

Monika Karaś, Barbara Baraniak

## AKTYWNOŚĆ ANTYRODNIKOWA EKSTRAKTÓW UZYSKANYCH W PROCESIE IZOLOWANIA PEPTYDÓW FASOLI SZPARAGOWEJ

Katedra Biochemii i Chemii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
Kierownik: prof. dr hab. B. Baraniak

*W pracy izolowano peptydy z ekstraktu otrzymanego buforem Tris-HCl poprzez wydzielenie wysokocząsteczkowych białek metanolem, acetonem, 20% kwasem trichlorooctowym, kationowym flokulantem Magnafloc M-22S oraz prowadzono charakterystykę otrzymanych frakcji. Oznaczono zawartość białka i peptydów, przeprowadzono rozdział elektroforetyczny, analizę składu aminokwasowego oraz określono właściwości przeciwrodnikowe (wyrażone jako % inhibicji) peptydów obecnych w badanych ekstraktach.*

Hasła kluczowe: peptydy, fasola szparagowa.

Key words: peptides, green bean.

Powstające w żywności rodniki nadtlenkowe generują bardziej reaktywne, a tym samym szkodliwe rodniki hydroksylowe, wolny tlen i ozon, a to w konsekwencji powoduje pogorszenie jej jakości. Naturalnymi substancjami hamującymi procesy oksydacji tłuszczów mogą być, obecne również w roślinach strączkowych, związki fenolowe, tokoferole, fosfolipidy jak również peptydy. Wiele peptydów wykazuje właściwości przeciwutleniające. Hamują szybkość autooksydacji oraz obniżają zawartość nadtlenkowych form kwasów tłuszczowych w żywności. Ograniczają również liczbę wolnych rodników poprzez pełnienie funkcji promotora rozkładu nadtlenków i zdolność wiązania metali ciężkich (1). Do takich peptydów należy np. karnozyna ( $\beta$ -Ala-His), naturalny dipeptyd gromadzony w dużych ilościach w mięśniach zwierzęcych. Peptyd ten posiada zdolność inhibitowania reakcji utleniania lipidów katalizowanej przez żelazo, hemoglobinę, lipooksygenazę i tlen atomowy *in vitro*. Również glutation – naturalny niskocząsteczkowy tripeptyd ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) w formie zredukowanej GSH, może reagować z wolnymi rodnikami. Pełni m.in. funkcję wewnątrzkomórkowego przeciwutleniacza bezpośrednio chroniącego DNA przed tlenowymi uszkodzeniami. Uwaga większości badaczy skupiona jest na oznaczaniu peptydów pochodzenia roślinnego jako produktów hydrolizy roślinnych preparatów białkowych. Spośród roślin strączkowych najdokładniej poznano właściwości antyoksydacyjne soi i jej produktów (2). Celem pracy było zbadanie aktywności antyrodnikowej ekstraktów uzyskanych w procesie izolowania peptydów z fasoli szparagowej poprzez wydzielenie wysokocząsteczkowych białek.

## MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań była mrożona zielona fasola szparagowa (odm. *Fana*). Frakcję peptydów ekstrahowano z 1 g zhomogenizowanego materiału buforem Tris-HCl o pH 7,5 za pomocą mieszadła magnetycznego przez 2 godz. w temperaturze pokojowej. Frakcję stałą oddzielano przez wirowanie (4000 obr./min., przez 15 min.). Uzyskane ekstrakty suszono przez liofilizowanie i stosowano do dalszych badań. Frakcje albumin i globulin z rozpuszczonych liofilizatów wytrącano stosując następujące czynniki koagulujące: aceton, metanol, 20% TCA i kationowy polielektrolit Magnafloc 22S. Osad odwirowywano przez 15 min. (4000 obr./min.). Zawartość białka oznaczano za pomocą metody *Bradford'a* (3) wobec albuminy wołowej BSA jako wzorca (595 nm). Zawartość peptydów oznaczono metodą spektrofotometryczną z TNBS (kwas trinitrobenzenosulfonowy) zgodnie z metodą *Habeeb'a* (4) w modyfikacji *Adler-Nissen'a* (5) wobec leucyny i leucyno-glicyny jako wzorców (340 nm). Skład aminokwasowy białek oznaczono metodą chromatografii jonowymiennej w automatycznym analizatorze aminokwasów T339M, Mikro-techna Praha. Hydrolizę preparatów prowadzono za pomocą kwasu solnego o stęż. 6 mol/dm<sup>3</sup> po uprzednim utlenieniu kwasem nadmanganowym. Oznaczenie aktywności antyrodnikowej prowadzono wobec DPPH\* (6). Aktywność antyrodnikową wyrażono jako % inhibicji wg wzoru podanego przez *Yen'a* i *Duh'a* (7):

$$\% \text{ inhibicji} = [(A_{C(0)} - A_{C(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$$

gdzie:

$A_{C(0)}$  – absorbancja kontroli w czasie „0”,

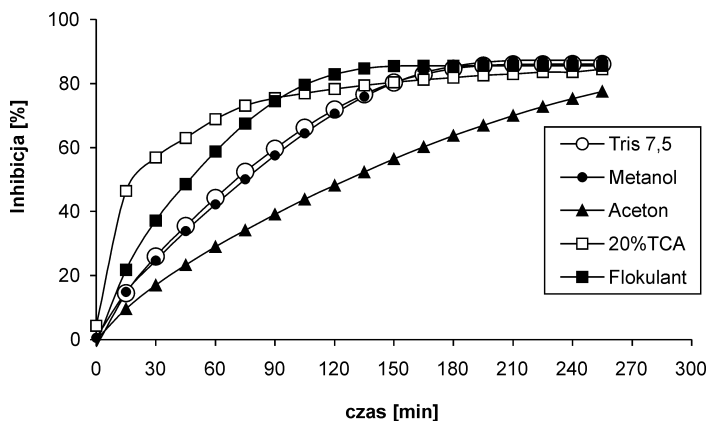
$A_{C(t)}$  – absorbancja próby po czasie t.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie badaniem potencjału antyoksydacyjnego żywności pochodzenia roślinnego. Właściwości takie posiadają zarówno związki obecne w nasionach roślin, jak i w wielu warzywach oraz owocach. Aktywność antyutleniająca może polegać na neutralizowaniu wolnych rodników inicjujących procesy utleniania, terminatorów łańcuchowych reakcji rodnikowych, mogą również działać jako czynniki chelatujące jony metali katalizujących procesy utleniania.

Wobec różnorodnych mechanizmów działania stosowane są wielorakie metody oznaczania potencjału antyoksydacyjnego. Bardzo często, szczególnie wobec naturalnych składników żywności, badana jest ich zdolność „zmiatania” wolnych rodników, generowanych z kwasu 2,2'-azobis-(3-etylobenzotiazolo-6-sulfonowego) (8) lub z 2,2'-difenylo-1-pikrylohydrazylu (6). Powszechnie uważa się, że za właściwości antyutleniające odpowiedzialne są głównie obecne w roślinach związki fenolowe. Jednak *Amarowicz* i współpr. (9) opierając się na swoich badaniach nie stwierdzili prostej zależności pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną ekstraktów z nasion wielu roślin strączkowych, a zawartością związków fenolowych. Naturalnymi substancjami ograniczającymi liczbę wolnych rodników poprzez pełnienie funkcji promotora rozkładu nadtlenczków i zdolność wiązania metali

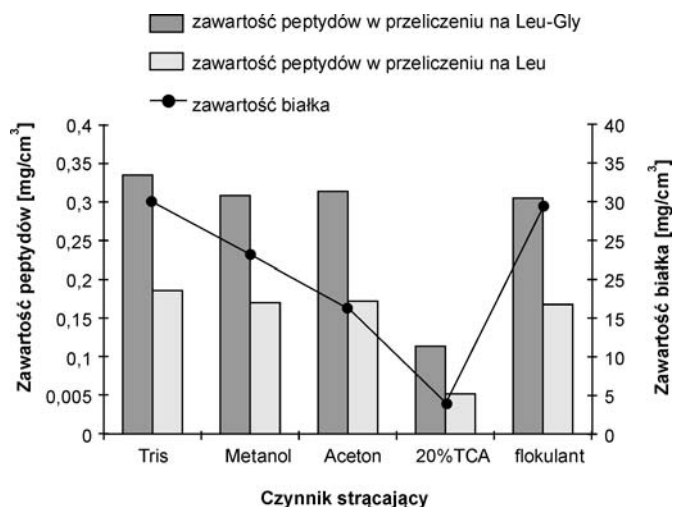
ciężkich mogą być, obecne również w roślinach strączkowych peptydy. Uwaga większości badaczy skupiona jest na oznaczaniu właściwości antyoksydacyjnych peptydów jako produktów hydrolizy preparatów białkowych. W wyniku hydrolizy białek izolatów z fasoli i grochu następował wzrost właściwości antyutleniających w pracach przedstawionych przez *Wołosiak* i współpr. (10). Odwrotną zależność uzyskali *Wu* i współpr. (11) hydrolizatów białek makreli. *Chen* i współpr. (1) w wyniku hydrolizy sojowej  $\beta$ -konglicyniny otrzymali sześć peptydów, które wykazywały antyoksydacyjną aktywność. *Amarowicz* i *Shahidi* (12) uzyskali w wyniku hydrolizy białek ryb (*Mallotus villosus*), żyjących w przybrzeżnych wodach Nowej Fundlandii, cztery peptydowe frakcje, z których jedna wykazywała wyraźny antyoksydacyjny charakter, dwie kolejne posiadały słabsze właściwości, a czwarta wykazywała wręcz prooksydacyjne właściwości. Większość autorów badając możliwości antyutleniające składników żywności pochodzenia roślinnego lub ziół stosują do ich izolowania rozpuszczalniki polarne. W pracy oznaczano właściwości antyutleniające w izolatach otrzymanych z fasoli szparagowej buforem Tris-HCl i w ekstraktach uzyskanych po wytrącaniu białek różnymi czynnikami. Aktywność antyrodnikowa oznaczona wobec DPPH<sup>\*</sup>, ekstraktów izolowanych buforem Tris-HCl o pH 7,5 z fasoli i wytrąconych różnymi czynnikami, rosła wraz z wydłużaniem czasu reakcji (ryc. 1). Po 30 min. inkubacji procent inhibicji wynosił: 50% dla próby po zastosowaniu 20% TCA, 36% po zastosowaniu flokulanta, 30% dla ekstraktu otrzymanego za pomocą buforu Tris-HCl, 25% po wytrąceniu białek metanolem, a 17% acetonem. Najwyższy procent inhibicji uzyskano po 240 min. w przypadku metanolu jako czynnika strącającego (87%), flokulanta (85%), 20% TCA (84%) i najniższy po zastosowaniu acetonu (78%) (ryc. 1).



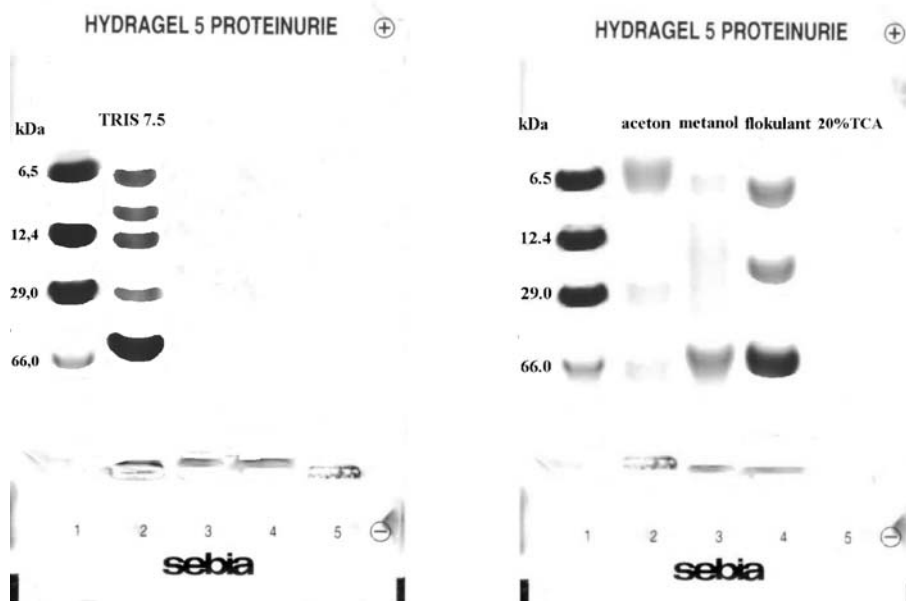
Ryc. 1. Zmiany aktywności antyrodnikowej w zależności od zastosowanych czynników do wytrącania białek.

Fig. 1. Changes of anti-radical activity depending on the kind of employed protein precipitant.

Zdolności neutralizowania wolnych rodników we wszystkich analizowanych próbach uzależnione były od czasu trwania reakcji oraz czynnika zastosowanego w procesie wytrącania białek. Nie znaleziono prostej zależności pomiędzy stężeniem peptydów czy białek, a zdolnością antyrodnikową ekstraktów z fasoli szparagowej. Zawartość pozostałego białka i peptydów w ekstraktach po wytrąceniu różnymi czynnikami była największa w przypadku zastosowania flokulanta, a najmniejsza po zastosowaniu 20% TCA (ryc.2).



Ryc. 2. Zawartość białka i peptydów w ekstraktach otrzymanych z fasoli szparagowej.  
Fig. 2. Protein and peptide content of extracts obtained from green bean.



Ryc. 3. Elektroforetyczny rozdział białek wyekstrahowanych: a) za pomocą buforowego roztworu Tris-HCl pH 7,5; b) wytrąconych: acetonem, metanolem, flokulantem i 20% TCA.

Fig. 3. Electrophoretic separation of proteins extracted with a) Tris-HCl pH 7,5 buffer; b) precipitated with acetone, methanol and flocculant and 20% TC.

Uzyskane wartości inhibicji wolnych rodników DPPH<sup>•</sup> osiągające w większości analizowanych prób ponad 80%, są porównywalne, a nawet wyższe od wartości otrzymywanych dla polifenoli, typowych roślinnych antyutleniaczy. Wysoka ak-

tywność antyrodnikowa charakteryzowała białka izolatów z fasoli i grochu, otrzymanych przez *Wołosiak* i współpr. (10), przy czym izolaty z fasoli okazały się skuteczniejsze w działaniu. Produkty hydrolizy białek makreli w badaniach *Wu* i współpr. (11) również efektywnie (w ok. 80%) neutralizowały rodniki DPPH<sup>•</sup>. Wyraźny antyoksydacyjny charakter wykazywały frakcje peptydowe otrzymane przez *Karaś* (13) w wyniku rozdziłu na kolumnie chromatograficznej metodą IMAC ekstraktów uzyskanych z fasoli szparagowej 1% TCA.

Otrzymane w pracy najlepsze efekty neutralizacji wolnych rodników DPPH<sup>•</sup> dla związków wyekstrahowanych buforem świadczą o tym, że w procesie neutralizacji wolnych rodników najbardziej aktywne są białka o określonej wielkości molekuł. Przeprowadzone rozdziały elektroforetyczne wykazały różnice w oddziaływaniach pomiędzy białkami wyekstrahowanymi buforem Tris-HCl a testowanymi czynnikami, zastosowanymi do ich wytrącania (ryc. 3).

W ekstraktach, które odznaczały się niższą zdolnością antyrodnikową, obecne były białka o masie cząsteczkowej większej od 12, a mniejszej od 29 kDa (ryc. 3). Na podstawie otrzymanych elektroforegramów białek straconych różnymi czynnikami stwierdzono, że zastosowanie 20% TCA powoduje wytrącenie białka o masie większej od 6,5 kDa. Obok wielkości cząstek o ich możliwościach neutralizowania wolnych rodników może decydować również zawartość poszczególnych aminokwasów.

W tab. I przedstawiono skład aminokwasowy frakcji ekstrahowanej buforem Tris-HCl pH 7,5. Próba zawierała najwięcej w mg: kwasu asparaginowego – 17,98; histydyny – 12,88; fenyloalaniny – 10,31; leucyny – 8,96 i w mniejszej ilości pozostałe aminokwasy (tab. I).

Tab e l a I. Skład aminokwasowy liofilizowanego ekstraktu z fasoli szparagowej

Table I. Aminoacid composition in freeze-dried green bean extracts

Aminokwas	Masa AA (mg/g)	% odzyskanych aminokwasów	Aminokwas	Masa AA (mg/g)	% odzyskanych aminokwasów
Asp	17,98	16,35	His	12,88	11,71
Thr	7,81	7,1	Lys	6,59	6,0
Ser	7,28	6,62	Arg	6,97	6,34
Glu	7,33	6,66	Cys	1,80	1,64
Pro	2,12	1,93	Met	3,84	3,49
Gly	4,10	3,73	Suma	110	100
Ala	4,09	3,72	cykliczne	10,31	9,37
Val	4,07	3,7	siarkowe	5,64	5,13
Ile	3,87	3,52	hydrofilowe	66,84	60,76
Leu	8,96	8,15	hydrofobowe	27,21	24,74
Phe	10,31	9,37			

*Chen* i współpr. (2) analizując strukturę i właściwości peptydów sojowych, jak i ich syntetycznych analogów stwierdzili, że ich antyoksydacyjny charakter zależał od obecności i położenia niektórych aminokwasów (głównie histydyny i proliny)

w łańcuchu polipeptydowym. Szczególnie wysoką antyutleniającą aktywność wykazywały te peptydy, których C-końcowym aminokwasem była histydyna. Również *Rival* i współpr. (14) w oparciu o badania przeprowadzone nad aktywnością antyoksydacyjną kazeiny wołowej i produktów jej enzymatycznej hydrolizy potwierdzili, że potencjał antyoksydacyjny peptydów jest uzależniony od ich struktury. Nawet zamiana jednego aminokwasu w analogicznych łańcuchach peptydowych powoduje zmiany zdolności neutralizowania wolnych rodników. Dowodzą tego badania *Lin* i współpr. (15), którzy porównywali proces inhibitowania rodników, generowanych przez 2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochlorek (AAPH) przez dwa syntetyczne peptydy o właściwościach opioidalnych.

### WNIOSKI

1. Czynniki zastosowane do usuwania związków wysokocząsteczkowych z ekstraktu białek i peptydów obecnych w fasoli szparagowej, rozpuszczalnych w pH 7,5 znacznie różnicuje skład jakościowy i ilościowy otrzymanego roztworu.

2. Liczba wyekstrahowanych peptydów była zależna od zastosowanego czynnika w procesie wytrącania białek.

3. Peptydy izolowane z fasoli szparagowej posiadają zdolność neutralizowania wolnych rodników, która determinowana jest wielkością ich molekuł.

4. Zdolność antyrodnikowa ekstraktów z fasoli szparagowej nie była uzależniona od poziomu peptydów czy białek.

M. Karaś, B. Baraniak

#### ANTIRADICAL ACTIVITY OF EXTRACTS OBTAINED IN THE PROCESS OF ISOLATION OF GREEN BEAN PEPTIDES

##### Summary

Frozen pods of the *Fana* dwarf green bean were examined. Peptides were isolated from extract prepared with Tris-HCl and proteins were coagulated with methanol, acetone, 20% trichloroacetic acid and cationic flocculant Magnafloc M-22S, and the characteristics of the resultant fractions were noted. Protein and peptide content was assayed, electrophoretic separation was performed, aminoacid composition was determined, and the antiradical activity (expressed as percent inhibition) was assessed in the resultant extracts. The antiradical activity according to DPPH test in all samples was dependent on reaction time, agent used for protein precipitation, and on peptide content. The highest inhibition was obtained after 240 min. incubation with methanol precipitant followed by flocculant, 20% TCA, and the lowest activity was noted after acetone treatment.

### PIŚMIENNICTWO

1. *Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F.*: Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, 1995; 43: 574-578. – 2. *Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K.*: Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digest of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, 1996; 44: 2619-2623. – 3. *Bradford M.*: A rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248-254. – 4. *Habeeb A.*: Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.*, 1966; 14: 328-336. – 5. *Adler-Nissen*

J.: Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 1979; 27: 1256-1262. – 6. *Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C.*: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wissu. Technol.*, 1995; 28: 25-30. – 7. *Von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.*: Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus Linearis*),  $\alpha$ -tocopherols, BHT and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 1997; 45(3), 632-638. – 8. *Worobiej E., Klepacka M.*: Białka roślin strączkowych jako inhibitory rodników hydroksylowych. Materiały XXX Sesji Naukowej KTChŻ PAN, Kraków 1999; 139. – 9. *Amarowicz R., Troszyńska A., Karmać M., Kozłowska H.*: Antioxidative properties of legume seed extracts. (w:) *Agri-Food Quality*, ed. *Fenwick G.R., Hedley C., Richards R.L., Khokhar S.*: The Royal Society of Chemistry, 1996: 376-379. – 10. *Wotosiak R., Klepacka M.*: Antioxidative properties of albumins in enzymatically catalyzed model systems. *EJPAU*, 2002; 5.

11. *Wu H.C., Chen H-M., Shiau C.Y.*: Free amino acid and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 2003; 36: 949-957. – 12. *Amarowicz R., Shahidi F.*: Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates, *Food Chem.*, 1997; 58: 355-359. – 13. *Karaś M.*: Anti-free-radical properties of the peptide fractions isolated from string bean by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, *Protein&Peptide Letters*, 2007; 14: 447-454. – 14. *Rival S., Boeriu C., Wichers H.*: Caseins and casein hydrolysates. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J.Agric. Food Chem.*, 2001; 49(1): 295-302. – 15. *Lin X., Yang D.J., Cai W.Q., Zhao Q.Y., Gao Y.F., Chen Q., Wang R.*: Endomorphins, endogenous opioid peptides, provide antioxidant defense in the brain against free radical-induced damage. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003; 1639: 195-202.

Adres: 20-950 Lublin, ul. Skromna 8.