

RAFAŁ WOŁOSIAK

ZMIANY AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ ALBUMIN GROCHU I FASOLI POD WPLYWEM KWASU ASKORBINOWEGO

Streszczenie

W pracy badano wpływ kwasu askorbinowego na właściwości przeciwutleniające preparatów albuminowych w emulsjach i wobec roztworów kwasu linolowego, a także ich zdolność do zmiatania stabilnych rodników DPPH*. Wykazano dużą aktywność albumin w większości stosowanych układów modelowych. Dodatek kwasu askorbinowego powodował najlepsze efekty w układach emulsyjnych, spadek zawartości nadtlenków w roztworach kwasu linolowego oraz największe zmiany aktywności przeciwrodnikowej w przypadku białek o najłagodniejszych właściwościach.

Wstęp

Od dawna znany jest niekorzystny wpływ reakcji utleniania na właściwości zdrowotne i przechowalnicze żywności, stąd też podjęto wiele prac, w których poszukuje się przeciwutleniaczy o dużej aktywności. Substancje takie mogą mieć bardzo różny mechanizm działania i w związku z tym są różnie klasyfikowane. Jeden ze sposobów to podział na przeciwutleniacze pierwszorzędowe (zapobiegające powstawaniu rodników tlenowych – głównie enzymy), drugorzędowe (zapobiegające rozwinięciu się rodnikowych reakcji łańcuchowych) i trzeciorzędowe (znoszące uszkodzenia spowodowane utlenianiem). Z punktu widzenia technologii żywności najistotniejsze są substancje należące do drugiej grupy [6]. Należą do nich m.in. α -tokoferol, kwas askorbinowy i białka. Ich działanie było wielokrotnie dowiedzione w różnych układach modelowych. Wiadomo ponadto, że łączenie przeciwutleniaczy często powoduje efekt synergistyczny. Stwierdzono m.in. współdziałanie białek z przeciwutleniaczami fenolowymi [4, 5, 9]. W innych pracach dowiedziono zwiększenia stabilności katechin w obecności kwasu askorbinowego [3], co może mieć istotny wpływ na ich właściwości antyoksydacyjne. Znany jest także pozytywny wpływ dodatku kwasu askorbinowego

na zmniejszenie ilości wolnych rodników powstających podczas interakcji białek z utleniającymi się lipidami [8]. Brak jest jednak doniesień na temat współdziałania kwasu askorbinowego i białek roślin strączkowych w reakcjach antyoksydacyjnych.

Dlatego celem niniejszej pracy było zbadanie właściwości przeciwutleniających albumin wybranych roślin strączkowych (potencjalnych, naturalnych antyoksydantów drugorzędowych) i wpływu, jaki na nie wywiera dodatek kwasu askorbinowego.

Material i metody badań

Materiałem badawczym były liofilizowane albuminy z nasion fasoli białej (AFB), fasoli brązowej (AFBr) i grochu (AG) uzyskane na drodze dializy wobec wody dejonizowanej (72 h, zatrzymywane białka o masie powyżej 12 kDa) alkalicznych ekstraktów mąki z obłuszczonych nasion. Ponadto do badań zastosowano kwas askorbinowy (Sigma A-5960) i butylohydroksytoluen (Sigma B-1378). Oznaczenia próbek stosowanych w pracy jako przeciwutleniacze przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Oznaczenia próbek zastosowane w pracy.

Sample codes used in the study.

Rodzaj próbki / Sample	Oznaczenie / Code
Albuminy z nasion fasoli białej (white bean albumins)	AFB
Albuminy z nasion fasoli brązowej (brown bean albumins)	AFBr
Albuminy z nasion grochu (pea albumins)	AG
Kwas askorbinowy (ascorbic acid)	KA
Albuminy z nasion fasoli białej połączone z kwasem askorbinowym	AFB+KA
Albuminy z nasion fasoli brązowej połączone z kwasem askorbinowym	AFBr+KA
Albuminy z nasion grochu połączone z kwasem askorbinowym	AG+KA
Butylohydroksytoluen (butylhydroxytoluene)	BHT
Próba odniesienia - bez dodatku przeciwutleniaczy (control sample)	PO

Określenie właściwości przeciwutleniających prowadzono w trzech różnych układach:

- 1) dodając preparaty (66 mg%) w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 7,0) do roztworu kwasu linolowego, który poddawano procesowi utleniania w 60°C i w regularnych odstępach czasu oznaczano zawartość nadtlenków spektrofotometryczną metodą z tiocyjanianem żelaza przy $\lambda = 500$ nm [1];
- 2) stosując badane preparaty (100 mg%) jako antyoksydanty w emulsjach złożonych z kwasu linolowego, Tween 20 i 0,1 M buforu fosforanowego, w których oznaczano:

- zawartość nadtlenków (LOOH) powstających podczas utleniania emulsji (pH 7,0), w temp. 37°C przez 10 min, przy zastosowaniu hemoglobiny jako katalizatora [7],
 - zawartość produktów rozpadu nadtlenków kwasu linolowego reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), po 24. godzinnej inkubacji emulsji (pH 7,4), w temp. 37°C, przyspieszając proces przez dodatek jonów żelaza (II) [10];
- 3) badając zmiatanie przez preparaty (100 mg%) stabilnych rodników difenylpikrylo-hydrazylowych (DPPH^{*}), poprzez rejestrację absorbancji przy 517 nm w regularnych odstępach czasu do osiągnięcia stałej wartości [2].

Uzyskane odczyty absorbancji posłużyły do obliczenia aktywności antyoksydacyjnej preparatów według wzoru:

$$Aa = (1 - A_{pw}/A_{po}) \times 100\%,$$

gdzie: A_{pw} i A_{po} – absorbancja odpowiednio dla próby właściwej i odniesienia.

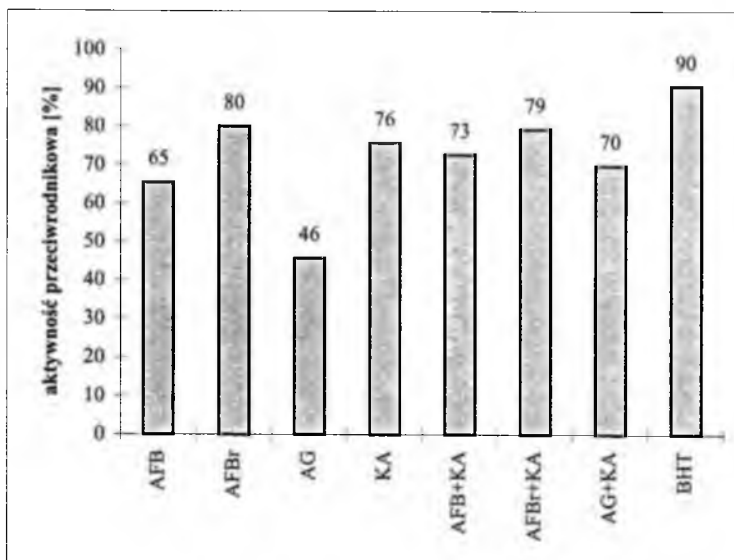
Wyniki i ich omówienie

Badając zmiatanie stabilnych rodników, rejestrowano zmiany absorbancji DPPH^{*} po dodaniu preparatów do osiągnięcia fazy plateau. Najwyższą aktywność w inaktywacji rodników wykazywał AFBr, przewyższając pod tym względem kwas askorbinowy i niewiele tylko ustępując BHT (rys. 1.). Najslabiej działały białka grochu. Połączenie AFBr z KA nie zmieniło aktywności przeciwrodnikowej tego preparatu, a wzrost zdolności do zmiatania DPPH^{*} w przypadku AFB i AG był wyraźny, ale nie przekroczył wartości obserwowanej dla kwasu askorbinowego.

Wszystkie trzy preparaty albumin wykazywały dużą aktywność w hamowaniu reakcji tworzenia nadtlenków w roztworach kwasu linolowego, przez cały okres doświadczenia (rys. 2.): zawartość nadtlenków wahała się wokół wartości początkowej w próbkach z dodatkiem albumin z obu odmian fasoli i nieznacznie wzrosła w przypadku albumin uzyskanych z nasion grochu. Najniższe zawartości nadtlenków spośród wyżej wymienionych odnotowano w próbce z dodatkiem AFBr. Wartości te były porównywalne z uzyskanymi po dodaniu BHT i niewiele wyższe od oznaczonych w próbce zawierającej kwas askorbinowy (rys. 3.).

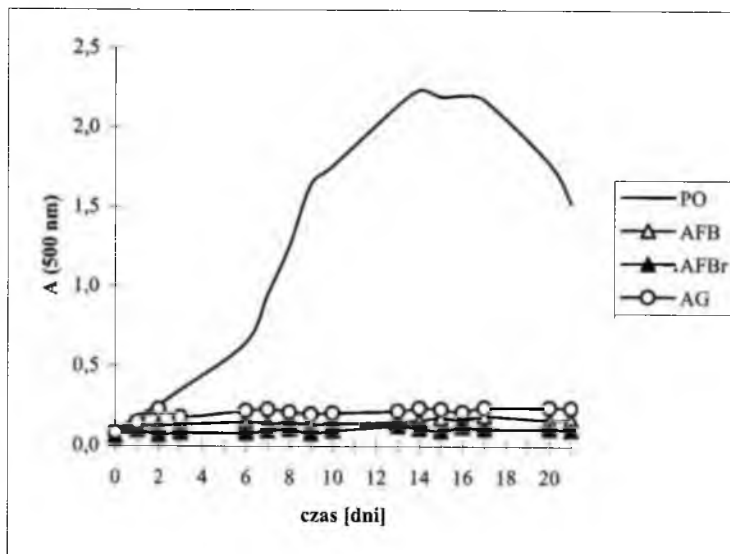
Połączenie albumin fasoli brązowej i grochu z kwasem askorbinowym spowodowało zbliżenie zawartości nadtlenków do wartości odpowiadającej samemu KA (wykazującemu przez prawie cały okres doświadczenia stuprocentową inhibicję tworzenia nadtlenków), natomiast użycie w tym celu albumin fasoli białej spowodowało znaczne pogorszenie właściwości przeciwutleniających (rys. 4.), co jest wynikiem zaskakują-

cym w kontekście zwiększenia zdolności do zmiatania rodników DPPH[•] przy takiej kombinacji antyoksydantów.



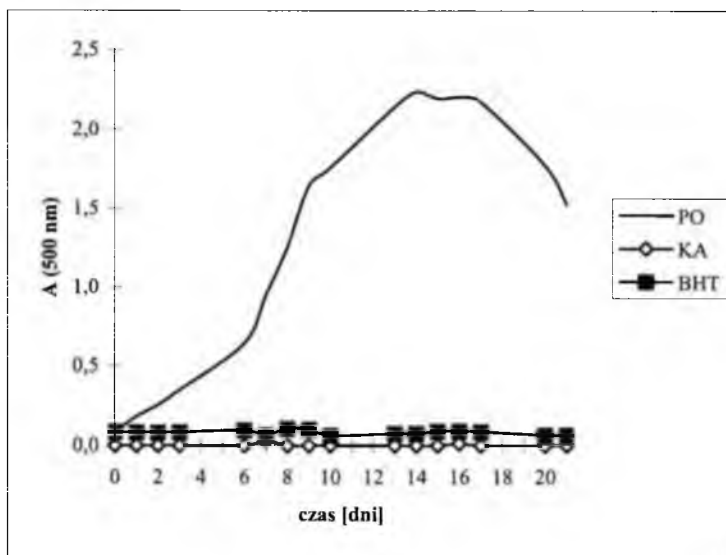
Rys. 1. Zmiatanie stabilnych rodników DPPH[•] przez preparaty.

Fig. 1. DPPH[•] stable radical scavenging activity of the preparations.



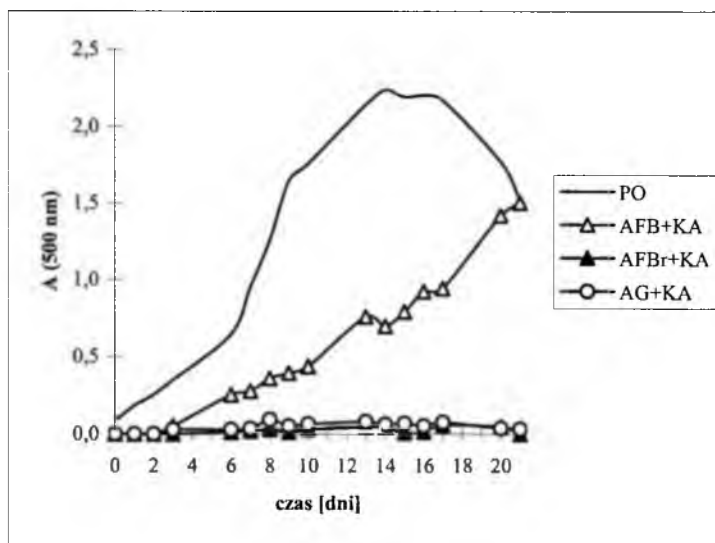
Rys. 2. Zawartość nadtlenków w roztworach kwasu linolowego (próbki z dodatkiem preparatów albuminowych).

Fig. 2. Peroxide contents in linoleic acid solutions (samples with albumin preparations added).



Rys. 3. Zawartość nadtlenuków w roztworach kwasu linolowego (próbki z dodatkiem kwasu askorbino-
wego i BHT)

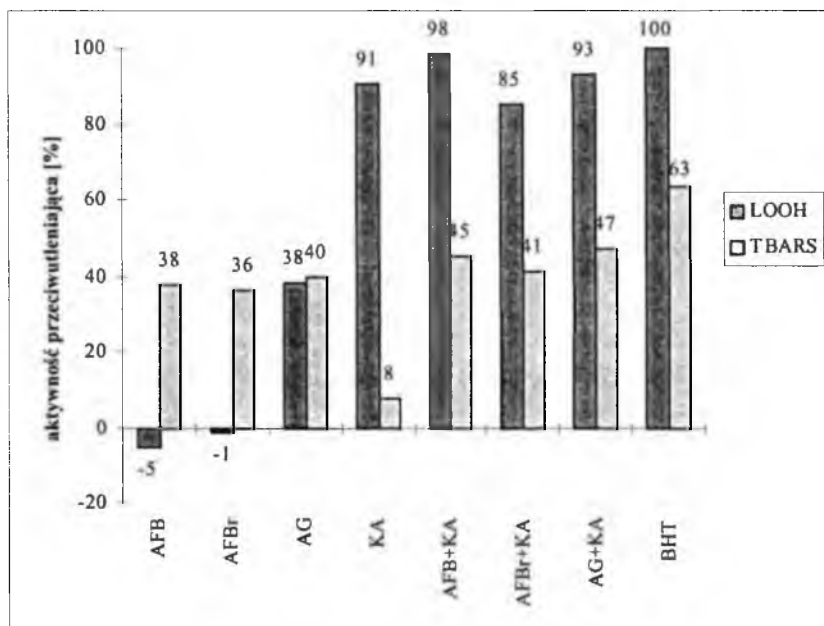
Fig. 3. Peroxide contents in linoleic acid solutions (samples with ascorbic acid and BHT added)



Rys. 4. Zawartość nadtlenuków w roztworach kwasu linolowego (próbki z dodatkiem kwasu askorbino-
wego i preparatów albuminowych)

Fig. 4. Peroxide contents in linoleic acid solutions (samples with ascorbic acid and albumin prepa-
rations added)

Kolejnym etapem pracy było zastosowanie badanych próbek jako przeciwutlenia-czy w emulsjach, w których stopień utlenienia kwasu linolowego mierzono również zawartością nadtlenczków i produktów ich rozpadu (rys. 5.). Albuminy w zależności od rodzaju nasion wykazały bardzo różną aktywność hamowania reakcji tworzenia nad-tlenczków – od minimalnie prooksydacyjnej (AFB) do wyraźnie antyoksydacyjnej (AG). W tym doświadczeniu spośród albumin najlepsze właściwości posiadało białko grochu, były one jednak około dwukrotnie gorsze od wykazywanych przez kwas askorbinowy. Połączenie albumin z KA miało dodatni wpływ na ich aktywność we wszystkich trzech kombinacjach, a w przypadku AFB i AG obserwowano efekt synergistyczny.



Rys. 5. Aktywność przeciwutleniająca preparatów zastosowanych w emulsjach (LOOH = nadtlenki, TBARS = produkty rozpadu nadtlenczków)

Fig. 5. Antioxidant activity of preparations in linoleic acid emulsions (LOOH = peroxides, TBARS = peroxides decomposition products)

Wyraźnie różniące się od powyższych wyniki uzyskano przy pomiarze zawartości produktów rozpadu nadtlenczków. Aktywność preparatów albuminowych była bardzo wyrównana, przy czym najlepsze właściwości posiadało także i w tym przypadku białko grochu. Uwagę zwraca wyjątkowo niska aktywność kwasu askorbinowego, wiadomo jednak, że w tym środowisku może on wykazywać nawet tendencje prooksydacyjne [11]. Zastosowanie układów łączących badane przeciwutleniacze spowodowało pewien wzrost efektywności ich działania ponad wykazywane przez nie oddzielnie.

Wnioski

1. Preparaty albuminowe wykazują właściwości przeciwutleniające porównywalne z BHT, zależą one jednak od zastosowanego środowiska reakcji.
2. Pozytywny wpływ dodatku kwasu askorbinowego na aktywność białek występował w większości doświadczeń, przy czym jednoznaczny efekt synergistyczny zaobserwowano jedynie w układach emulsyjnych.

LITERATURA

- [1] Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F.: Structural analysis of antioxydative peptides from soybean β -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 574.
- [2] 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.
- [3] Chen, Z.-Y., Zhu, Q. Y., Wong, Y. F., Zhang, Z., Chung, H. Y.: Stabilizing effect of ascorbic acid on green tea catechins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 2512.
- [4] Hayes, R.E., Bookwalter, G.N., Bagley, E.B.: Antioxidant activity of soybean flour and derivatives - a review. *J. Food Sci.*, **42**, 1977, 1527.
- [5] Heinonen, M., Rein, D., Satue-Gracia, M. T., Huang, S.-W., German, J. B., Frankel, E. N.: Effect of protein on the antioxidant activity of phenolic compounds in a lecithin-liposome oxidation system. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 917.
- [6] Horubała, A.: Pojemność przeciwutleniająca i jej zmiany w procesach przetwarzania owoców i warzyw. *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, **3**, 1999, 30.
- [7] Kuo, J.-M., Yeh, D.-B., Pan, B. S.: Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plant material. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1999, 3206.
- [8] Saeed, S., Sawthorpe, S. A., Howell, N. K.: Electron spin resonance (ESR) study on free radical transfer in fish lipid-protein interaction, *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 1999, 1809.
- [9] 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. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1998, 1912.
- [10] Yen, G.-C., Chen, H.-Y., Lee, C.-E.: Measurement of antioxidative activity in metal ion-induced lipid peroxidation systems. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 1999, 1213.

CHANGES OF PEA AND BEAN ALBUMINS ANTIOXIDANT ACTIVITY INDUCED BY ASCORBIC ACID ADDITION

Summary

Influence of ascorbic acid on antioxidant properties of albumin preparations against linoleic acid solutions and emulsions, as well as DPPH^{*} stable radical scavenging ability were evaluated. In most model systems high activity of albumins was proved. Ascorbic acid addition had the best antioxidant effect in emulsions and resulted in decrease of peroxides in linoleic acid solutions. The biggest changes of antiradical activity after ascorbic acid addition were observed for proteins exhibiting lower scavenging ability. ☒