

ELWIRA WOROBIJ

ZMIANY WIELKOŚCI MAS CZĄSTECZKOWYCH BIAŁEK PREPARATÓW Z NASION ROŚLIN STRĄCZKOWYCH POD WPLYWEM RODNIKÓW HYDROKSYLOWYCH

Streszczenie

W pracy określano zmiany zachodzące w białkach preparatów nasion bobu, grochu i fasoli poddanych działaniu rodników hydroksylowych. Rozdziały przeprowadzone metodą SE-HPLC wykazały, że białka badanych gatunków nasion roślin strączkowych zachowują się odmiennie pod wpływem tych rodników. W białkach preparatów bobu i grochu $\cdot\text{OH}$ spowodowały przyrost frakcji wysokocząsteczkowej (330-400 kDa), wynikający z rozkładu i polimeryzacji podjednostek niskocząsteczkowych. Natomiast główna frakcja białek fasoli (7S) ulegała częściowej fragmentacji pod wpływem $\cdot\text{OH}$.

Wstęp

Wolne rodniki (np. $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$) oraz inne aktywne formy tlenu ($^1\text{O}_2$, H_2O_2) wywołują szereg niekorzystnych zmian w żywności, przyczyniają się do pogorszenia jej jakości żywieniowej i sensorycznej.

W przemyśle spożywczym procesom utleniania zapobiega się powszechnie przez stosowanie przeciwutleniaczy. Dużą wagę przywiązuje się ostatnio do przeciwutleniających właściwości białek [7, 8, 12]. Badania przeprowadzone na białkach nasion roślin strączkowych wykazały ich wysoką aktywność antyrodnikową [1, 3, 4, 9].

Należy jednak również zwrócić uwagę na fakt, że białka biorąc udział w zmiataniu wolnych rodników same ulegają zmianom – następuje fragmentacja i tworzenie polimerów [6, 7], zostaje też obniżona ich strawność [10]. Produkty powstałe pod wpływem rodników nie są wykorzystywane przy syntezie białka [11].

Celem pracy było określenie zmian zachodzących w białkach preparatów otrzymanych z nasion bobu, grochu i fasoli pod wpływem działania rodników hydroksylo- wych.

Materiał i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły obłuszczone i zmielone nasiona bobu odmiany *Bartom*, grochu odmiany *Poa*, fasoli białej odmian *Piękny Jaś Tyczny* i *Prosna* oraz fasoli kolorowej: brązowej odmiany *Nida*, czarnej odmiany *Green Mung* i czerwonej odmiany *Red Kidney*.

Badania prowadzono na preparatach białkowych otrzymanych w procesie izolacji w punkcie izoelektrycznym z alkalicznych ekstraktów mąki. Oczyszczoną globulinę 7S z nasion fasoli uzyskano we Francji w Laboratorium Technologii i Biochemii Białek (INRA, Nantes).

Preparaty białkowe [5 mg białka/ml] inkubowano w 37°C przez 24 godz., w mieszaninie generującej wolne rodniki hydroksylo- we, zawierającej H_2O_2/Cu^{2+} w buforze fosforanowym o pH 7,2. Próbką odniesienia były preparaty nie poddane działaniu rodników hydroksylo- wych.

Do określenia zmian wielkości mas cząsteczkowych białek preparatów pod wpływem rodników hydroksylo- wych stosowano metodę SE-HPLC. Rozdziały białek wykonywano na kolumnie TSK G2000SW LKB (0,75 x 60 cm), a ich detekcję prowadzono przy 280 nm (detektor UV SPD-6A Shimadzu). Do elucji używano bufor fosforanowy (0,1 M; pH 7,0) i NaCl (0,5M) o przepływie 0,5 ml/min. Na kolumnę nanoszono 20 μ l przesączonej (filtr Supelco) próbki. Do kalibracji kolumny wykorzystano wzorce mas cząsteczkowych (firmy Pierce): cytochrom (12.5 kDa), chymotrypsynogen (25 kDa), albuminę jaja (45 kDa), albuminę wołową (67 kDa), katalazę (158 kDa), ferrytynę (240 kDa) i Blue Dekstran (2000 kDa).

Omówienie wyników

Masy cząsteczkowe frakcji białkowych obliczano stosując równanie Andrews'a [2]. Kalibracja kolumny wykazała, że nie można wyznaczyć mas cząsteczkowych dwóch pików o najkrótszych czasach retencji. W oparciu o dane literaturowe [5] pierwszą frakcję zidentyfikowano jako globulinę 11S o m. cz. 330-400 kDa. Natomiast drugi pik zidentyfikowano jako globulinę 7S (150-180 kDa) na podstawie rozdziałów oczyszczonego preparatu tej frakcji.

Analizując udziały procentowe frakcji białek zamieszczone w tab. 1. oraz chromatogramy preparatów bobu i grochu (rys. 1A, 1B) stwierdzono, że oddziaływanie rodników hydroksylo- wych spowodowało rozkład i polimeryzację frakcji niskoczą-

steczkowych o m. cz. 13–16 kDa oraz znaczny wzrost udziału frakcji o m.cz. 330–400 kDa.

Tabela 1

Udział procentowy frakcji białek preparatów bobu, grochu i fasoli oraz 7S globuliny po inkubacji (37°C/24 godz.) bez rodników i z rodnikami hydroksylowymi.

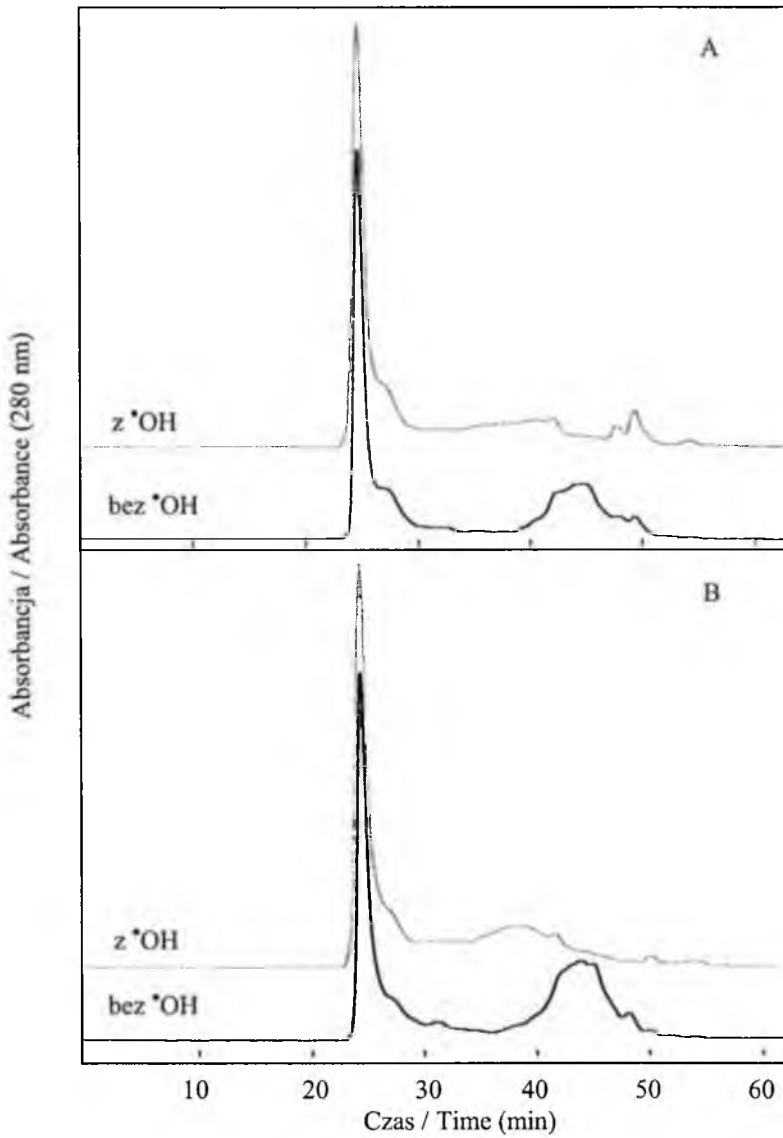
Fraction contents [%] of faba bean, pea and beans proteins preparations and 7S globulin after incubation (37°C/24 h) with and without hydroxyl radicals.

Masa cząsteczkowa Molecular mass [kDa]	Bób Faba bean		Groch Pea		Fasola / Bean				7S globulina 7S globulin	
					<i>Nida</i>		<i>Jaś Tyczny</i>			
	bez *OH	z *OH	bez *OH	z *OH	bez *OH	z *OH	bez *OH	z *OH	bez *OH	z *OH
330-400	53,5	94	53,5	78,5	8	8,5	8	11	10	16
150-180	-	-	-	-	41	36	22,5	23	90	81
52	-	-	-	-	-	-	4,5	6,5	-	-
33,5	-	-	-	-	6,5	4	5	5,5	-	-
21,5	-	-	-	16,5	2	2,5	-	44,5	-	-
16	38,5*	-	43,5		-	31,5	50,5		-	-
13,2		-		5	-			-	-	-
12,5	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
11,3	4	-	3	-	9,5	2,5	-	-	-	-
10,4	4	6	-	-	6	13	3	9,5	-	-
9,5	-	-	-	-	7	-	2,5	-	-	-
8,3	-	-	-	-	5	2	4	-	-	-

* - piki nie rozdzielone / non-separated peaks.

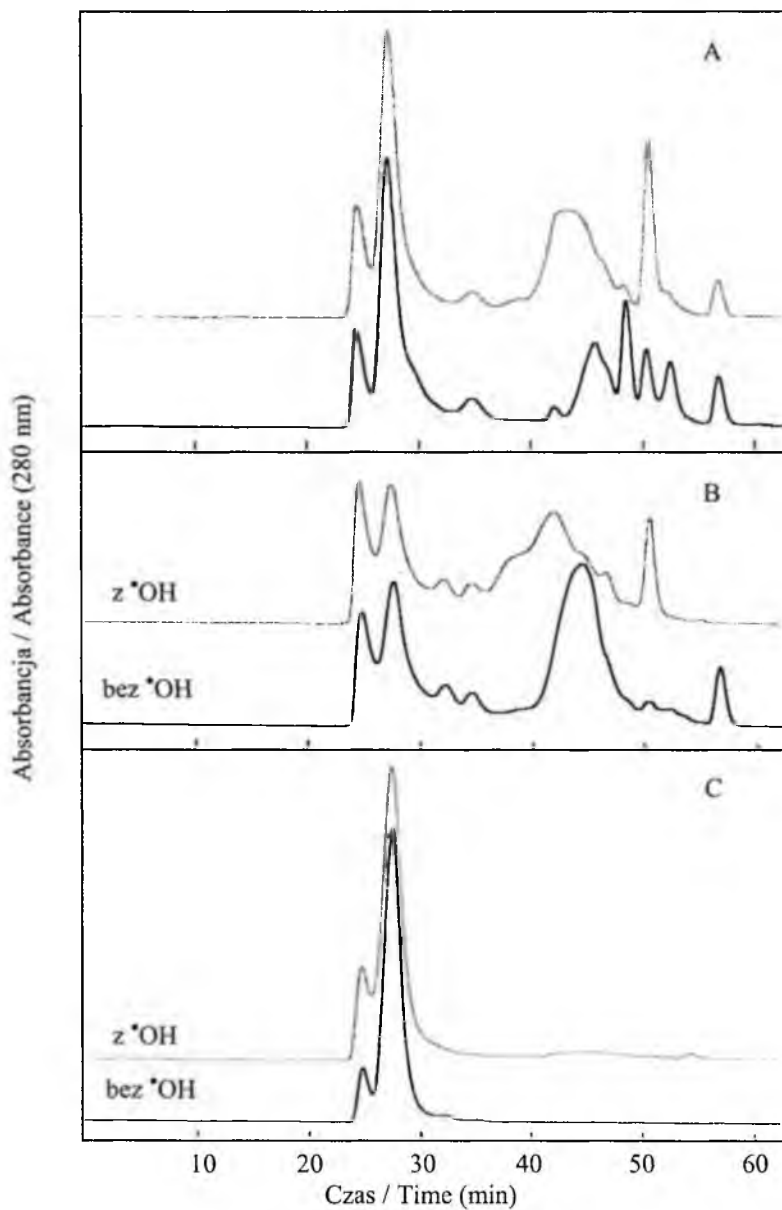
Rozdziły białek czterech spośród pięciu badanych odmian fasoli były bardzo podobne, dlatego przykładowo przedstawiono chromatogram białek fasoli brązowej odmiany *Nida* (rys. 2A). W białkach preparatów fasoli dominowała frakcja 7S, która stanowiła ok. 41% wszystkich białek. Powierzchnia tej frakcji pod wpływem *OH nie zmieniła się znacząco. Stwierdzono, że jej udział obniżył się o ok. 12%. Wyraźniejsze zmiany zaobserwowano we frakcjach niskocząsteczkowych, w miejscu pięciu frakcji o masach od 8 do 12,5 kDa zaobserwowano frakcję o m. cz. 13-16 kDa stanowiącą ok. 32%. Następował również przyrost ilościowy frakcji o m. cz. ok. 10 kDa.

Na rys. 2B przedstawiono chromatogram rozdziłu białek fasoli odm. *Jaś Tyczny*, którego przebieg wyraźnie różnił się w porównaniu z pozostałymi odmianami. W białkach tej fasoli dominowała frakcja o m. cz. ok. 16 kDa, która pod wpływem *OH ulegała fragmentacji i polimeryzacji do podjednostek o nieco wyższej masie cząsteczkowej.



Rys. 1. Chromatogramy rozdzielania białek preparatów bobu (A) i grochu (B) inkubowanych ($37^{\circ}\text{C}/24$ godz.) bez rodników i z rodnikami hydroksylowymi.

Fig. 1. Chromatograms of protein preparations from faba bean (A) and pea (B) incubated ($37^{\circ}\text{C}/24$ h) with and without hydroxyl radicals.



Rys. 2. Chromatogramy rozdziálu białek preparatów fasoli odmian *Nida* (A) i *Jaś Tyczny* (B) oraz frakcji 7S (C) inkubowanych (37°C/24 godz.) bez rodników i z rodnikami hydroksylowymi.

Fig. 2. Chromatograms of protein preparations from beans var. *Nida* (A) and *Jaś Tyczny* (B) and of 7S fraction (C) incubated (37°C/24 h) with and without hydroxyl radicals.

Białka fasoli składają się z kilku podjednostek. Aby stwierdzić jakim zmianom pod wpływem $\cdot\text{OH}$ ulegała główna frakcja, badania przeprowadzono również na oczyszczonej do 90% globulinie 7S otrzymanej z nasion fasoli (rys. 2C). Efektem działania rodników było powiększenie się obecnej również w preparacie frakcji wysokocząsteczkowej (330–400 kDa) i powstanie podjednostek niskocząsteczkowych (13–16 kDa), wynikające ze zmniejszenia udziału głównej frakcji o ok. 10%. Dane otrzymane z rozdziałów 7S globuliny potwierdzają wyniki otrzymane dla czterech odmian fasoli.

Białka badanych gatunków nasion roślin strączkowych zachowywały się odmiennie pod wpływem działania rodników hydroksylowych, co wynika z różnic w składzie ich podstawowych frakcji.

Wnioski

1. W białkach bobu i grochu, pod wpływem rodników hydroksylowych, następuje znaczący wzrost udziału frakcji wysokocząsteczkowej, świadczący o polimeryzacji białek.
2. Mniejsze zmiany pod wpływem rodników zachodziły w białkach fasoli i dotyczyły głównie podjednostek niskocząsteczkowych, natomiast udział frakcji globulin 7S zmieniał się nieznacznie.

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.
- [2] Andrews P., Estimation of molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration, *Biochem. J.*, **94**, 1964, 222.
- [3] Chen H-M., Muramoto K., Yamauchi F.: Structural analysis of antioxydative peptides from soybean beta-conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 574.
- [4] Chen H-M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K., Nokihara K.: Antioxydative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1998, 49.
- [5] Derbyshire E., Wright D. J., Boulter D.: Legumin and Vicilin, Storage Proteins of Legume Seeds. *Phytochemistry*, **15**, 1976, 3.
- [6] Gardner H. W.: Lipid Hydroperoxide Reactivity with Proteins and Amino Acids: A Review. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1979, 220.
- [7] Hunt J.V., Simpson J.A., Dean R.T.: Hydroperoxide-mediated Fragmentation of Proteins. *Biochem. J.*, **250**, 1988, 87.
- [8] Kanazawa K., Ashida H., Nataka M.: Autoxidizing process interaction of linoleic acid with casein. *J. Food Sci.*, **52**, 1987, 475.

- [9] Okada, Y., Okada, M. Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans of free radicals and active oxygen species. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 401.
- [10] Sanchez-Vioque R., Vioque J., Clemente A., Pedroche J., Bautista J., Millan F.: Interaction of chickpea (*Cicer arietinum L.*) legumin with oxidized linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1999, 813.
- [11] Simat T.J., Steinhard H.: Oxidation of free tryptophan and tryptophan residues in peptides. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 490.
- [12] Yamamoto Y., Kato E., Ando A.: Increased antioxidative activity of ovalbumin by heat treating in an emulsion of linoleic acid. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1996, 1430.

CHANGES IN MOLECULAR MASS OF LEGUME PROTEIN PREPARATIONS CAUSED BY HYDROXYL RADICALS

S u m m a r y

Changes induced in protein preparations from pea, bean and faba bean by hydroxyl radicals were determined in this study. Size exclusion chromatography showed that the proteins of legumes investigated are subjected to different changes. In pea and faba bean proteins the radicals caused the increment of high molecular weight fraction (330–400 kDa) of resulted from fragmentation and polymerisation of low molecular weight subunits and, on the contrary, the main fraction of bean proteins (7S) undergoes partial fragmentation. ☒