

DARIUSZ KOWALCZYK, BARBARA BARANIAK

WPŁYW CHEMICZNEJ MODYFIKACJI I METODY KOAGULACJI BIAŁEK NASION SOCZEWICY I WYKI NA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWIUTLENIAJĄCE OTRZYMANYCH HYDROLIZATÓW

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu acetylacji na właściwości przeciwutleniające preparatów hydrolizowanych białek roślinnych pochodzących z dwóch źródeł botanicznych, różniących się dodatkowo sposobem koagulacji.

Białka nasion soczewicy i wyki poddano chemicznej modyfikacji za pomocą bezwodnika kwasu octowego, a następnie wytrącono z zawiesiny koloidalnej, stosując jako czynniki koagulujące: kwas solny, oraz polielektrolity Magnafloc LT22S (kationowy) i Magnafloc LT27 (anionowy). Uzyskane preparaty białkowe hydrolizowano przy użyciu trypsyny i liofilizowano. Z hydrolizatów ekstrahowano wolne aminokwasy oraz peptydy, a następnie metodą neutralizacji trwałych rodników 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH[·]) określono ich aktywność przeciwutleniającą.

Wykazano, że produkty hydrolizy białek analizowanych nasion roślin strączkowych charakteryzują się dobrą zdolnością neutralizacji rodnika DPPH[·]. Zastosowana modyfikacja, jak i metody wytrącania białek, w niewielkim stopniu wpłynęły na badane właściwości. Efekt przeciwutleniający wyrażony jako procent inhibicji inaktywowanych rodników wyniósł 59,7 i 53,4%, odpowiednio dla hydrolizatów białek wyki i soczewicy, niepoddanych chemicznej modyfikacji (kontrolnych), koagulowanych wyłącznie kwasem solnym. Hydrolizaty białka acetylowanego wykazały maksymalnie o 4% (soczewica) i 3% (wyka) wyższą zdolność neutralizacji wolnych rodników w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Użycie wielkocząsteczkowych polielektrolitów jako czynników flokulacyjno-koagulujących również wpłynęło na kilkuprocentowy wzrost badanych właściwości, przy czym aglomeracja białka z udziałem flokulanta LT-22S spowodowała większy wzrost aktywności przeciwutleniającej aniżeli z flokulantem LT-27. Głównymi czynnikami determinującymi zdolność neutralizowania rodnika DPPH[·] były gatunek surowca roślinnego, z którego otrzymano preparat białkowy, a także czas reakcji z rodnikami.

Słowa kluczowe: hydrolizaty białek nasion soczewicy i wyki, właściwości przeciwutleniające, acetylacja, polielektrolity

Wprowadzenie

Jednym ze skutecznych sposobów ochrony żywności przed utlenianiem jest dodatek przeciwutleniaczy [2]. W technologii żywności często wykorzystywane są substancje o strukturze fenolowej [24]. Tymczasem właściwości przeciwutleniające mają również związki aminowe, jak: aminokwasy, naturalne peptydy [27] oraz białka i

ich hydrolizaty [18, 19, 23, 26]. Hydrolizaty białkowe są powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym jako stymulatory smakowo-zapachowe, dodatki zwiększające wartość odżywczą oraz polepszające właściwości teksturalne produktów [12]. Pomimo udokumentowanego działania przeciwutleniającego hydrolizaty nie są prawnie uznane za przeciwutleniacze. Można jednak przypuszczać, że pełnią taką funkcję w produktach z ich udziałem, co potwierdzają badania przeprowadzone na modelowej żywności [18, 19]. Analizowanie przydatności różnorodnych surowców białkowych oraz modyfikacja procesu pozyskiwania hydrolizatów stanowią kierunki badań mające na celu zwiększenie aktywności tych potencjalnych przeciwutleniaczy. Dotychczasowe doniesienia w niewielkim stopniu dotyczą możliwości zmiany potencjału przeciwutleniającego na etapie preparacji białka, dlatego też zagadnienie to stanowi przedmiot niniejszej pracy.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu acetylacji na aktywność przeciwutleniającą preparatów hydrolizowanych białek nasion soczewicy i wyki, różniących się dodatkowo sposobem koagulacji.

Materiał i metody badań

Surowcem wyjściowym były rozdrobnione na mąkę nasiona soczewicy (odm. Anita) i wyki (odm. Kwarta), z których na drodze alkalicznej ekstrakcji (pH~9,2), a następnie koagulacji kwasowej oraz flokulacyjno-kwasowej otrzymano preparaty białkowe. W obydwu metodach koagulacji precypitację białek prowadzono 2M HCl, uzyskując w ekstraktach z mąki soczewicy pH 3,6, a wyki pH 4,0. W przypadku koagulacji flokulacyjno-kwasowej białka dodatkowo aglomerowano poprzez zastosowanie flokulantów. Wykorzystano w tym celu polielektrolity Magnafloc LT-22S (kationowy) i Magnafloc LT-27 (anionowy), które wprowadzano w ilości 30 mg/dm³ ekstraktu, przed obniżeniem pH. Roztwory flokulantów przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta (Ciba Specialty Chemicals Corporation).

Preparaty białek chemicznie modyfikowanych uzyskano acetylując białka w czasie ich ekstrakcji. Proces prowadzono poprzez dodanie bezwodnika kwasu octowego w ilości 0,2 cm³ na 1 g białka zawartego w mące. Modyfikacja trwała 1 godz. w temp. 20°C, przy pH 7,5–8,0. Z otrzymanych preparatów przygotowano hydrolizaty. Białka hydrolizowano trypsyną (1240 j./mg, Sigma T-4799; stosunek enzym/substrat 1: 850) przez 3 godz., w temp. 37°C i pH = 7,5. Po odwirowaniu nierozpuszczalnej frakcji od produktów hydrolizy uzyskany supernatant poddawano liofilizacji. Wolne aminokwasy i peptydy ekstrahowano z liofilizatu 1-procentowym kwasem trichlorooctowym. W ekstraktach oznaczano właściwości przeciwutleniające metodą neutralizacji trwałych rodników 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH[•]) wg zmodyfikowanej procedury Brand-Williamsa i wsp. [8]. Pomiary absorbancji (515 nm, Lambda 40 UV-Vis, Perkin-Elmer) wykonywano co 30 min przez 5 godz. Aktywność przeciwutleniającą, wyrażoną jako % inhibicji, obliczano z następującego równania:

$$\text{Inhibicja [\%]} = [(A_k - A_{p(t)})/A_k] \times 100$$

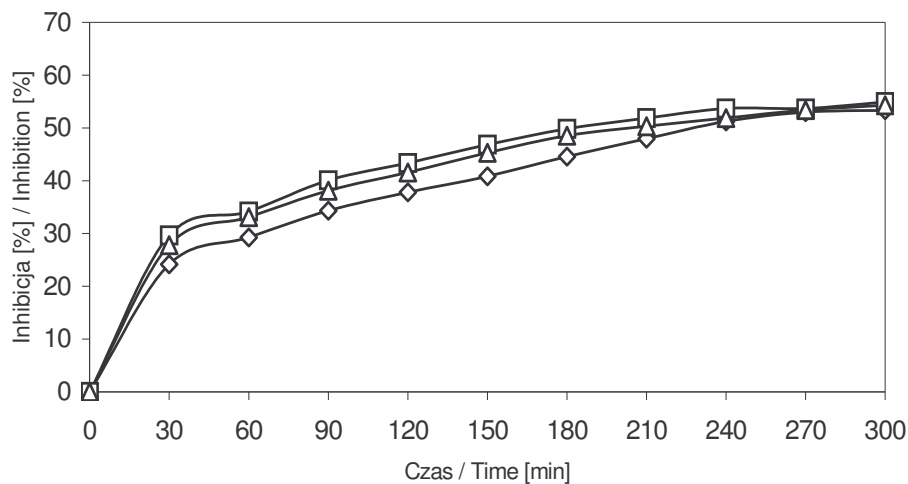
gdzie: A_k – absorbancja próbki kontrolnej, $A_{p(t)}$ – absorbancja próbki z badanym ekstraktem, zmierzona w czasie t .

Oznaczenia aktywności przeciwutleniającej wykonano w trzech powtórzeniach, a uzyskane wyniki uśredniono.

Wyniki i dyskusja

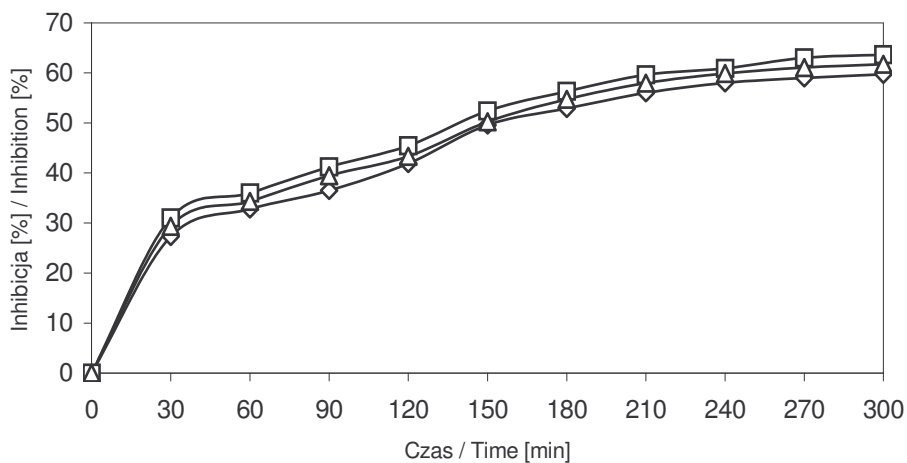
Przebieg neutralizacji rodników DPPH \cdot przez produkty hydrolizy białka nasion soczewicy i wyki przedstawiono na rys. 1. i 2. Wszystkie analizowane hydrolizaty wykazywały wzrost zdolności inaktywowania DPPH \cdot wraz z wydłużaniem czasu reakcji. Największy przyrost inhibicji zaobserwowano po pierwszych 30 min inkubacji, natomiast stabilizacja inhibicji nastąpiła po ok. 5 godz. Po tym czasie efekt przeciwutleniający hydrolizatów białek wyki i soczewicy, koagulowanych wyłącznie kwasem solnym, wyniósł odpowiednio 59,7 i 53,4% (rys. 3). Uzyskany rezultat świadczy o obecności w hydrolizatach substancji, które są donorami atomu wodoru [16]. Mają one zatem potencjalną zdolność przekształcania rodników do bardziej stabilnych produktów, a tym samym przerywania łańcuchowej reakcji utleniania.

Możliwość reagowania produktów hydrolizy białka z wolnymi rodnikami potwierdzają badania wielu autorów [9, 10,14, 21, 26], chociaż wartości liczbowe efektów przeciwutleniających trudno jest porównywać, gdyż różnicuje je zarówno rodzaj analizowanego surowca, jak i zastosowane metody analityczne. Wykorzystując metodę z DPPH \cdot właściwości takie wykazali m.in. Wu i wsp. [26], badając hydrolizat białka makreli. Stwierdzili oni zdolność neutralizowania rodników DPPH \cdot przez ekstrakt zawierający mieszaninę aminokwasów i peptydów o masie cząsteczkowej 1400 Da. Jao i Ko [14], stosując zróżnicowany czas proteolizy, uzyskali hydrolizat z białkowych odpadów tuńczyka, który wykazał zdolność inaktywacji rodników DPPH \cdot na poziomie 82%, po 30 min reakcji. Suetsuna i wsp. [21] wyizolowali z hydrolizatu kazeiny mleka peptyd o sekwencji aminokwasów Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu wykazujący zdolność wiązania wolnych rodników zarówno w teście z DPPH \cdot , jaki i z naturalnie występującymi rodnikami: $^1O_2\cdot$ i $\cdot OH$. Z kolei Chen i wsp. [9] poddali ocenie syntetycznie otrzymane peptydy, bazujące na sekwencji naturalnego peptydu Leu-Leu-Pro-His-His, wyodrębnionego z hydrolizatu białka soi. Peptydy te w niewielkim stopniu inaktywowały wolne rodniki DPPH \cdot i $^1O_2\cdot$ pomimo, że wykazały dobrą aktywność przeciwutleniającą wyrażającą się zahamowaniem utleniania kwasu linolowego i chelatowaniem jonów Cu^{+2} i Zn^{+2} . Potwierdziło to, że peptydy działają nie tylko jako przeciwutleniacze pierwszorzędowe, ale za ich właściwości przeciwutleniające odpowiedzialne są również inne mechanizmy.



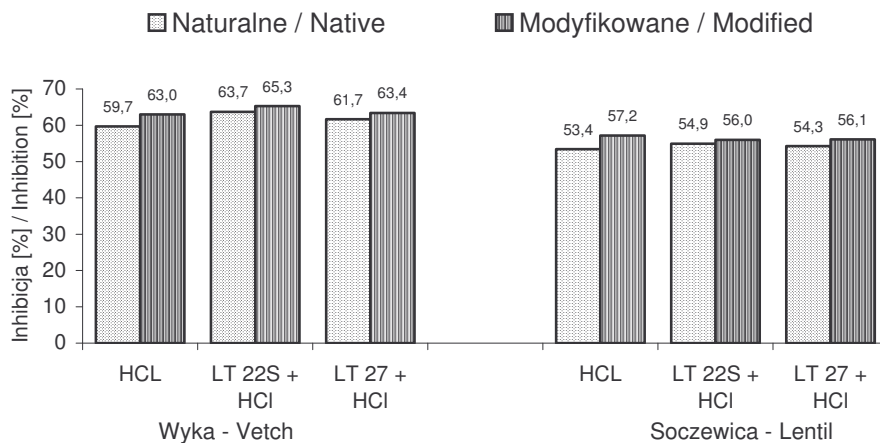
Rys. 1. Przebieg neutralizacji rodników DPPH[•] przez produkty hydrolizy białka wydzielonego z nasion soczewicy, po koagulacji różnymi metodami: HCl (◇), Magnafloc LT 22S + HCl (□), Magnafloc LT 27 + HCl (△).

Fig. 1. The course of DPPH[•] radicals scavenged by protein hydrolysates produced from lentil seeds, after the coagulation performed using various methods: HCl (◇), Magnafloc LT 22S + HCl (□), Magnafloc LT 27 + HCl (△).



Rys. 2. Przebieg neutralizacji rodników DPPH[•] przez produkty hydrolizy białka wydzielonego z nasion wyki, po koagulacji różnymi metodami: HCl (◇), Magnafloc LT 22S + HCl (□), Magnafloc LT 27 + HCl (△).

Fig. 2. The course of DPPH[•] radical scavenged by protein hydrolysates produced from vetch seeds, after the coagulation performed using various methods: HCl (◇), Magnafloc LT 22S + HCl (□), Magnafloc LT 27 + HCl (△).



Rys. 3. Aktywność przeciwutleniająca produktów hydrolizy białek naturalnych i chemicznie modyfikowanych, koagulowanych różnymi metodami, po 5 godz. inkubacji z DPPH[·]

Fig. 3. The antioxidant activity of native, hydrolyzed proteins and chemically modified proteins that were precipitated using various methods, 5 h after the incubation with DPPH[·]

Udowodniono, że metoda użyta do koagulacji białka różnicuje chemiczny skład i właściwości funkcjonalne preparatów białkowych [6, 11]. Wyniki niniejszej pracy wskazują, że sposób wytrącania białek decyduje również o ich potencjale przeciwutleniającym, co już zostało udokumentowane we wcześniejszych badaniach [3]. W prezentowanej pracy zarówno w przypadku hydrolizatów białka nasion soczewicy, jak i wyki, wykorzystanie polielektrolitów Magnafloc, jako czynników współstrącających, spowodowało nieznaczny przyrost zdolności neutralizowania rodników DPPH[·]. Koagulacja z udziałem flokulanta LT-22S dała większy wzrost właściwości przeciwutleniającej aniżeli z flokulantem LT-27. Różnice w aktywności przeciwutleniającej produktów hydrolizy białka wytrąconego różnymi metodami należy przypuszczalnie wiązać z faktem, że czynniki zastosowane do koagulacji różnicują skład frakcji białkowych. O efekcie takim informowali Baraniak i wsp. [4]. Również profil aminokwasowy uzależniony jest od metod stosowanych zarówno w procesie ekstrakcji, jak i koagulacji preparatów białkowych [5, 11, 17, 20]. Uważa się, że udział poszczególnych aminokwasów, a także ich kolejność, znacząco wpływa na przeciwutleniającą efektywność peptydów. Szczególną rolę przypisuje się obecności histydyny [9, 10], która została rozpoznana jako najefektywniejszy z aminokwasów neutralizujących IO₂ [25].

Zastosowana w niniejszej pracy acylacja białka przy użyciu bezwodnika kwasu octowego (acetylacja) jest jedną z metod kształtowania właściwości funkcjonalnych białek [4, 13, 15]. Acylacja poprzez zmiany sił elektrostatycznego przyciągania i odpychania łańcuchów polipeptydowych powoduje zmiany konformacji cząsteczek białka [7]. Jak wskazuje Achouri i Zhang [1], wpływa to na podatność białka na hydrolizę i tym samym ilościowe oraz jakościowe różnice hydrolizatów. Faktem tym

można tłumaczyć uzyskaną wyższą zdolność neutralizacji rodników DPPH[·] przez produkty hydrolizy białka modyfikowanego w porównaniu z próbkami niemodyfikowanymi (kontrolnymi) (rys. 3). Zmiany konformacyjne mogą dotyczyć także acetylowanych peptydów. Pomimo, że zależność właściwości przeciwutleniających od trójwymiarowej struktury peptydów nie była określana, taką możliwość rozważali Chen i wsp. [10]. Badacze zasugerowali, że różne aktywności analizowanych przez nich syntetycznych peptydów zawierających histydyne mogły być spowodowane przestrzennie ułatwionym lub utrudnionym dostępem do pierścienia imidazolowego tego aminokwasu. Znaczne zróżnicowanie aktywności przeciwutleniającej dwóch syntetycznie uzyskanych tripeptydów, z których jeden zawierał L-histydyne, a drugi D-histydyne wykazało wpływ konfiguracji przestrzennej na testowane właściwości [10].

Wyniki zaprezentowanej pracy i cytowanych autorów świadczą o różnorodności czynników, które decydują o zdolnościach przeciwutleniających otrzymywanych hydrolizatów białkowych, a więc o ich technologicznym zastosowaniu oraz potencjalnym oddziaływaniu na organizm człowieka. Niektóre bowiem z aktywnych dipeptydów, wytworzonych podczas hydrolizy w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, mogą być absorbowane w przewodzie pokarmowym przez dipeptydowy transporter jelitowy i wchłaniane w nienaruszonej postaci [22]. A zatem mogą one przyczyniać się do zwiększenia fizjologicznej obrony organizmu w walce ze stresem oksydacyjnym.

Wnioski

1. Metoda wytrącania preparatów, podobnie jak acetylacja białek nasion soczewicy i wyki, w niewielkim stopniu zwiększa właściwości przeciwutleniające ich hydrolizatów.
2. Głównym czynnikiem różnicującym zdolność neutralizowania rodników DPPH[·] jest gatunek surowca, z którego otrzymano preparat białkowy.
3. Zdolność neutralizowania rodnika DPPH[·] przez produkty hydrolizy analizowanych białek wzrasta wraz z wydłużaniem czasu reakcji, osiągając maksimum po 5 godz. inkubacji. Wysoki przyrost aktywności przeciwutleniającej, zaobserwowany po pierwszych 30 min reakcji, świadczy o obecności w hydrolizatach związków charakteryzujących się dobrą skutecznością przeciwutleniającą.

Pracę wykonano w ramach PBZ/KBN/021/P06/99 finansowanego przez KBN w latach 2001-2004.

Literatura

- [1] Achouri A., Zhang W.: Effect of succinylation on the physicochemical properties of soy protein hydrolysate. *Food Res. Inter.*, 2001, **34**, 507-514.
- [2] Ball S.: *Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka*. Oficyna Wyd. Medyk. Warszawa 2001.
- [3] Baraniak B., Karaś M.: Antioxidative properties of chloroplast concentrates obtained by various methods from lucerne juice. *J. Anim. Feed Sci.*, 2000, **9**, 397-405.
- [4] Baraniak B., Niezabitowska M., Pielecki J., Wójcik W.: Evaluation of usefulness of Magnafloc M-22S flocculant in the process of obtaining protein concentrates from peas. *Food Chem.*, 2004, **85**, 251-257.
- [5] Baraniak B., Niezabitowska M., Porzucek H.: Zawartość białka ogółem, inhibitorów trypsyny i stachiozy w preparatach białkowych uzyskiwanych z mąki grochu za pomocą różnych metod koagulacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **3** (40), 87-97.
- [6] Baraniak B.: Skład chemiczny i właściwości funkcjonalne koncentratów białkowych otrzymanych z soku liści słonecznika. *Rocz. Nauk Rol.*, 1992, **B-108** (1/2), 103-112.
- [7] Belitz H.D., Grosch W.: *Food Chemistry*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg 1999.
- [8] Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 1995, **28**, 25-30.
- [9] 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.*, 1998, **46**, 49-53.
- [10] Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K.: Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 2619-2623.
- [11] Fernández-Qurmtela A., Macarulla M.T., Del Barrio A.S., Martínez J.A.: Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plants Foods Human Nutr.*, 1997, **51**, 331-342.
- [12] Flaczyk E.: Zalety technologiczne i żywieniowe hydrolizatów białkowych. *Cz.2. Przem. Spoż.*, 1997, **51** (4), 43-45.
- [13] Franzen L.K., Kinsella J.E.: Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *J. Agric. Food Chem.*, 1976, **24**, 788-795.
- [14] Jao C.L., Ko W.C.: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Sci.*, 2002, **68**, 430-435.
- [15] Kabirullah M., Wills R.B.H.: Functional properties of acetylated and succinylated sunflower protein isolate. *J. Food Technol.*, 1982, **17**, 235-249.
- [16] Molyneux P.: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 2004, **26** (2), 211-219.
- [17] Mwasaru M.A., Muhammad K., Bakar J., Che Man Y.B.: Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. *Food Chem.*, 1999, **67**, 435-443.
- [18] Peña-Ramos E.A., Xiong Y.L.: Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Sci.*, 2003, **64**, 259-263.
- [19] Sakanaka S., Tachibana Y., Ishihara N., Juneja L.R.: Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chem.*, 2004, **86**, 99-103.
- [20] Soetrisno U.S.S., Holmes Z.A.: Protein yields and characteristics from acid and salt coagulations yellow pea (*Pisum sativum* L. *Miranda*) flour extractions. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 970-974.
- [21] Suetsuna K., Ukeda H., Ochi H.: Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.*, 2000, **11**, 128-131.

- [22] Thwaites D.T., Hirst B.H., Simons N.L.: Direct assessment of dipeptide/H⁺ symport in intact human intestinal (Caco-2) epithelium: A novel method utilising continuous intra-cellular pH measurement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **194**, 432-438.
- [23] Tong L. M., Sasaki S., McClements D. J., Decker E. A.: Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *J. Food Sci.*, 2000, **65**, 1325-1329.
- [24] Uchman W. (red): *Substancje dodatkowe w przetwórstwie mięsa*. Wyd. AR. Poznań 2001.
- [25] Wade A.M., Tucker H.N.: Antioxidant characteristics of L-histidine. *J. Nutr. Biochem.*, 1998, **9**, 308-315.
- [26] Wu H.C., Chen H.M., Shiau C.Y.: Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Inter.*, 2003, **36**, 949-957.
- [27] Wu H.C., Shiay C.Y., Chen H.M., Chiou T.K. Antioxidant activities of carnosine, anserine and some free amino acids and their synergistic effects in combination. *J. Food Drug Analysis*, 2003, **11**, 148-153.

THE EFFECT OF CHEMICAL MODIFICATION OF LENTILS AND VETCH SEEDS PROTEINS AND OF A METHOD OF THEIR COAGULATION ON ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF HYDROLYSATES OBTAINED

S u m m a r y

The purpose of this study was to determine the effect of acetylation on the antioxidant activity of preparations of hydrolyzed plant proteins originating from two botanical sources; additionally, the preparations investigated differ in the method of their coagulation. Lentil and vetch seeds proteins were chemically modified with acetic anhydride, and precipitated using various coagulation agents such as: hydrochloric acid and polyelectrolytes (a cationic 'Magnafloc LT-22S' and an anionic 'Magnafloc LT-27'). The protein preparations produced were hydrolyzed with trypsin, and lyophilised during a process of enzymatic hydrolysis. From the hydrolysates, free amino acids and peptides were extracted, and, next, their antioxidant activity was determined using a method of scavenging 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals.

The study showed that the hydrolysis products of proteins contained in the leguminous plants under analysis are characterized by a good ability to quench a DPPH radical. Both the modification performed and the methods of proteins coagulation impacted, to a very small degree, the properties under investigated. The anti-oxidative effect expressed as a per cent inhibition rate of inactivated radicals was 59.7 and 53.4% for the hydrolysates of vetch and lentil proteins, respectively, which were not treated chemically (control hydrolysates) and coagulated using only the hydrochloric acid. If compared to control samples, the hydrolysates obtained from acetylated proteins showed a higher ability to scavenge free radicals: as for lentils, this ability was by maximum 4% higher, and as for vetch – by 3% at the most. When high-molecular polyelectrolytes were applied as flocculation-coagulation agents, the properties under investigations increased by several per cent, and the proteins agglomeration, containing a flocculant 'Magnafloc LT-22S', caused a higher rise in the antioxidative activity compared to the effect achieved with the flocculant 'Magnafloc LT-27'. The key factors determining the scavenging effect of the DPPH radical were: type of the plant species from which the protein preparation was produced, and, the time of reaction with radicals.

Key words: protein hydrolysates of lentil and vetch seeds, antioxidant activity, acetylation, polyelectrolytes ☒