmian *A. sativa* oraz izolatory z poletek form dzikich. Przygotowano zbiorcze próbki, reprezentatywne dla poszczególnych genotypów, a następnie ziarniaki owsa obłuszczano ręcznie, rozdrabniano w młynku laboratoryjnym WŻ-1 firmy ZBPP i przesiewano przy użyciu sita (595 µm). Tak przygotowane mąki używano do dalszych analiz.

Tabela 1

Charakterystyka analizowanych form owsa.  
Profile of oat forms analyzed.

Lp. No.	Gatunek Species	Odmiana Nr banku genów Cultivar Gene bank No.	Liczba chromosomów Number of chromosomes	Kraj pochodzenia Country of origin	Miejsce wyhodowania / bank genów Breeding place / gene bank
1.	<i>A. sativa</i>	Mostyn	42	Wlk. Brytania	WPBS, Aberystwyth
2.	<i>A. sativa</i>	Sprinter	42	Polska	HR Strzelce
3.	<i>A. sativa</i>	Rajtar	42	Polska	DANKO HR
4.	<i>A. fatua</i>	AVE270	42	Albania	IPK Gatersleben
5.	<i>A. fatua</i>	51601	42	Polska	KCRZG, IHAR Radzików
6.	<i>A. sterilis</i>	AVE 531	42	Włochy	IPK Gatersleben
7.	<i>A. sterilis</i>	AVE 2116	42	Liban	IPK Gatersleben
8.	<i>A. sterilis</i>	PI 378859	42	Izrael	NSGC-GRIN, Aberdeen
9.	<i>A. maroccana</i>	CN43136	28	Grecja	PGRC, Saskatoon, Kanada
10.	<i>A. maroccana</i>	52222	28	Maroko	KCRZG, IHAR, Radzików
11.	<i>A. murphyi</i>	CN21898	28	Hiszpania	PGRC, Saskatoon, Kanada
12.	<i>A. murphyi</i>	51843	28	Maroko	KCRZG, IHAR Radzików

Objaśnienia: / Explanatory notes:

WPBC – Welsh Plant Breeding Station; HR Strzelce – Hodowla Roślin Strzelce / Plant Breeding in Strzelce; Danko HR – Danko Hodowla Roślin w Choryni / Danko Plant Breeding in Choryń; IPK – Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research; KCRZG, IHAR – Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin / National Centre for Plant Genetic Resources: Polish Genebank; NSGC-GRIN – National Small Grain Collection, National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, USA; PGRC – Plant Gene Resources of Canada.

Endogenne proteazy ziarniaków owsa inaktywowano podczas 15-minutowego ogrzewania próbek mąki w temp. 100 °C zgodnie z metodą Karaś i wsp. [12].

*Otrzymywanie izolatów białek owsa (IBO<sub>1-12</sub>; liczby: 1-12 – zgodne z tab. 1)*

Do próbek mąki z ziarniaków owsa dodawano 0,2-procentowy roztwór NaOH w proporcji 1:10 (w/v) i prowadzono ekstrakcję w temp. pokojowej przez 1 h. Następnie ekstrakty odwirowywano (9000×g, 20 min, temp. 4 °C) i pH supernatantów doprowadzano do wartości 4,5 (strącanie w punkcie izoelektrycznym) przy użyciu 0,1 M roztworu HCl. Uzyskaną zawiesinę ponownie odwirowywano (9000×g, 20 min, temp. 4 °C). Otrzymane osady izolatów białkowych z ziarniaków owsa (IBO<sub>1-12</sub>) liofilizowano w liofilizatorze firmy Labconco i przechowywano w temp. 4 °C [28].

Następnie przeprowadzano elektroforetyczny rozdział izolatów IBO<sub>1-12</sub> techniką SDS-PAGE zgodnie z procedurą Laemmli [15]. Elektroforezę wykonywano w układzie dwufazowym: 4 % - żel zagęszczający, 12 % - żel rozdzielający o grubości 0,75 mm, w aparacie Mini-Protean, firmy Bio-Rad. Rozdział żelu zagęszczającego prowadzono przy natężeniu 5 mA, a żelu rozdzielającego – przy 10 mA. Po zakończeniu rozdziału białek, żel poliakrylamidowy barwiono za pomocą barwnika CBB R-250. Jako standard mas cząsteczkowych białek użyto Molecular Mass Standard, Fermentas, SM 1849 (116·10<sup>3</sup> Da – β-galaktozydaza, 66,2·10<sup>3</sup> Da – albumina wołowa, 45·10<sup>3</sup> Da – ovalbumina, 35·10<sup>3</sup> Da – dehydrogenaza mleczanowa, 25·10<sup>3</sup> Da – REase Bsp 98I, 18,4·10<sup>3</sup> Da – β-laktoglobulina, 14,4·10<sup>3</sup> Da – lizozym).

*Otrzymywanie hydrolizatów białek owsa (HBO<sub>1-12</sub>; liczby: 1-12 – zgodne z tab. 1)*

W celu otrzymania hydrolizatów białek owsa HBO<sub>1-12</sub> sporządzano 5 % (w/v) roztwory z uprzednio zliofilizowanych izolatów IBO<sub>1-12</sub> w 0,1M buforze boranowym pH 8. Następnie otrzymane roztwory izolatów białkowych poddawano 2-godzinnej hydrolizie z udziałem alkalazy z *Bacillus licheniformis* (2,4 U). Proces hydrolizy prowadzono w optymalnych warunkach temperatury i pH enzymu (t = 50 °C, pH 8). W trakcie procesu hydrolizy co 30 min pobierano próbki hydrolizatu w celu oznaczenia zawartości peptydów. Proces hydrolizy zatrzymywano przez 10 min przed termiczną inaktywacją proteaz w temp. 100 °C. W celu usunięcia nierozpuszczalnych fragmentów substratu i pozostałości enzymu, hydrolizat odwirowywano (9000×g, 20 min, temp. 4 °C) [23], a następnie supernatanty (HBO<sub>1-12</sub>) poddawano liofilizacji. W otrzymanych hydrolizatach HBO<sub>1-12</sub>, jak i w próbkach pobranych w trakcie trwania procesu hydrolizy (po 0, 30, 60, 90 i 120 min) oznaczano zawartość peptydów metodą z TNBS (kwasem 2, 4, 6- trinitrobenzenosulfonowym) zgodnie z metodą opisaną przez Adlera-Nissena [1]. Ponadto w hydrolizatach HBO<sub>1-12</sub> oznaczano właściwości przeciwutleniające: zdolność do neutralizacji wolnych rodników generowanych z DPPH (1,1-difenylo-2-picryl-hydrazyl) i ABTS (kwas 2,2'-azynobis-3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) [5, 22] oraz chelatowanie jonów Fe(II) przy stałym stężeniu peptydów – 1 mg/ml [7]. Aktywność przeciwrodnikową wobec ABTS<sup>+</sup> określano na podstawie oznaczonych spektrofotometrycznie zmian absorbancji (λ = 734 nm) rodnika ABTS wobec próbki zero-

wej zgodnie z metodą Re i wsp. [22]. Natomiast aktywność przeciwrodnikową wobec DPPH określano na podstawie oznaczonych spektrofotometrycznie zmian absorbancji ( $\lambda = 517$  nm) rodnika DPPH wobec próbki kontrolnej zgodnie z metodą Branda-Williams i wsp. [5].

Zarówno aktywność przeciwrodnikową hydrolizatów HBO<sub>1-12</sub> wobec ABTS<sup>+</sup>, jak i DPPH, wyrażoną jako procent neutralizowania wolnych rodników, obliczano z równania [10]:

$$\% = [1 - (A_p/A_k)] \times 100,$$

gdzie: A<sub>p</sub> – absorbancja próbki badanej, A<sub>k</sub> – absorbancja próbki kontrolnej.

Zdolność do chelatowania jonów Fe (II) oznaczano metodą spektrofotometryczną z użyciem ferrozyny zgodnie z metodą Deckera i Welcha [7]. Badanie zdolności do chelatowania jonów Fe (II) przez hydrolizaty HBO<sub>1-12</sub> wykonywano poprzez pomiar absorbancji barwnego kompleksu Fe (II) – ferrozyna po 10 min od dodania ferrozyny ( $\lambda = 562$  nm) wobec próbki kontrolnej.

Zdolność hydrolizatów HBO<sub>1-12</sub> do chelatowania jonów Fe (II) wyrażoną w [%] określano z równania [7]:

$$\% = [1 - (A_{562\text{próbki}}/A_{562\text{kontroli}})] \times 100$$

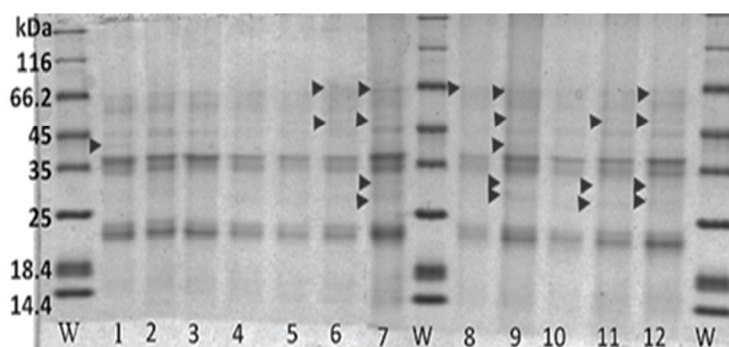
Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną wykonano z zastosowaniem programu STATISTICA 7.0. Do określenia istotności różnic pomiędzy średnimi grupowymi w układzie analizy wariancji zastosowano test post-hoc HSD Tukeya, przy poziomie istotności  $p = 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

Elektroforetyczny rozdział izolatów białkowych IBO<sub>1-12</sub>, z ziarna uprawnych i dzikich gatunków owsa (*Avena* L.) przedstawiono na rys. 1. Po przeanalizowaniu elektroforegramy IBO<sub>1-12</sub> stwierdzono znaczący udział frakcji białkowych o masie cząsteczkowej  $(16 - 23) \cdot 10^3$  Da oraz  $(35 - 38) \cdot 10^3$  Da we wszystkich badanych genotypach. Podobne wyniki uzyskali Liu i wsp. [17] w przypadku izolatów białek owsa odmiany Bayou, gdzie dominującymi frakcjami były białka o masie cząsteczkowej  $\sim 22 \cdot 10^3$  Da i  $\sim 36 \cdot 10^3$  Da.

Największa liczba polimorficznych frakcji białkowych wystąpiła w genotypie *A. maroccana* CN 43136 (IBO<sub>9</sub>). Kilka dodatkowych frakcji stwierdzono również w przypadku gatunku *A. sterilis* AVE 2116 (IBO<sub>7</sub>) oraz obu analizowanych genotypów *A. murphyi*: CN 21989 i 51843 (IBO<sub>11,12</sub>). Pojedyncze polimorficzne frakcje białek zidentyfikowano w genotypach: *A. sativa* Mostyn (IBO<sub>1</sub>) oraz *A. sterilis*: AVE 531 i PI378859 (IBO<sub>6,7</sub>). Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że zawartość polimorficznych frakcji białkowych jest największa w formach tetraploidalnych *A. maroccana* i *A. murphyi*, które reprezentują najstarsze ewolucyjnie gatunki. Tetraploidy z tej grupy

brały udział w ewolucji heksaploidów [14]. Zawartość frakcji polimorficznych jest również duża w najstarszym ewolucyjnie heksaploidzie – *A. sterilis* [11]. Uzyskane wyniki potwierdzają nie tylko wcześniejsze obserwacje owsa, ale i innych gatunków roślin uprawnych, dotyczące wpływu procesu udomowienia i selekcji hodowlanej na zawężenie puli genetycznej, zmniejszenie zróżnicowania genetycznego oraz utratę wielu alleli genów [20].



Objaśnienia: / Explanatory notes:

W – standard mas cząsteczkowych / molecular mass standard; 1-12 – izolaty białek owsa IBO<sub>1-12</sub> / 1-12 - oat protein isolates IBO<sub>1-12</sub>, liczby: 1-12 – zgodnie z tab. 1 / number: 1-12 – in accordance with Tab. 1; grotami strzałek zaznaczono prążki polimorficzne / arrowheads indicate polymorphic bands.

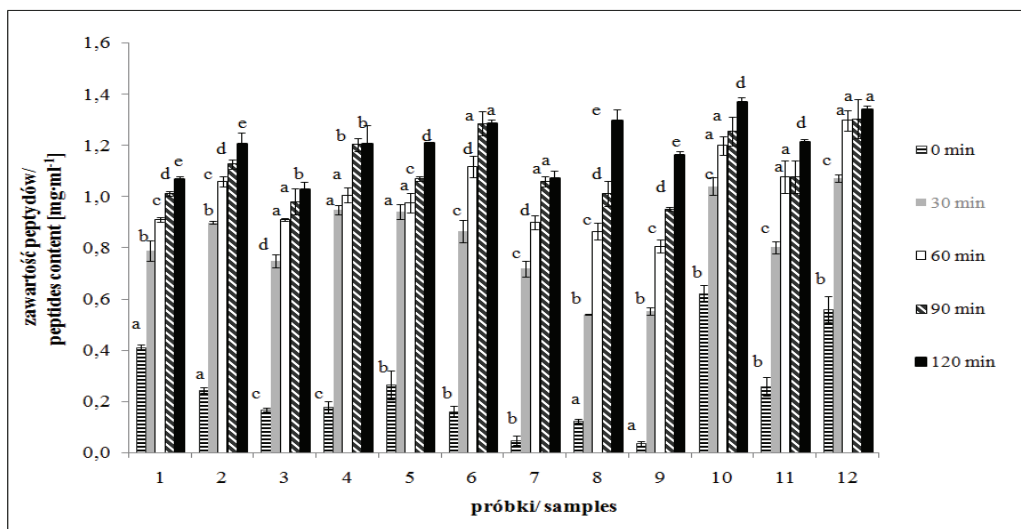
Rys. 1. Profile elektroforetyczne izolatów białkowych z ziarna badanych odmian owsa (IBO<sub>1-12</sub>).

Fig. 1. Electrophoretic profiles of protein isolates from oat grains (IBO<sub>1-12</sub>) studied.

W celu monitorowania przebiegu procesu hydrolizy białek owsa w ciągu 120 min próbki hydrolizatu pobierano co 30 min i oznaczano w nich zawartość peptydów. Po 120 min hydrolizy największą zawartością peptydów charakteryzowała się próbka HBO<sub>10</sub> (1,37 mg/ml), najmniejszą natomiast HBO<sub>3</sub> (1,03 mg/ml) (rys. 2). Różnice zawartości peptydów w hydrolizatach (HBO<sub>1-12</sub>) uwarunkowane są genotypem badanych ziarniaków. Podobnie Claver i Zhou [6] uzyskali wzrost zawartości peptydów w funkcji czasu reakcji, po hydrolizie odtłuszczonych izolatów białkowych kielków pszenicy alkalazą.

DPPH i ABTS jako stosunkowo stabilne rodniki są szeroko stosowane do badania zdolności przeciwrodnikowych różnorodnych związków i tym samym działających jako przeciwutleniacze. Rodnik DPPH był stosowany w pracy Tsopmo i wsp. [23] do oceny zdolności przeciwrodnikowych hydrolizatów białek owsa, otrzymanych w wyniku trawienia trypsyną (TPH) i alkalazą (APH). Hydrolizaty TPH i APH wykazywały podobną aktywność przeciwrodnikową wobec DPPH na poziomie około 30 %. Jamdar i wsp. [10] podają, że peptydy otrzymane w wyniku 2-godzinnej hydrolizy białek orze-

chów ziemnych alkalazą wykazywały 50 % inhibicji wolnych rodników generowanych z DPPH, przy stężeniu peptydów 2 mg/ml. Podobnie, hydrolizaty otrzymane z białek kielków pszenicy po trawieniu alkalazą wykazywały 50 % inhibicji wolnych rodników generowanych z DPPH, ale przy stężeniu peptydów wynoszącym 1,3 mg/ml [28]. Właściwości przeciwrodnikowe hydrolizatów białkowych ziarników owsa (HBO<sub>1-12</sub>) przedstawiono na rys. 3. Najwyższą zdolność do neutralizacji wolnych rodników generowanych z ABTS (87,27 %) i DPPH (46 %) wykazywał hydrolizat HBO<sub>9</sub> (*A. maroccana* CN 43136), najniższą natomiast HBO<sub>6</sub> (*A. sterilis* AVE 531) – 53,39 % wobec ABTS i 22,43 % wobec DPPH, przy stężeniu peptydów 1 mg/ml. Ponadto, hydrolizaty HBO<sub>1</sub> z HBO<sub>2</sub>, HBO<sub>5</sub> z HBO<sub>11</sub> oraz HBO<sub>7</sub> z HBO<sub>8</sub> wykazywały zbliżone, nieróżniące się statystycznie ( $p = 0,05$ ) właściwości przeciwrodnikowe wobec ABTS<sup>+</sup>. Podobnie hydrolizaty HBO<sub>2</sub> z HBO<sub>4</sub> i HBO<sub>5</sub> oraz HBO<sub>10</sub> z HBO<sub>6</sub> nie wykazywały statystycznie istotnych różnic ( $p = 0,05$ ) pod względem aktywności przeciwrodnikowej wobec DPPH. Otrzymane wyniki dowodzą, że potencjalnie większą aktywność przeciwrodnikową wykazują hydrolizaty otrzymane z ziarniaków dzikich odmian owsa zwłaszcza gatunki *A. sterilis* (AVE 2116 i PI 378859) i *A. maroccana* (CN 43136).

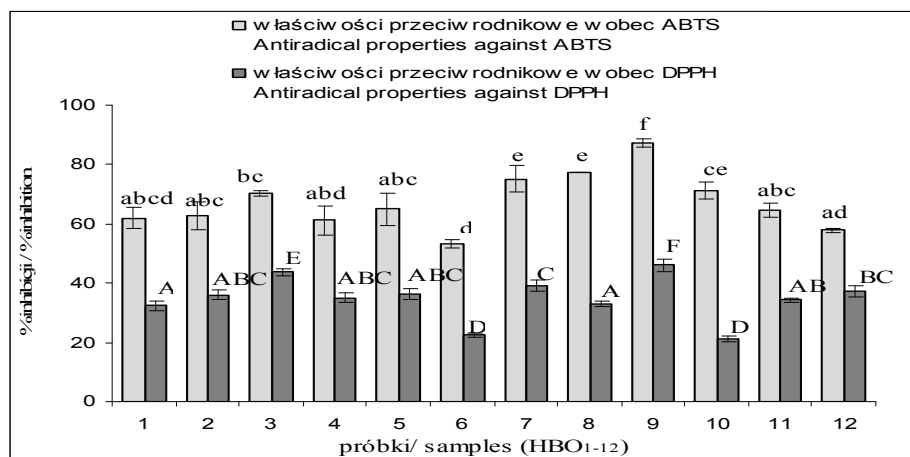


Objaśnienia: / Explanatory notes:

liczby: 1-12 – zgodnie z tab. 1 / numbers 1 to 12 – in accordance with Tab. 1; wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie na poziomie istotności  $p = 0,05$  w obrębie analizowanych form owsa / mean values denoted by the same letters do not differ statistically significantly at  $p = 0.05$  within the oat forms analysed.

Rys. 2. Zawartość peptydów w próbkach pobranych w ciągu 0, 30, 60, 90 i 120 min trwania procesu hydrolizy izolatów białkowych owsa.

Fig. 2. Content of peptides in samples taken during 0, 30, 60, 90 and 120 min. duration periods of hydrolysis process of oat protein isolates.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

liczby: 1-12 – zgodne z tab. 1 / numbers 1 to 12 according to Tab. 1; wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie przy poziomie istotności  $p = 0,05$  między analizowanymi formami owsa / mean values denoted by the same letters do not differ statistically significantly at  $p = 0.05$  among the oat forms analysed.

Rys. 3. Właściwości przeciwrodnikowe hydrolizatów białkowych z ziarna badanych odmian owsa.

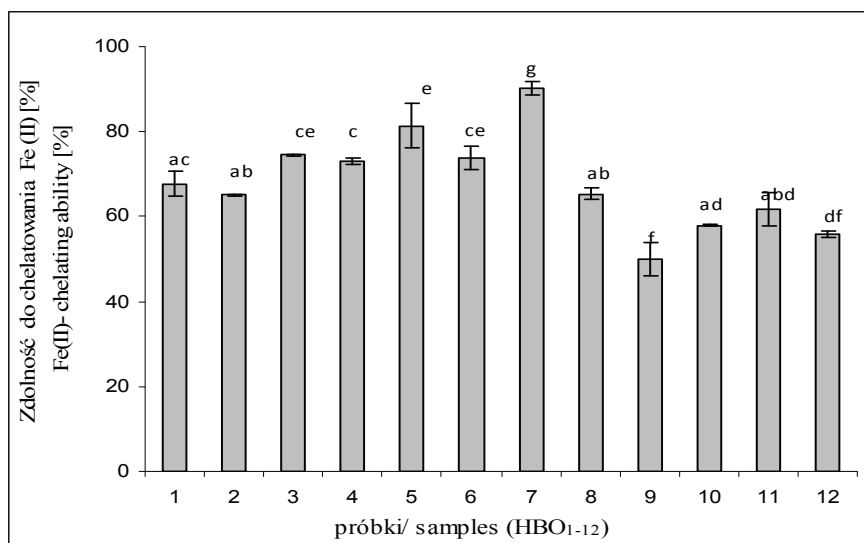
Fig. 3. Antiradical properties of oat grain protein hydrolysates of analysed genotypes.

Zastosowanie alkalazy w procesie hydrolizy białek ziarniaków owsa w badaniach własnych pozwoliło na uzyskanie hydrolizatów o przeciwutleniającym profilu peptydów. Alkalaza okazała się również skutecznym enzymem w procesie uwalniania bioaktywnych peptydów m.in. z białek: serwatki (54,2 % aktywności przeciwrodnikowej, przy stężeniu próbki 0,10 mg/ml), amarantusa (50 % inhibicji  $ABTS^{+}$  przy stężeniu próbki 1,44 mg/ml), jak i fasoli (73,4 - 99,9 % przy stężeniu próbki – 0,25 mg/ml) [8, 19, 26].

W niniejszej pracy aktywność przeciwrodnikowa hydrolizatów białkowych z ziarniaków owsa była wyższa w przypadku oznaczenia wykonanego metodą z ABTS aniżeli metodą z DPPH. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można wnioskować, że aktywność przeciwrodnikowa zarówno wobec  $ABTS^{+}$ , jak i DPPH jest uwarunkowana rodzajem rozpuszczalnika zastosowanego do przygotowania próbki. ABTS rozpuszcza się w roztworach wodnych, dlatego jest bardziej przydatny do oceny aktywności wodnych roztworów przeciwutleniacza, natomiast dużo wolniej może reagować z próbkami alkoholowymi. Wolne rodniki generowane z DPPH słabiej oddziałują z przeciwutleniaczami w roztworach wodnych, ponieważ DPPH jest bardziej reaktywny w roztworach alkoholowych, co m.in. potwierdziły badania przeprowadzone przez Branda-Williamsa i wsp. [5] oraz Awika i wsp. [3]. Właściwości prze-



ciwutleniające hydrolizatów białek wybranych genotypów owsa (HBO<sub>1-12</sub>) określano również jako zdolność do chelatowania jonów metali (rys. 4). Właściwości te oceniano poprzez monitorowanie tworzenia kompleksu pomiędzy ferrozyną a jonami Fe(II) w obecności hydrolizatów HBO<sub>1-12</sub>, otrzymanych w wyniku trawienia alkalazą białek ziarniaków owsa. W przypadku gdy związek ma właściwości chelatujące, tworzenie kompleksu (ferrozyna-Fe<sup>2+</sup>) przejawia się zanikiem czerwonej barwy, a to umożliwia oszacowanie zdolności hydrolizatów do chelatowania jonów Fe(II) [27].



Objaśnienia: / Explanatory notes:

liczby: 1-12 – zgodne z tab. 1 / numbers 1 to 12 according to Tab. 1; średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie przy poziomie istotności  $p = 0,05$  / mean values denoted by the same letters do not differ statistically significantly at  $p = 0.05$ .

Rys. 4. Zdolność do chelatowania jonów Fe(II) przez hydrolizaty białkowe z ziarna badanych genotypów owsa.

Fig. 4. Ferrous ion-chelating ability of protein hydrolysates prepared from analysed oat grains of genotypes analyzed.

Otrzymane wyniki wskazują, że spośród 12 przebadanych genotypów owsa najwyższą zdolnością do chelatowania jonów Fe(II) charakteryzowały się hydrolizaty: HBO<sub>7</sub> (*A. sterilis* AVE 2116) – 90,12 % i HBO<sub>5</sub> (*A. fatua* 51601) – 81,33 %, przy stężeniu peptydów 1 mg/ml. Natomiast hydrolizaty uzyskane w wyniku trawienia białek owsa gatunków *A. maroccana* (HBO<sub>9-10</sub>) i *A. murphyi* (HBO<sub>11-12</sub>) odznaczały się słabszymi zdolnościami do chelatowania jonów Fe(II) (50,07 - 61,75 %). Zhu i wsp. [28] wykazali, że hydrolizaty białek kielków pszenicy uzyskane w wyniku trawienia alkalazą również charakteryzują się silnymi zdolnościami do chelatowania jonów Fe(II) (89 %, przy stężeniu próbki 1 mg/ml). Jamdar i wsp. [10] uzyskali > 95 % zdolności do

chelatowania jonów Fe(II) przez hydrolizaty białek orzechów arachidowych, przy stężeniu próbki 0,16 mg/ml.

Zdolność hydrolizatów TPH i APH, otrzymanych w wyniku trawienia białek owsa odpowiednio trypsyną i alkalazą, do chelatowania jonów Fe(II) badali Tsopmo i wsp. [23]. Cytowani autorzy wykazali, że hydrolizat TPH charakteryzował się lepszymi właściwościami chelatującymi (43,8 %) niż hydrolizat APH (31,8 %).

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że gatunkami o największym potencjale przeciwutleniającym są *A. sterilis* i *A. maroccana*. Jednak transfer genów do form uprawnych łatwiejszy jest z *A. sterilis* aniżeli z *A. maroccana* [16]. Z tego względu identyfikację form gatunku charakteryzujących się najsilniejszymi właściwościami przeciwutleniającymi uzyskanych z nich hydrolizatów białkowych powinno się prowadzić wśród genotypów *A. sterilis*.

Krzyżowania międzygatunkowe wpływają korzystnie na właściwości przeciwutleniające hydrolizatów białek owsa, a w konsekwencji na właściwości prozdrowotne ziarna. Krzyżowania międzygatunkowe powinna jednak poprzedzać selekcja najlepszych genotypów w obrębie poszczególnych gatunków.

## Wnioski

1. Izolat białkowy otrzymany z ziaren dzikiej formy owsa *A. maroccana* CN 43136 charakteryzował się największą liczbą polimorficznych frakcji białkowych.
2. Hydrolizaty białek owsa wykazują zróżnicowane właściwości przeciwutleniające, zależnie od gatunku i odmiany.
3. Hydrolizaty białkowe uzyskane z ziarniaków dzikich odmian owsa, należących do gatunków *A. sterilis* i *A. maroccana*, charakteryzują się wyższą aktywnością przeciwrodnikową w porównaniu z odmianami gatunku *A. sativa*.
4. Hydrolizaty białkowe uzyskane z ziarniaków dzikich odmian owsa, należących do gatunków *A. sterilis* i *A. fatua*, charakteryzują się wyższą zdolnością do chelatowania jonów Fe(II) niż odmiany gatunku *A. sativa*.

## Literatura

- [1] Adler-Nissen J.: Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenosulfonic acid. J. Agric. Food Chem., 1979, **27**, 1256-1262.
- [2] Aluko R.E., Monu E.: Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. J. Food Sci., 2003, **68** (4), 1254-1258.
- [3] Awika J., Rooney L.W., Wu X., Prior R., Cisneros-Zevallos L.: Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. J. Agric. Food Chem., 2003, **51**, 6657-6662.
- [4] Bartnikowska E., Lange E., Rakowska M.: Ziarno owsa – niedocenione źródło składników odżywczych i biologicznie czynnych. Cz. I. Ogólna charakterystyka owsa. Białka, tłuszcze. Biul. Inst. Hod. i Aklim. Roślin, 2000, **215**, 209-221.

- [5] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. -Technol.*, 1995, **28**, 25-30.
- [6] Claver I.P., Zhou H.: Enzymatic hydrolysis of defatted wheat germ by proteases and the effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *J. Food Biochem.*, 2005, **29**, 13-26.
- [7] Decker E., Welch B.: Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, **38**, 674.
- [8] Dryáková A., Pihlanto A., Marnila P., Čurda L., Korhonen H.J.T.: Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *Eur. Food Res. Technol.*, 2010, **230**, 865-874.
- [9] Gibiński M., Gumul D., Korus J.: Prozdrowotne właściwości owsa i produktów owsianych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **4 (45) Supl.**, 49-60.
- [10] Jamdar S.N., Rajalakshmi V., Pednekar M.D., Juan F., Yardi V., Sharma A.: Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysates. *Food Chem.*, 2010, **121 (1)**, 178-184.
- [11] Jellen E.N., Phillips R.L.: C-banded karyotypes and polymorphisms in hexaploid oat accessions (*Avena ssp.*) using Wright's stain. *Genome*, 1993, **36**, 1129-1137.
- [12] Karaś M., Jakubczyk A., Baraniak B.: Antiradical and antihypertensive activity of peptides obtained from proteins pea sprouts (*pisum sativum*) by enzymatic hydrolysis. *Annales UMCS, Sectio DDD, Pharmacia*, 2010, **23 (3)**, 115-121.
- [13] Korhonen H., Pihlanto A.: Food-derived bioactive peptides – opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.*, 2003, **9 (16)**, 1297-1308.
- [14] Ladizinsky G.: Cytogenetic relationships between *A. insularis* (2n=28) and both *A. strigosa* (2n=14) and *A. murphyi* (2n=28). *Genet. Res. Crop Evol.*, 1999, **46**, 501-04.
- [15] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227 (5259)**, 680-685.
- [16] Leggett J.M.: Classification and speciation in *Avena*. In: *Oat science and technology*. Ed. S. Segoe. American Society of Agronomy. Agronomy Monograph No. 33, Madison, WI, USA, 1992, pp. 29-52.
- [17] Liu G., Li J., Shi K., Wang S., Chen J., Liu Y., Huang Q.: Composition, secondary structure, and self-assembly of oat protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57 (11)**, 4552-4558.
- [18] Naumann E., van Rees A.B., Öning G., Öste R., Wydra M., Mensink R.P.:  $\beta$ -glucan incorporated into a fruit drink effectively lowers serum LDL-cholesterol concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2006, **83**, 601-605.
- [19] Orsini Delgado M.C., Tironi V. A., Añón M. C.: Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT - Food Sci. Technol.*, 2011, **44**, 1752-1760.
- [20] Paczos-Grzęda E.: Pedigree, RAPD and simplified AFLP-based assessment of genetic relationships among *Avena sativa* L. cultivars. *Euphytica*, 2004, **138**, 13-22.
- [21] Peterson D.M.: Oat antioxidants. *J. Cereal Sci.*, 2001, **33 (2)**, 115-129.
- [22] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26 (9-10)**, 1231-1237.
- [23] Tsopmo A., Cooper A., Jodayree S.: Enzymatic hydrolysis of oat flour protein isolates to enhance antioxidative properties. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, 2010, **2 (4)**, 206-212.
- [24] Welch R.W., Brown J.C.W., Leggett J.M.: Interspecific and intraspecific variation in grain and groat characteristics of wild oat (*Avena*) species: very high groat (1,3),(1,4)- $\beta$ -D-glucan in an *Avena atlantica* genotype. *J. Cereal Sci.*, 2000, **31**, 273-279.

- [25] Welch R.W., Legget J.M.: Nitrogen content, oil content, oil composition of oat cultivars (*A. sativa*) and wild Avena species in relation to nitrogen fertility, yield and partitioning of assimilates. J. Cereal Sci., 1997, **26**, 105-120.
- [26] Valdez-Ortiz A., Fuentes-Gutiérrez C.I., Germán-Báez L.J., Gutiérrez-Dorado R., Medina-Godoy S.: Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. LWT - Food Sci. Technol., 2012, **46**, 91-96.
- [27] Yamaguchi F., Ariga T., Yoshimira Y., Nakazawa H.: Antioxidant and antiglycation of carcinol from *Garcinia indica* fruit rind. J. Agric. Food Chem., 2000, **48**, 180-185.
- [28] Zhu K., Zhou H., Qian H.: Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. Process Biochem., 2006, **41** (6), 1296-1302.
- [29] Zieliński H., Achremowicz B., Przygodzka M.: Przeciwiutleniacze ziarniaków zbóż. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2012, **1** (80), 5-26.

### ANTIOXIDANT PROPERTIES OF PROTEIN HYDROLYSATES (*AVENA* L.) FROM GRAINS OF CULTIVATED AND WILD OAT SPECIES

#### S u m m a r y

Oatmeal and oat products are an important source of fat, dietary fibre, carbohydrates, mineral compounds, vitamins, and, first of all, proteins. Enzymatic hydrolysis of proteins leads to the release of peptides, which may show various activities including antioxidant activity. The objective of the research study performed was to determine the antioxidant properties of oat protein hydrolysates obtained from the 12 varieties (genotypes) of cultivated and wild hexa- and tetraploid species of the *Avena* L genus. The protein isolate (IBO<sub>9</sub>) obtained from grains of the *A. maroccana* CN 43136 wild oats was characterised by the highest number of polymorphic protein fractions. Furthermore, the HBO<sub>9</sub> hydrolysate obtained from proteins contained in the grains of the *A. maroccana* CN 43136 oats showed the highest ability to neutralize free radicals generated from ABTS and DPPH: 87.27 % and 46 %, respectively. On the other hand, the highest ability to chelate iron (II) - 90.12 % was determined for wild HBO<sub>7</sub> (*A. sterilis* AVE 2116). It was confirmed that the inter-specific crosses increased the antioxidant properties of oat protein hydrolysates and, thus, beneficially impacted the pro-health properties of grains.

**Key words:** oat, protein isolates, protein hydrolysates, antioxidant properties 