

RAFAŁ WOŁOSIAK, ELWIRA WOROBIEJ

AKTYWNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA IZOLATU I HYDROLIZATÓW BIAŁEK GROCHU

Streszczenie

W pracy badano przeciwutleniające właściwości izolatu i hydrolizatów białek grochu. Stwierdzono, że białka te posiadają właściwość hamowania reakcji utleniania kwasu linolowego, która rośnie w wyniku hydrolizy enzymatycznej. W obrazach elektroforetycznych obserwowano wyraźne różnice w składzie frakcji hydrolizatów. Nie stwierdzono natomiast jednoznacznego wpływu powierzchniowej hydrofobowości aromatycznej na aktywność antyoksydacyjną.

Wstęp

Utlenianie nienasyconych kwasów powoduje pogorszenie jakości żywności. Zapobiec temu można przez zastosowanie syntetycznych przeciwutleniaczy: BHT i BHA. Użycie ich jest ograniczone ze względu na toksyczność [8]. Uwaga wielu ośrodków naukowych zwrócona jest na wprowadzenie naturalnych związków obecnych w roślinach, jako antyoksydantów [12, 13, 14, 16]. Wśród tych związków wykazano również antyoksydacyjne właściwości białek. Pomimo, że doniesienia z tego zakresu znane już były w latach siedemdziesiątych [10], to dopiero początek lat dziewięćdziesiątych przyniósł więcej publikacji opisujących właściwości przeciwutleniające białek [1, 2, 3, 4, 15]. Oprócz białek badano również preparaty otrzymane w wyniku ich hydrolizy proteinazami [3, 10]. Doniesienia o właściwościach antyoksydacyjnych białek podawane w literaturze dotyczą głównie roślin nie uprawianych na dużą skalę w naszym kraju. Dlatego w pracy podjęto badania nad preparatami białkowymi z nasion grochu.

Materiał i metody

Materiałem wyjściowym do doświadczeń była mąka otrzymana z obłuszczonego nasion grochu odmiany Poa. Nasiona pochodziły ze stacji hodowlanej IHAR w Radzi-

kwie. Do badań stosowano izolat białek grochu uzyskany przez wytrącenie białek w punkcie izoelektrycznym (pH 4,3) z alkalicznych ekstraktów mąki (pH 9,2). Z otrzymanych izolatów przygotowywano hydrolizaty. Białka izolatów hydrolizowano pepsyną (890 j./mg białka, Sigma P-7000) oraz proteinazą N (7,3 j./mg, Fluka 82458). W celu ustalenia optymalnych warunków hydrolizy przeprowadzono wstępne badania, w których stosowano różne czasy, a proces śledzono ilością uwolnionego azotu alfa-aminowego [6].

Izolaty hydrolizowano pepsyną przez 1 i 6 godzin, w dalszej części pracy oznaczono je symbolami, odpowiednio, PHP-1 i PHP-6. Natomiast hydrolizę proteinazą N prowadzono 0,5, 1 i 5 godzin i oznakowano symbolami, odpowiednio, PHN-0,5, PHN-1 i PHN-5.

W otrzymanych preparatach białkowych oznaczano azot, powierzchnię hydrofobowość aromatyczną z kwasem 8-anilino-1-naftaleno-sulfonowym [9, 7] oraz prowadzono elektroforetyczne rozdziały białek na 12,5% żelach poliakrylamidowych z SDS [11].

Właściwości antyoksydacyjne izolatu i hydrolizatów białka grochu oznaczano wobec kwasu linolowego (Sigma L-1268). Reakcję utleniania kwasu linolowego prowadzono w 60°C, w termostacie (Mettler), przez okres 29 dni. Do termostatowanych próbek kwasu linolowego dodawano preparaty białkowe w ilości 220 ppm. Próbką odniesienia był kwas linolowy bez dodatku preparatów. We wstępnych doświadczeniach ustalono dawki preparatów znoszących powstawanie nadtlenków. Proces utleniania śledzono metodą z tiocyanianem żelaza [1]. Pomiarów dokonywano na spektrofotometrze Novaspec II firmy Pharmacia LKB przy 500 nm.

Z otrzymanych wyników obliczano względną aktywność antyoksydacyjną wg wzoru:

$$A_a [\%] = \frac{A_w - A_p}{A_w} \times 100,$$

gdzie A_w - absorbanca próbki odniesienia

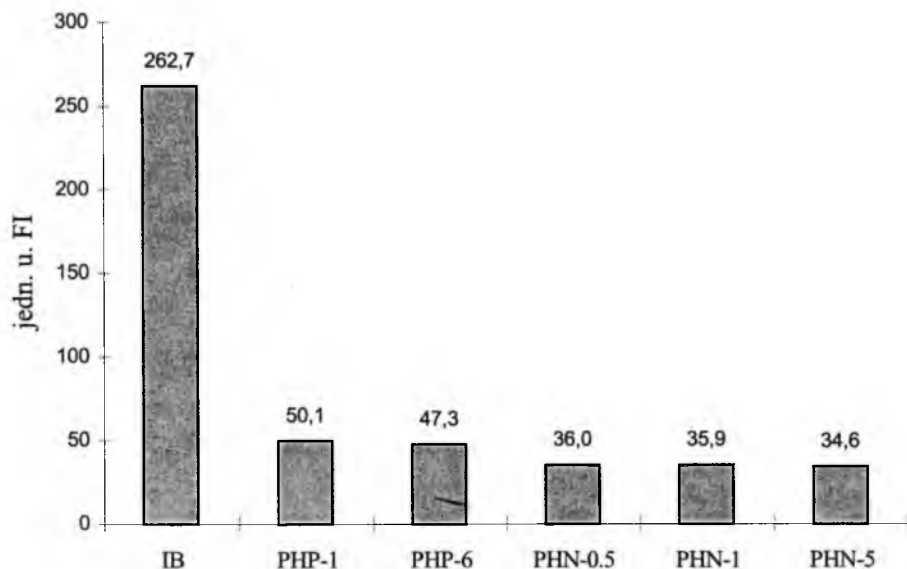
A_p - absorbanca próbki z preparatem białkowym.

Wyniki i ich omówienie

Przed przystąpieniem do określenia antyoksydacyjnych właściwości izolatu i hydrolizatów białkowych otrzymanych z grochu dokonano ich charakterystyki. Oznaczono zawartość białka, hydrofobowość aromatyczną i poddano rozdziałom elektroforetycznym.

Na podstawie badań wykazano, że zawartość białka w izolacie wynosiła 90,1%, w hydrolizatach była niższa i mieściła się w granicach 62-63% dla PHP i 72-73% dla PHN, tak więc czas hydrolizy nie wpływał na tę zależność, a jedynie zastosowany enzym.

Uwagę zwraca różnica pomiędzy powierzchniową hydrofobowością aromatyczną izolatu i hydrolizatów (rys. 1). Hydroliza przy użyciu pepsyny powodowała ponad pięciokrotne obniżenie wartości notowanych w izolacie, a hydroliza proteinazą N około 7,5 krotne. Wyniki te świadczą, że w izolacie jest większa ekspozycja aminokwasów aromatycznych na powierzchni białek niż w hydrolizatach.



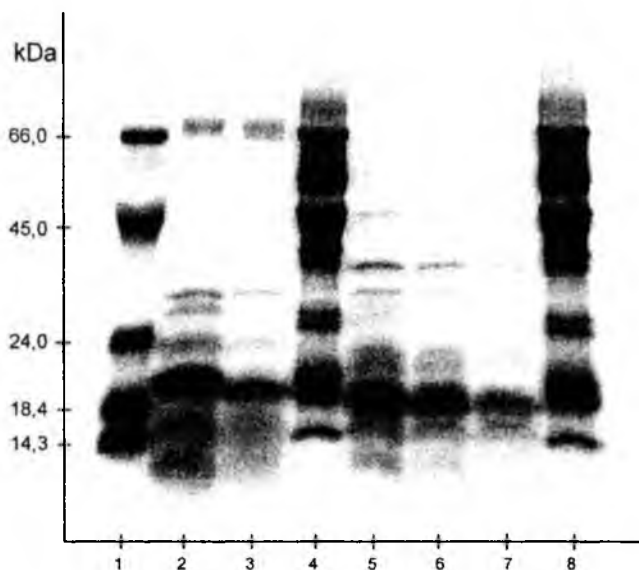
Rys. 1. Powierzchniowa hydrofobowość aromatyczna izolatu i hydrolizatów białka grochu.

Fig. 1. Surface aromatic hydrophobicity of pea protein isolate and hydrolysates.

W rozdzielach elektroforetycznych (rys. 2) widoczna jest wyraźna różnica pomiędzy hydrolizatami uzyskanymi z trawienia pepsyną i proteinazą N. Pepsyna w większym stopniu spowodowała hydrolizę frakcji białkowych izolatu o ciężarach cząsteczkowych powyżej 40 kDa w porównaniu z proteinazą N, pozostawiając jedynie ślady podjednostki o ciężarze 66 kDa.

Utlenianie kwasu linolowego z dodatkiem preparatów jako antyoksydantów oraz bez ich dodatku przedstawiono na rys. 3. i 4. Proces utleniania kwasu ma charakter krzywej Gaussa. Maksimum propagacji tworzenia nadtlenuków przypadało pomiędzy 4 a 10 dniem doświadczenia. Widać wyraźne zahamowanie procesu utleniania kwasu linolowego przez preparaty białka grochu. Izolat białkowy wykazał nieco niższe

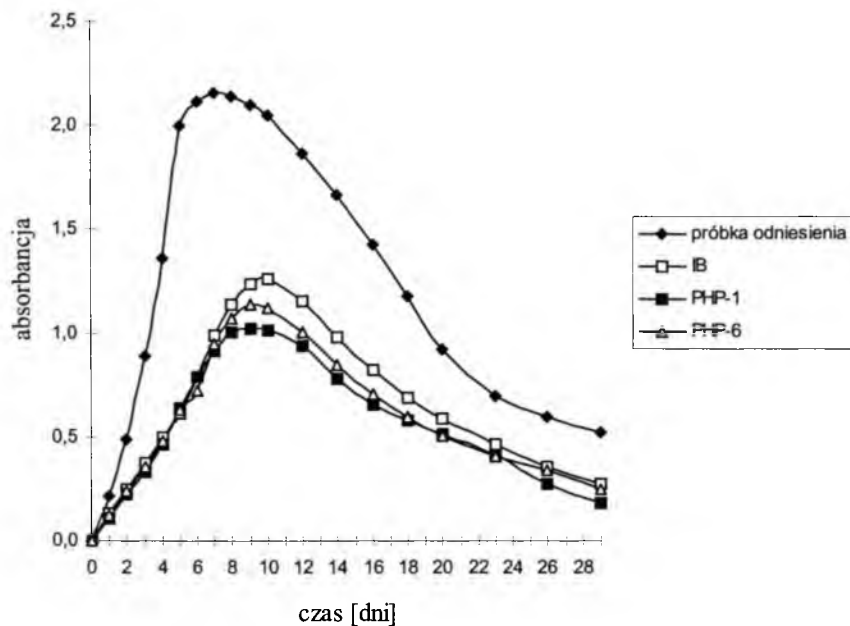
właściwości przeciwutleniające w porównaniu z hydrolizatami. Obliczona z otrzymanych pomiarów spektrofotometrycznych aktywność antyoksydacyjna najwyższe wartości osiągnęła w 5 dniu doświadczeń. Efektywniej działały PHN w porównaniu z PHP. Maksymalna wartość aktywności względnej dla PHN zawarta była w granicach 74-76%, a dla PHP wynosiła 68%. Zastosowane zróżnicowane czasy hydrolizy nie znalazły prawie żadnego odbicia we właściwościach antyoksydacyjnych preparatów. Obserwowane duże różnice w powierzchniowej hydrofobowości aromatycznej pomiędzy izolatami białkowym, a hydrolizatami nie znalazły również odbicia we właściwościach antyoksydacyjnych. Wprawdzie Chen i wsp. [3] wykazali, że hydrolizaty białek soi miały większą aktywność niż izolaty, to jednak zależność ta nie była znacząca. W literaturze zwrócona jest uwaga również na to, że udział poszczególnych aminokwasów oraz ich sekwencja w peptydach ma znaczący wpływ na właściwości antyoksydacyjne [4]. Szczególną rolę przypisuje się histydynie i prolinie [4, 5].



Rys. 2. Rozdział elektroforetyczny preparatów białkowych na 12,5 % żelu poliakrylamidowym z SDS (1: marker, 2: PHP-1, 3: PHP-6, 4: IB, 5: PHN-0.5, 6: PHN-1, 7: PHN-5, 8: IB).

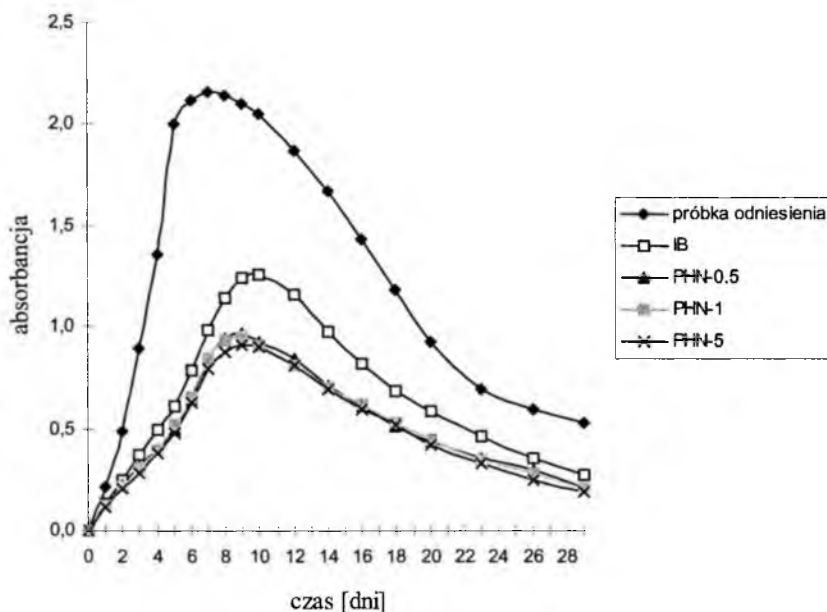
Fig. 2. 12.5% SDS – polyacrylamide gel electrophoresis of pea protein preparations (1: Dalton marker, 2: PHP-1, 3: PHP-6, 4: IB, 5: PHN-0.5, 6: PHN-1, 7: PHN-5, 8: IB).

Na podstawie rozdziałów elektroforetycznych można przypuszczać, że niskocząsteczkowe frakcje białkowe powstające w wyniku hydrolizy proteinazą N podjednostek o ciężarach cząsteczkowych 40-66 kDa mogą wpływać na lepsze właściwości antyoksydacyjne PHN w porównaniu z PHP.



Rys. 3. Wpływ dodatku izolatu i hydrolizatów pepsynowych na utlenianie kwasu linolowego.

Fig. 3. Effects of protein isolate and pepsin hydrolysates addition on linoleic acid oxidation.



Rys. 4. Wpływ dodatku izolatu i hydrolizatów N-proteazowych na utlenianie kwasu linolowego.

Fig. 4. Effects of protein isolate and proteinase N hydrolysates addition on linoleic acid oxidation.

Wnioski

1. Białka grochu obniżają tworzenie nadtlenków podczas utleniania kwasu linolowego.
2. Aktywność antyoksydacyjna białek wzrasta po hydrolizie enzymatycznej.

LITERATURA

- [1] Alaiz, M., Zamora, R., Hidalgo, F.J.: Addition of oxidized lipid/amino acid reaction products delays the peroxidation initiated in a soybean oil. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 2698-2701.
- [2] Carbonaro, M., Virgili, F., Carnovale, E.: Evidence for protein-tannin interaction in legumes: implications in the antioxidant properties of Faba bean tannins. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **29**, 1996, 743-750.
- [3] Chen, H-M., Muramoto, K., Yamauchi, F.: Structural analysis of antioxydative peptides from soybean beta-conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 574-578.
- [4] Chen, H-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihara, K.: Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1996, 2619-2623.
- [5] Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K.: Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 49-53.
- [6] Church, F.C. Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L.: Spectrophotometric assay using *o*-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.*, **66**, 1983, 1219-1227.
- [7] DiLollo, A., Alli, I., Biliaderis, C., Barthakur, N.: Thermal and surface active properties of citric acid-extracted and alkali-extracted proteins from *Phaseolus* beans. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1993, 24-29.
- [8] Ford, S.M., Hook, J.B., Bond, J.T.: The effects of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on renal function in the rat. II. Effects on organic acid and base transport. *Fd Cosmet. Toxicol.*, **18**, 1980, 21-26.
- [9] Hayakawa, S., Nakai, S.: Relationship of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.*, **50**, 1985, 486-491.
- [10] Hayes, R.E., Bookwalter, G.N., Bagley, E.B.: Antioxidant activity of soybean flour and derivatives - a review. *J. Food Sci.*, **42**, 1977, 1527-1532.
- [11] Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, **227**, 1970, 680-685.
- [12] Larson, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**, 1988, 969-978.
- [13] Pietta, P., Simonetti, P., Mauri, P.: Antioxidant activity of selected medicinal plants. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 4487-4490.
- [14] Wang, H., Cao, G., Prior, R.L.: Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1996, 701-705.
- [15] Wu, S.Y., Brewer, M.S.: Soy protein isolate antioxidant effect on lipid peroxidation of ground beef and microsomal lipids. *J. Food Sci.*, **59**, 1994, 702-706.
- [16] Yen, G.-C., Chen, H-Y.: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 27-32.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PEA PROTEIN ISOLATE AND HYDROLYSATES**S u m m a r y**

Antioxidant properties of pea protein isolate and hydrolysates have been investigated. Pea protein has an ability to decrease the number of hydroperoxides during oxidation of linoleic acid, which ability is increased after enzymatic hydrolysis. Differences in hydrolysates composition were observed on electroforetic patterns. No significant influence of aromatic hydrophobicity on antioxidative activity was confirmed. ✕