

BARBARA BARANIAK, MAŁGORZATA KOSTECKA,
MAŁGORZATA NIEZABITOWSKA

KWASOWA HYDROLIZA GROCHU I FASOLI SZPARAGOWEJ

Streszczenie

Analizowano proces hydrolizy kwasowej zielonego grochu, strąków fasoli szparagowej i jej nasion w warunkach symulujących przewód pokarmowy. W otrzymanych hydrolizatach oznaczano zawartość związków fenolowych i cukrów redukujących oraz ich aktywność antytrypsynową, antypepsynową i antypankreatynową, natomiast dla pozostałości warzyw po hydrolizie oznaczano efekt antoksydacyjny. Najwyższy potencjał antyutleniający otrzymano dla strąków fasoli szparagowej. Hydrolizaty zielonego grochu wykazały najwyższą aktywność antytrypsynową, natomiast pepsynę najbardziej inaktywowały hydrolizaty nasion fasoli szparagowej.

Wstęp

Nasiona roślin strączkowych są głównym źródłem białka roślinnego w żywieniu człowieka. Są one również bogate w witaminy, węglowodany i składniki mineralne. Z uwagi na obecność czynników powszechnie uznawanych za przeciwżywniowe nie są dostatecznie wykorzystywane w diecie. W celu zwiększenia spożycia takich wysokowartościowych surowców roślinnych, jak nasiona grochu i fasoli prowadzi się szereg badań genetycznych, uprawowych oraz technologicznych nad polepszeniem ich wartości żywieniowej [3, 5].

W ostatnich latach badane są nowe kierunki oddziaływań fizjologicznych związków zaliczanych do substancji przeciwżywniowych (inhibitory proteaz, kwas fitynowy, fenole, saponiny czy tioglikozydy). Wielu z nich przypisuje się działanie anty-kancerogenne, co w dobie walki z rakiem nabiera szczególnego znaczenia. Konieczne jest więc określanie nie tylko ich poziomu w surowcach roślinnych, ale również zmian jakościowych i ilościowych jakim mogą ulegać wraz z towarzyszącymi im substancjami.

Dr hab. B. Baraniak, prof. nadzw. AR¹, mgr M. KostECKA², mgr M. NiezabitoWSKA²; ¹Katedra Biochemii i Chemii Żywności, ²Katedra Chemii, Akademia Rolnicza w Lublinie, ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

Polifenole, poprzez zdolność łączenia się z białkami mogą być inhibitorami enzymów, obniżają więc wartość żywieniową niektórych produktów roślinnych. Przyczyną powstawania wiązań polifenoli z białkami jest efekt hydrofobowy, wspomagany tworzeniem wiązań wodorowych. Również łatwość utleniania polifenoli do chinonów (które z kolei polimeryzują do brunatnych związków wielocząsteczkowych, a w obecności amin ulegają przemianom do melanin) jest niekorzystnym zjawiskiem przebiegającym w produktach żywnościowych. Polifenole uważane były więc jako jedne z czynników obniżających wartość żywieniową produktów. Okazuje się jednak, że te same cechy, które stanowiły o ich ujemnym działaniu (włączenia się do reakcji redoks z możliwością reagowania z innymi rodnikami) stanowią podstawę do stosowania związków o charakterze fenoli jako antyoksydantów. Ma to szczególne znaczenie w walce z rakiem, gdyż fenole zaliczane są do antykancerogenów przeciwdziałających inicjowaniu procesów transformacji rakotwórczych metabolitów, z uwagi na zdolność modulacji aktywności izoenzymów, wchodzących w skład cytochromu P 450 [16].

W nasionach roślin strączkowych występuje kilka inhibitorów proteaz. Najbardziej poznany, z tej grupy związków, jest powszechnie występujący inhibitor trypsyny Kuniza (STI), a dominującym jest inhibitor trypsyny i chymotrypsyny Browmana-Birk (BBI). Ten drugi związek jest termostabilny gdyż posiada w swojej strukturze aż sześć mostków disiarczkowych [2].

Powszechność występowania w pokarmach pochodzenia roślinnego (głównie w nasionach motylkowatych, ziarniakach zbóż, bulwach ziemniaków i korzeniach buraków) inhibitorów enzymów proteolitycznych skłoniła do wyjaśnienia ich funkcji biologicznych. Przyjmuje się, że regulują one natężenie proteolizy w tkankach roślinnych (choć niewiele znaleziono inhibitorów zdolnych do inaktywacji endogennych peptydaz). Natomiast znakomita większość roślinnych inhibitorów hamuje aktywność proteinaz pochodzenia mikrobiologicznego i zwierzęcego. Wielokrotnie stwierdzana akumulacja aktywności antyproteolitycznej w roślinie w przypadku uszkodzenia nawet jednego z jej organów jest dowodem na udział inhibitorów w mechanizmach obronnych organizmu roślinnego przed szkodnikami i patogennymi mikroorganizmami.

Trzecia rola inhibitorów proteaz polega na tym, że są one białkami zapasowymi nasion i ziarniaków. Wykazano jednak, że pasze zawierające inhibitory proteaz są gorzej wykorzystywane przez zwierzęta. Związane to jest z częściową inaktywacją enzymów proteolitycznych przewodu pokarmowego zwierząt, dlatego związki te uważane są za czynniki obniżające wartość pokarmową pasz. Większa zawartość inhibitorów w diecie powoduje hipertrofię trzustki i zahamowanie wzrostu młodych zwierząt. Za przyczynę tego drugiego zjawiska uważa się pobieranie aminokwasów zawierających siarkę, które wykorzystywane są do budowy tkanek, na dodatkową syntezę trypsyny, której straty spowodowane są działalnością jej inhibitorów, obecnych w pożywieniu.

Natomiast w populacjach ludzkich w których diecie występuje duży udział białek zasobnych w inhibitory proteaz, dane epidemiologiczne wykazują niską umieralność na raka.

Podawane są różne hipotezy mające wyjaśnić mechanizm działania inhibitorów proteaz, jako czynników antykancerogennych. Uważa się, że inhibitory redukcją trawienie białek, a przez to dostępność aminokwasów potrzebnych do budowy komórek rakowych, w szczególności leucyny, fenyloalaniny i tyrozyny. Inhibitory mogą hamować narastanie komórek nowotworowych przez odwrócenie zmian, spowodowanych ekspresją onkogenów, czy wreszcie mogą hamować tworzenie się anionu rodnika nadtlenkowego (O_2^-) lub nadtlenku wodoru, które to związki mogą uszkadzać lub modyfikować komórkowy DNA [8].

W niniejszej pracy badano proces uwalniania związków inhibitujących aktywność proteaz, związków fenolowych i cukrów redukujących podczas hydrolizy *in vitro* prowadzonej w warunkach symulujących warunki przewodu pokarmowego (pH = 1,5). Hydrolizie kwasowej poddano strąki zielonej fasoli szparagowej, jej dojrzałe nasiona oraz zielony groch.

Materiały i metody

Materiałem do badań była zielona fasolka szparagowa, jej dojrzałe nasiona i zielone nasiona grochu. Rośliny hodowano z nasion handlowych, w jednakowych warunkach siedliskowych, nie stosując żadnych chemicznych środków ochrony roślin.

Świeży materiał suszono w temperaturze 313 K i po zmieleniu przechowywano w temperaturze ok. 279 K. Następnie prowadzono jego hydrolizę kwasem solnym (pH = 1,5) w ciągu dwóch i czterech godzin w temperaturze 310 K. Po określonym czasie hydrolizaty odwirowywano, a pozostały osad po hydrolizie suszono w temperaturze pokojowej. W przesączach analizowano poziom związków fenolowych, cukrów redukujących i aktywność antyproteolityczną, a w osadach badano ich właściwości antyutleniające. Zawartość związków fenolowych określano z odczynnikiem Folin-Ciocalteu [15] stosując jako wzorzec kwas chlorogenowy. Poziom cukrów redukujących oznaczono spektrofotometrycznie z DNS (kwas 3,5,-dinitrosalicylowy) [13]. Aktywność antytrypsynową, antypepsynową i antypankreatynową analizowano poprzez inkubowanie próbek z roztworami enzymów – pepsyną (EC 3.4.23.1), trypsyną (EC 3.4.21.4.) i pankreatyną (wszystkie firmy Sigma) w temperaturze 310 K w ciągu 4 godzin stosując jako substrat azoalbuminę. Pozostałą aktywność proteolityczną oznaczano spektrofotometrycznie po wyhamowaniu reakcji 12% TCA [16]. Procent inhibicji obliczano wg wzorca (aktywność poszczególnego enzymu wobec azoalbuminy).

Substancje o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych ekstrahowano z próbek trzykrotnie 80% acetonem. W otrzymanych ekstraktach oznaczono właściwości

antyoksydacyjne wobec kwasu linolowego stosując metodę podaną przez Lingherta i wsp. [10].

Wyniki i dyskusja

Fizjologiczna rola wtórnych metabolitów roślinnych, wprowadzanych do organizmu wraz z żywnością pochodzenia roślinnego wzbudza w ostatnim dziesięcioleciu wzmożone zainteresowanie badaczy. Znaczenie witamin, błonnika pokarmowego czy biopierwiastków w diecie człowieka jest już obszernie udokumentowane. Natomiast wpływ na procesy metaboliczne organizmu związków traktowanych jako substancje przeciwżywniowe wymaga wszechstronnych badań w świetle udokumentowanych już ich właściwości pozytywnych (działania antykancerogenne, przeciwzapalne, przeciwutleniające, regulujące ciśnienie krwi). W zależności od ilości w codziennej diecie i prawdopodobnie ich źródła związki te mogą oddziaływać stymulująco lub inhibującą na procesy fizjologiczne w organizmie.

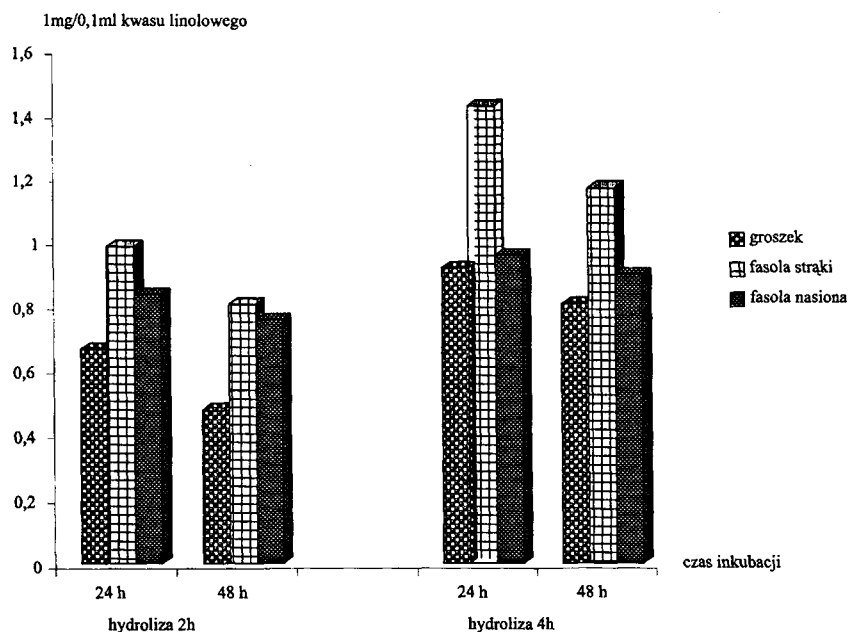
Wszystkie makrocząstki dostarczane wraz z pokarmem muszą w pierwszym etapie przemian katabolicznych ulegać hydrolizie do związków prostych. Proces ich rozpadu przebiega głównie w środowisku kwaśnym pod wpływem soków żołądkowych. W niniejszej pracy badano hydrolizę kwasową zielonego grochu, fasolki szparagowej oraz jej dojrzałych nasion prowadzoną w warunkach *in vitro* w pH 1,5, a więc zbliżonym do kwasowości soków żołądkowych.

Otrzymane zawartości związków fenolowych w hydrolizatach korespondują z wartościami, jakie otrzymała Wilska-Jeszka i wsp. [18] analizując poziom polifenoli w grochu i soczewicy, oraz Amarowicz i wsp. [1] ekstrahując polifenole z nasion soczewicy układem alkohol/woda. Czas prowadzonej hydrolizy w zakresie od 2 do 4 godzin nie miał istotnego wpływu na poziom związków fenolowych w analizowanych hydrolizatach (tab. 1). W trakcie czterogodzinnego procesu ich poziom wzrósł niewiele - najbardziej dla nasion fasoli szparagowej. Dowodzi to tylko nieznacznego uwalniania związków fenolowych z ich kompleksowych połączeń, które tworzą również z białkami. Związki, które nie uległy hydrolizie w badanych warunkach, wykazały właściwości antyoksydacyjne. Ich potencjał antyoksydacyjny był wyższy po czterogodzinnym prowadzeniu procesu, a malał podczas wydłużania czasu inkubacji z kwasem linolowym (rys. 1). Przypuszczalnie w trakcie dłuższej trwającej hydrolizy uwalniane są z połączeń kompleksowych związki posiadające właściwości antyutleniające. Łatosz i wsp. [11] porównując właściwości przeciwutleniające ekstraktów acetonowo-wodnych (8:2 v/v) z brokuła, bez i z przeprowadzoną hydrolizą enzymatyczną glukoziniali (GLS), wykazali znaczne różnice w otrzymanych właściwościach przeciwutleniających przy zbliżonym poziomie związków fenolowych. Autorzy cytowanej pracy przypuszczają, że za wzrost właściwości antyutleniających odpowiedzialne są produkty hydrolizy enzymatycznej GLS.

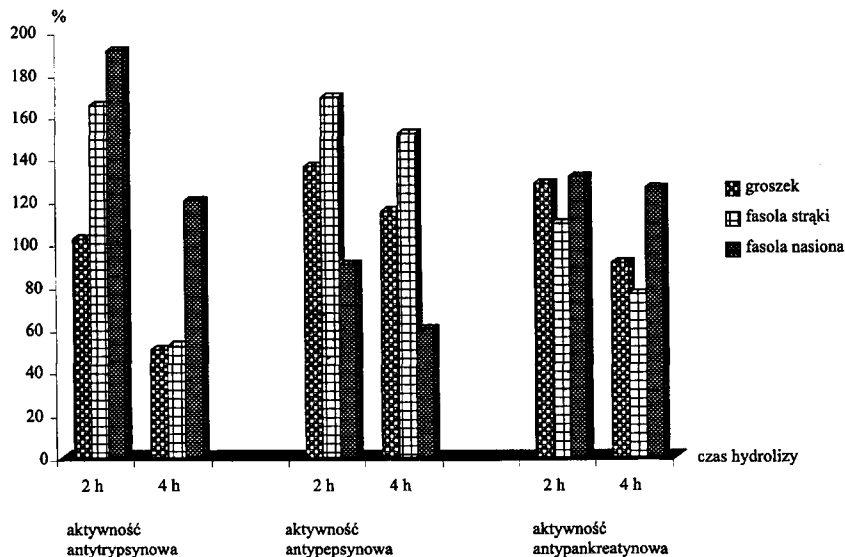
Tabela 1

Wpływ czasu hydrolizy na zawartość fenoli i cukrów redukujących w otrzymanych hydrolizatach.
Effect of hydrolysis time on polyphenols and reducing sugars content in obtained hydrolysates.

Wyszczególnienie Specification	Polifenole (%) Polyphenols		Cukry redukujące (%) Reducing sugars	
	Czas hydrolizy Time of hydrolysis		Czas hydrolizy Time of hydrolysis	
	2h	4h	2h	4h
Zielony groch Green pea	3,22	3,30	1,29	1,84
Fasola szparagowa zielona Green bean pods	2,60	2,70	1,17	1,99
Nasiona fasoli szparagowej Seeds of bean	2,70	3,00	0,59	0,80



Rys. 1. Efekt antyutleniający (1mg/0,1ml kwasu linolowego) wybranych warzyw po procesie hydrolizy.
Fig. 1. Antioxidative potential (1mg/0,1 ml of linoleic acid) chosen vegetables after hydrolyzing process.



Rys. 2. Wpływ czasu hydrolizy na aktywność antyproteolityczną otrzymanych hydrolyzatów.

Fig. 2. Effect of hydrolysis time on antiproteolytic activity of obtained hydrolysates.

W przeprowadzonych badaniach największy potencjał antyutleniający z trzech badanych warzyw wykazały (niezależnie od czasu prowadzenia hydrolizy) związki wyekstrahowane z fasoli szparagowej, najniższy zaś z ziaren zielonego grochu. Otrzymane wielkości liczbowe efektów antyutleniających trudno jest porównywać z wynikami innych autorów, gdyż do badań stosowane są różne metody lub różnorakie surowce. Autooksydację kwasu linolowego w systemie alkohol-woda stosowali w badaniach aktywności przeciwutleniającej barwników antocjanowych izolowanych z czerwonej fasoli Tsuda i wsp. [17] oraz Chin-Kun Wang i Ming-Jen Wu [4] analizując właściwości przeciwutleniające związków fenolowych liści pieprzu żuwonego (*Piper betle*). Stosowane jest również oznaczanie inhibicji utleniania estrów kwasu linolowego w różnych fazach [7] lub przez wolne rodniki wytwarzane w ich środowisku poprzez rozpad 2,2'-azobis (2,4-dimetylo waleronitrylu) [12, 18]; lub utlenianie kwasu linolowego nandtlenkiem wodoru i badanie wpływu otrzymanych produktów na szybkość degradacji β -karotenu [6, 9]. W olsztyńskim Oddziale Nauki o Żywności IRZBŻ PAN wykorzystuje się obok testu Millera [14] metodę liposomową do oznaczania właściwości antyoksydacyjnych warzyw.

W niniejszej pracy czas prowadzenia hydrolizy decydował w istotnym stopniu o właściwościach antyproteolitycznych otrzymanych ekstraktów. W trakcie dwugodzinnego procesu produkty hydrolizy wykazywały różnorodną aktywność względem testowanych proteaz.

W większości przypadków (z wyjątkiem hydrolizatu z nasion fasoli wobec pepsyny) początkowa faza procesu prowadziła do uwolnienia związków aktywujących testowane enzymy proteolityczne, a stopień uzyskanych zmian uzależniony był zarówno od badanego enzymu, jak i od gatunku warzywa. Największą aktywację wykazał hydrolizat z nasion fasoli względem trypsyny; najmniejszą wobec tego samego enzymu hydrolizat zielonego grochu. Z kolei hydrolizat z zielonej fasoli szparagowej i z zielonego grochu nie inaktywował aktywności pepsyny zarówno po dwu- jak i czterogodzinnym procesie. Analogiczne właściwości wykazał hydrolizat nasion fasoli szparagowej wobec pankreatyny i trypsyny. Z zielonego grochu i z zielonej fasoli szparagowej proces czterogodzinnej hydrolizy spowodował uwolnienie inhibitorów trypsyny i pankreatyny, natomiast inhibitory trypsyny uzyskano tylko w hydrolizatach z nasion fasoli.

Na podstawie uzyskanych wyników należy sądzić, że w procesie hydrolizy uwalniane są stopniowo, w zależności od czasu trwania procesu i analizowanego warzywa, inhibitory proteaz o różnej specyficzności. Czas trwania procesu powoduje wzrost aktywności antyproteolitycznej testowanych hydrolizatów. Przyczynę tego można upatrywać w zwiększonej ilości peptydów i białek niskocząsteczkowych, wykazujących w stosunku do proteaz właściwości efektorów allosterycznych.

Podsumowanie

W trakcie procesu hydrolizy w warunkach *in vitro* symulujących warunki przeżuwania pokarmowego uwalnianie są z warzyw związki o różnorodnym oddziaływaniu w stosunku do enzymów proteolitycznych. W zależności od gatunku warzywa, rodzaju testowanej proteazy i czasu trwania hydrolizy, substancje te wykazują charakter aktywatorów lub inhibitorów aktywności enzymów proteolitycznych. Czas trwania hydrolizy determinuje również wielkość potencjału antyutleniającego pozostałości warzyw, które nie uległy hydrolizie, jak również ilość uwolnionych w trakcie hydrolizy cukrów redukujących. Natomiast nie różnicuje zasadniczo poziomu związków fenolowych w otrzymanych hydrolizatach.

LITERATURA

- [1] Amarowicz R., Piskuła M., Honke J., Rudnicka B., Troszyńska A., Kozłowska H.: Extraction of phenolic compounds from lentil seeds (*Lens culinaris*) with various solvents. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 4/45, (3) 1995, 53.
- [2] Birk Y.: Protein proteinase inhibitors in food. In: Bioactive substance in food of plant origin, vol. 1. (ed. H. Kozłowska, J.Fornal and Z. Zduńczyk). Centre for Agrotechnology and Veterinary Sciences, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland, 202, 1994.
- [3] Blixt S., Przybylska J.: Comparative study of seed proteins in the genus *Pisum*. *Genetyka Polska*, 188, 1, 1985, 34.

- [4] Chin-Kun Wang, Ming-Jen Wu.: The separation of phenolics from *Piper betle* leaf and the effect on the mutagenicity of arecoline. *J. Chinese Agric. Chem. Society*, **34**, 5, 1996, 638.
- [5] Grześkowiak B., Pazoła Z.: Wpływ wybranych procesów technologicznych na wartość biologiczną białek grochu (*Pisum sativum*). *Rocz. AR, Pozn., CCXVIII*, 1990, 43.
- [6] Hidalgo M.E., Fernández E., Quilhot W., Lissi E.: Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry*, **37**, 6, 1994, 158.
- [7] Kasuga A., Aoyagi Y., Sugahara T.: Antioxidant activity of fungus *Suillus bovinus* (*L:Fr.*) *O. Kuntze*. *J. Food Sci.*, **60**, 5, 1995, 1113.
- [8] Lachance P.A.: Micronutrients in cancer prevention. In: Food phytochemicals for cancer prevention. V.1.ed. Mou-Tuan Huang, Toshihiko Osawa, Chi-Tang Ho, R.T.Rosen. American Chemical Soc., Washington, D.C., 49, 1994.
- [9] Lee Y., Howard L.R., Villalón B.: Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annum*) cultivars. *J. Food Sci.*, **60**, 3, 1995, 473.
- [10] Lingnert H., Vallentin K.V., Eriksson C.E.: Measurement of antioxidative effect in model system. *J. Food Proc. Preserv.* **3**, 1979, 87.
- [11] Łatosz A., Tsushida T., Ciska E., Kozłowska H.: Próba identyfikacji związków o właściwościach przeciwutleniających obecnych w warzywach z rodziny *Cruciferae*. Materiały Zjazdowe XXVIII Sejsji Naukowej Komitetu Technologii i Chemii Żywności „Postępy w Technologii i Chemii Żywności”, Gdańsk, 1997, 83.
- [12] Maoka T., Ito Y., Sakushima A., Ohno K., Coskun M., Nishibe S.: Comparison of antioxidative activity of phenolic compounds in *Boreava orientalis* and their related compound. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **46**, 11, 1997, 1399.
- [13] Miller G.E.: Use of DNS a reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, **31**, 1959, 426.
- [14] Miller H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **48**, 1997, 91.
- [15] Swain T., Hillis W.E.: The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.: The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 1959, 63.
- [16] Thomas H.: Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of *Lolium temulentum* during senescence. *Planta*, **142**, 1978, 161.
- [17] Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Norinobu S., Sang-Wang Choi, Kawakishi S., Osawa T.: Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-d-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1994, 2407.
- [18] Wilska-Jeszka J., Stasiak A.: Protein proteinase inhibitors in food. In: Bioactive substance in food of plant origin, vol. 1. (ed. H. Kozłowska, J.Fornal and Z. Zduńczyk). Centre for Agrotechnology and Veterinary Sciences, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland, 126, 1994.

ACID HYDROLYSIS OF PEA AND FRENCH BEAN

S u m m a r y

Acid hydrolysis of green pea, green bean pods and bean seeds in simulated gastric conditions was investigated. The following were analysed: polyphenols and reducing sugars content, antitrypsin, antipepsin and antipancreatine activity (in obtained hydrolysates); antioxidative properties of residue after hydrolysis. The obtained value depends on the vegetable variety and time of hydrolysis. The highest antioxidative potential was observed in green bean pods. The filtrate obtained after pea hydrolysis showed the highest antitrypsin activity, but the highest antipepsin activity was found in bean seeds. ☒