



# Aktywność antyutleniająca albumin grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*) fermentowanego w bioreaktorze z wymuszonym napowietrzaniem i mieszaniem (SSSR)

Hanna Miskiewicz, Stanisław Bielecki

Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

## Antioxidative properties of albumins of (*Pisum sativum*) fermented in Swing Solid State Reactor (SSSR)

### Summary

The albumins isolated from the fermented *P. sativum* were characterized in terms of aromatic hydrophobicity of their surface and thiol group content. Their antioxidative activity for free radicals, such as ABTS<sup>+</sup>, DPPH\* and hydroxyl ones as well as the effects of oxidation processes on albumin structure were determined. The preparations of *P. sativum* albumins were characterized by low aromatic hydrophobicity of surface and contained relatively large amounts of SH groups as compared to ovalbumin. The activity of *P. sativum* albumins for the free radicals was doubled by fermentation. The free radicals applied for the studies caused polymerization of proteins with higher molecular mass and fragmenting of that with lower molecular mass.

### Key words:

*Pisum sativum* albumins, antioxidants, *Rhizopus oligosporus*, SSSR.

### Adres do korespondencji

Hanna Miskiewicz,  
Instytut Biochemii  
Technicznej,  
Politechnika Łódzka,  
ul. Strfanowskiego 4/10,  
90-924 Łódź.

## 1. Wstęp

Reakcje wolnorodnikowe, inicjowane przez reaktywne formy tlenu, zachodzące podczas przetwarzania i przechowywania żywności obniżają jej jakość żywieniową i sensoryczną. Zmianom tym zapobiega się przez dodatek przeciwutleniaczy syntetycznych takich jak BHT i BHA. Obecnie z uwagi na ograniczone

możliwości stosowania ich do żywności wynikające z ich toksycznego działania, wzrosło zainteresowanie naturalnymi przeciwutleniaczami pochodzenia roślinnego takimi jak: polifenole, tokoferole, karotenoidy, kwas askorbinowy, a także wykazujące dobre właściwości przeciwutleniające peptydy i białka (1). Stwierdzono, że białka roślinne efektywnie zmiatają wolne rodniki. Zdolność inhibowania reakcji wolnorodnikowych związana jest głównie z obecnością w białkach histydyny, lizyny, cysteiny i argininy (2).

W białkach roślin strączkowych główną frakcją stanowią globuliny (ok. 70%), reszta to albuminy. Albuminy PA<sub>1</sub> i PA<sub>2</sub> o masach cząsteczkowych odpowiednio 8 kDa i 22 kDa stanowią 34% białek frakcji albumin i są bogate w aminokwasy siarkowe oraz lizynę. Oprócz białek PA<sub>1</sub> i PA<sub>2</sub>, frakcja albuminowa zawiera lektyny i inhibitory proteaz (3). Albuminy strączkowych (różnych odmian grochu i fasoli) wykazują dobre właściwości przeciwrodnikowe, porównywalne z BHT (4).

Białka chroniąc przed skutkami utleniania inne składniki żywności same ulegają modyfikacjom. Proces utleniania wpływa na ich strukturę (fragmentacja, polimeryzacja) i związane z nią właściwości żywieniowe. Zmienione oksydacyjnie białka są zazwyczaj bardziej podatne na działanie enzymów trawiennych (5). Zaobserwowano również pogorszenie strawności utlenionych białek (3).

Głównym celem pracy było zbadanie wpływu procesu fermentacji *Pisum sativum* w bioreaktorze z wymuszonym napowietrzaniem i mieszaniem (SSSR) na aktywność przeciwrodnikową preparatów albumin otrzymanych z prób fermentacyjnych, w trzech modelowych układach oksydacyjnych i porównanie jej z albuminami zwierzęcymi oraz z syntetycznym przeciwutleniaczem BHT.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Materiał biologiczny

W procesie fermentacji stosowano szczep *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 pochodzący z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej. Szczep przechowywano na skosach dekstrozowo-agarowych w temperaturze 4°C, uaktywiając co miesiąc. Inokulum przygotowano przez zmycie skosów agarowych ze szczepem *R. oligosporus* 4 cm<sup>3</sup> 0,1% roztworu Tween 80. Otrzymaną zawiesiną spor o gęstości 10<sup>6</sup> jtk/cm<sup>3</sup> (1 cm<sup>3</sup> /100 g) szczepiono złożę.

### 2.2. Produkcja tempe

Nasiona *P. sativum* Lens Agra pochodzące ze zbioru 2001 r., zakupione w firmie handlowej UNGERT, moczo w 0,85% roztworze kwasu mlekowego (1:3 w/v, nasio-

na : roztworu kwasu) całą noc w temp. pokojowej, obłuszczano ręcznie, autoklawowano i inokulowano zawiesiną spor, w ilości 1% (v/w). Fermentację nasion prowadzono w fermentorze SSSR niemieckiej firmy Tec-Bio w warunkach zoptymalizowanych we wcześniejszych badaniach (wypełnienie bioreaktora 70%, napowietrzanie 5,0 l/min·kg), w temp. 37°C, w ciągu 72 godz. (6).

### 2.3. Preparaty albumin fermentowanego *P. sativum*

Albuminy izolowano z alkalicznych ekstraktów (pH 9,2) liofilizowanych prób fermentacyjnych *P. sativum* po 0, 24, 48 i 72 godzinach procesu, na drodze dializy wobec wody dejonizowanej (72 godziny, ok. 8°C). Zastosowano woreczki dializacyjne firmy Sigma o odcięciu 12 kDa. Powstały osad globulin oddzielano przez odwirowanie, a uzyskany supernatant stanowił roztwór albumin stosowany do badań (7).

### 2.4. Metody analityczne

Białko rozpuszczalne oznaczano metodą Bradforda (8), wyniki odczytywano z krzywej wzorcowej dla albuminy wołowej.

Charakterystykę preparatów albumin prowadzono oznaczając hydrofobowość powierzchniową aromatyczną w jednostkach FI (*fluorescence intensity* – natężenie fluorescencji) przez pomiar fluorescencji po reakcji z 8-anilino-1-naftaleno kwasem sulfonowym (ANSA, Sigma) przy długości fali wzbudzenia-390 nm, emisji-470 nm (9), zawartość grup sulfhydrylowych przez pomiar absorpcji (380 nm) po reakcji z 2,2'-ditiobis(5-nitropyrydyną)-DTNP (7) oraz rozdziały elektroforetyczne na żelach poliakrylamidowych z SDS. Masy cząsteczkowe preparatów albumin ustalano metodą SDS-PAGE stosując bufor lizujący, zawierający 5% v/v 2-merkaptoetanolu i 15% żele poliakrylamidowe (10). Rozdział elektroforetyczny białek prowadzono w aparacie Mini-Protean 3, firmy BIO-RAD. Żele barwiono roztworem zawierającym metanol, lodowaty kwas octowy i woda (5:1:4) oraz 0,25% Coomassie Brilliant Blue R.

Właściwości przeciwutleniające ekstraktów albumin badano wobec stabilnych syntetycznych rodników DPPH\*, kationorodników ABTS<sup>+</sup> oraz rodników OH<sup>-</sup> wytworzonych z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pod wpływem jonów Cu<sup>2+</sup>, w obecności katalizatora ditionoerytritolu (11,12). Miarą aktywności przeciwutleniającej albumin był stopień redukcji rodników (%), obliczony jako [(absorbancja próby kontrolnej – absorbancja próby badanej) / (absorbancja próby kontrolnej) × 100].

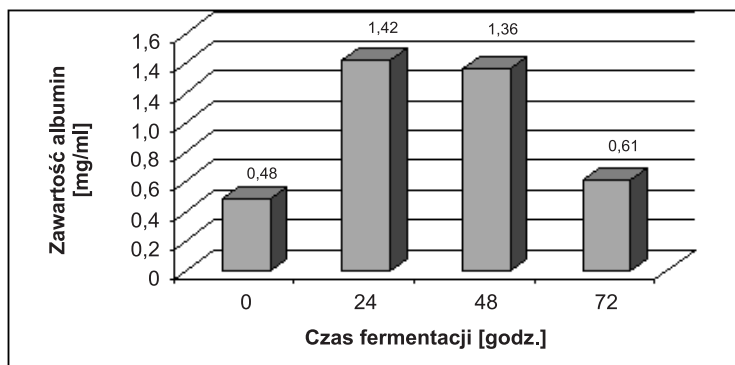
Zmiany albumin pod wpływem rodników śledzono stosując rozdziały elektroforetyczne z SDS.

### 3. Wyniki i dyskusja

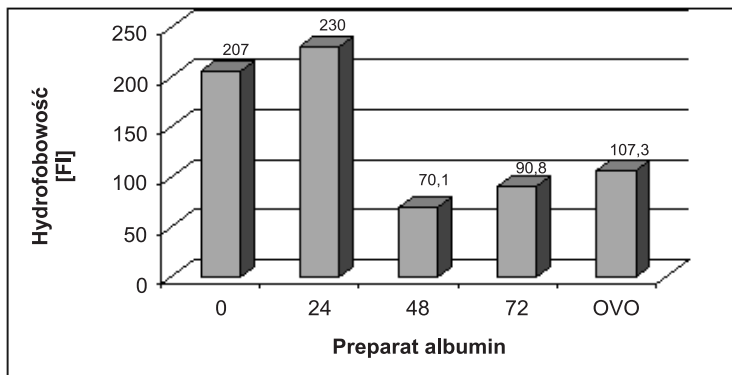
Zawartość albumin w ekstraktach fermentowanego *P. sativum* wahała się w zakresie od 0,48 mg/ml w próbie wyjściowej do 1,42 mg/ml w próbie po 24 godzinach procesu (rys. 1). W produkcie – po 72 godzinach fermentacji zawartość ich spadła do 0,61 mg/ml, ale nadal była wyższa od zawartości albumin w surowcu. Jest to zjawisko korzystne z punktu widzenia żywieniowego, ponieważ albuminy w porównaniu z pozostałymi białkami nasion zawierają znaczną ilość tryptofanu – drugiego po metioninie aminokwasu ograniczającego wartość odżywczą białek nasion roślin strączkowych. Ponadto zawierają znaczne ilości lizyny i treoniny.

Tendencje do obniżania poziomu albumin w nasionach po moczeniu i 48-godzinnej fermentacji przy udziale *R. oligosporus* zauważono we wcześniejszych badaniach dotyczących grochu. Ubytki albumin były jednakże stosunkowo niewielkie i nie miały negatywnego wpływu na strawność białek *in vitro* (12).

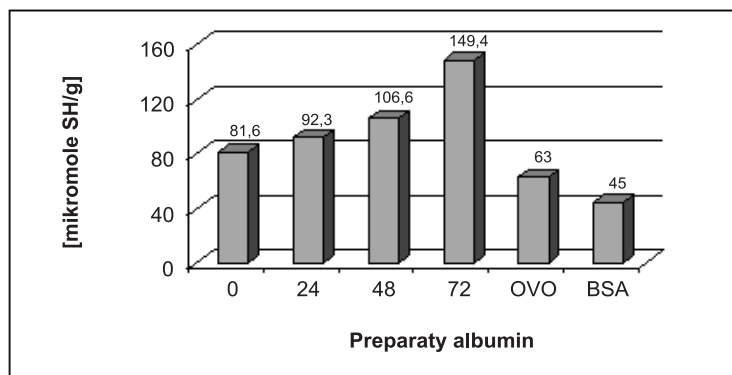
Bardzo istotne znaczenie w technologii żywności ma hydrofobowość powierzchniowa, gdyż wpływa ona na funkcjonalne właściwości białka – jest głównym współczynnikiem jego rozpuszczalności. Wynika ona z liczby niepolarnych reszt aminokwasów rozmieszczonych na powierzchni jego cząsteczki. Białka o małej hydrofobowości łatwo rozpuszczają się w środowisku wodnym. Albuminy pochodzenia roślinnego charakteryzują się niską hydrofobowością powierzchniową aromatyczną. W badanych próbach wynosiła ona odpowiednio dla albumin wyizolowanych z nasion przygotowanych do fermentacji – 207 FI, po 24 godzinach wzrosła do 230 FI i na końcu procesu osiągnęła wartość ok. 91 FI, nieco niższą od hydrofobowości powierzchniowej oznaczonej dla albuminy jaja kurzego (107 FI) (rys. 2). Parametr ten dla albumin zwierzęcych jest dużo wyższy i np. dla BSA wynosi 7800 FI, a dla albuminy ludzkiej 7337 FI. Porównywalne wartości hydrofobowości powierzchniowej aromatycznej dla albumin białej (357 FI), ciemnej (209 FI) odmiany grochu oznaczył Wołosiak (7).



Rys. 1. Wpływ procesu fermentacji na zawartość albumin w ekstraktach *P. sativum* fermentowanego w SSSR.



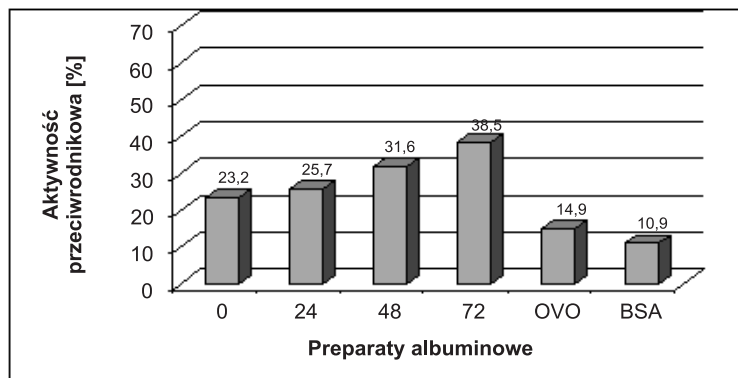
Rys. 2. Hydrofobowość powierzchniowa aromatyczna preparatów albumin *P. sativum* po 0, 24, 48 i 72 godzinach fermentacji i albuminy jaja kurzego.



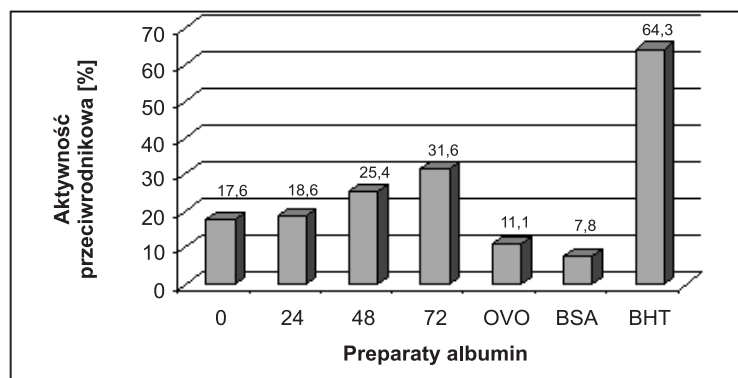
Rys. 3. Zawartość grup sulfhydrylowych w preparatach albumin *P. sativum* po 0, 24, 48 i 72 godzinach fermentacji, albuminy jaja kurzego i BSA.

Zawartość grup sulfhydrylowych w białkach wydzielanych z nasion poddawanych fermentacji rosła w czasie całego procesu od ok. 82 do 150 mikromoli SH/g, i w produkcie była ponad 2-krotnie wyższa od zawartości grup SH w albuminie jaja kurzego i ponad 3-krotnie w BSA (rys. 3). Również wyższe zawartości grup SH oznaczył Wołosiak w albuminach nasion białej i brązowej odmiany fasoli oraz białej i ciemnej odmiany grochu w porównaniu z ovoalbuminą i BSA, albumina ludzka jako jedyna z albumin zwierzęcych miała podobną zawartość grup SH jak w nasionach roślin strączkowych (7). Wysoką zawartość grup SH w wymienionych albuminach potwierdzają również oznaczenia innych badaczy (13).

Aktywność przeciwrodnikową otrzymanych preparatów albumin badano w stosunku do trzech rodzajów wolnych rodników:  $ABTS^+$ ,  $DPPH^*$  i  $OH\cdot$  i porównywano ją z aktywnością albuminy jaja kurzego, wołowej oraz BHT (rys. 4,5,6).



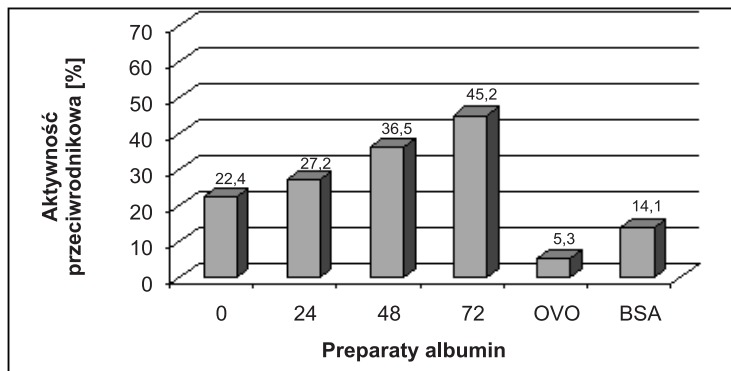
Rys. 4. Dezaktywacja kationorodników ABTS<sup>+</sup> przez preparaty albumin *P. sativum* po 0, 24, 48 i 72 godzinach fermentacji, albuminy jaja kurzego i BSA.



Rys. 5. Dezaktywacja rodników DPPH\* przez preparaty albumin *P. sativum* po 0, 24, 48 i 72 godzinach fermentacji, albuminy jaja kurzego, BSA i BHT.

Fermentacja *P. sativum* w SSSR korzystnie modyfikowała albuminy surowca powodując 1,7-krotne zwiększenie ich zdolności zmiatania kationorodników ABTS<sup>+</sup>. Po 72 godzinach procesu aktywność przeciwrodnikowa albumin była ok. 3-krotnie wyższa od aktywności przeciwrodnikowej owoalbuminy i prawie czterokrotnie od BSA (rys. 4).

Aktywność przeciwrodnikowa badanych preparatów albumin *P. sativum* również wobec wolnych, syntetycznych rodników DPPH\* wzrosła w wyniku fermentacji (1,8-krotnie) i w produkcie była ok. 3-krotnie wyższa od aktywności oznaczonej dla owoalbuminy, ponad 4-krotnie dla BSA i 2-krotnie niższa od aktywności syntetycznego przeciwutleniacza BHT (rys. 5).

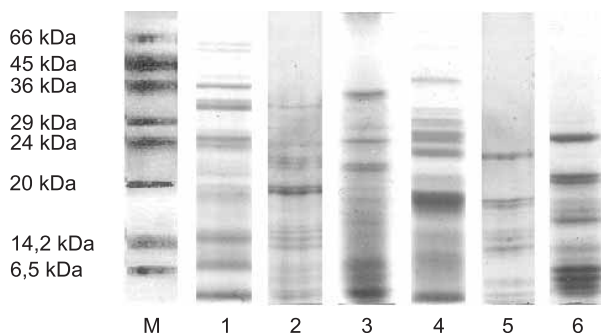


Rys. 6. Dezaktywacja rodników OH<sup>•</sup> przez preparaty albumin *P. sativum* po 0, 24, 48 i 72 godzinach fermentacji, albuminy jaja kurzej i BSA.

Największy (2-krotny) wzrost aktywności przeciwrodnikowej w procesie fermentacji *P. sativum* uzyskano wobec rodników wodorotlenowych (rys. 6). Otrzymany produkt charakteryzował się prawie 9-krotnie wyższą aktywnością przeciwutleniającą w stosunku do owoalbuminy i 3-krotnie do BSA.

Podobne wyniki w badaniach właściwości antyutleniających albumin suchych nasion grochu i fasoli w porównaniu do owoalbuminy i BSA otrzymał Wołosiak (4,7).

SDS-PAGE preparatów albumin wyizolowanych z *P. sativum* poddanych działaniu wolnych rodników DPPH<sup>\*</sup> i OH<sup>•</sup> obrazowały zmiany w obrazach elektroforetycznych tych białek wskazujące na ich fragmentację, szczególnie wyraźnie w przypadku białek niskocząsteczkowych i polimeryzację – wysokocząsteczkowych (rys. 7).



Rys. 7. SDS-PAGE preparatów albumin wyizolowanych z *P. sativum*: M – markery o masach kolejno: 6,5; 14,2; 20; 24; 29; 36; 45; 66 kDa. (1) próba wyjściowa, (2) próba wyjściowa + DPPH<sup>\*</sup>, (3) próba wyjściowa + OH<sup>•</sup>, (4) po 24 godz. fermentacji (5) po 24 godz. fermentacji + DPPH<sup>\*</sup>, (6) po 24 godz. fermentacji + OH<sup>•</sup>.

W badaniach wpływu rodników hydroksylowych na białka fasoli prowadzonych przez Worobiej wykazano nieznaczny ich fragmentację szczególnie frakcji o m. cz. 45 kDa, oraz tworzenie się nowych frakcji o wyższym ciężarze cząsteczkowym ok. 80 kDa, których brak było w białku nie poddanym fragmentacji (14).

#### 4. Wnioski

Przedstawione wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Otrzymane preparaty albumin z fermentowanego *P. sativum* charakteryzowały się niską hydrofobowością powierzchniową, aromatyczną i zawierały stosunkowo dużo grup SH w porównaniu z ovoalbuminą i BSA. Zaobserwowano dobrą korelację pomiędzy zawartością grup sulfhydrylowych a aktywnością przeciwrodnikową.

2. Proces fermentacji *P. sativum* w bioreaktorze z mieszaniem i wymuszonym napowietrzaniem korzystnie wpływał na aktywność przeciwrodnikową albumin, wyizolowanych z prób fermentacyjnych, zwiększając ją ok. dwukrotnie w stosunku do próby wyjściowej wobec trzech stosowanych wolnych rodników: ABTS<sup>+</sup>, DPPH\* i OH<sup>-</sup>.

3. Badane preparaty albumin najlepsze działanie wykazywały wobec rodników wodorotlenowych. Zastosowane rodniki powodowały polimeryzację białek o wyższych masach cząsteczkowych i fragmentację o niższych.

4. Aktywność tych preparatów była wyższa od aktywności albuminy jaja kurzego i BSA oraz niższa od syntetycznego przeciwutleniacza BHT.

Praca wykonana w ramach Projektu Zamawianego nr AR 73/25/PBZ/021/P06/25/2001.

#### Literatura

1. Worobiej E., (2001), XXXII Sesja Naukowa KtiChŻ PAN, Warszawa, materiały konferencyjne.
2. Yamamoto Y., Kato E., Ando A., (1996), Biosci. Biotech. Biochem., 60, 1430-1433.
3. Sanchez-Vioque R., Vioque J., Clemente A., Pedroche J., Bautista J., Millan F., (1999), J. Agric. Food Chem., 47, 813-818.
4. Wołosiak R., Klepacka M., (2001), XXXII Sesja Naukowa KtiChŻ PAN, Warszawa, materiały konferencyjne.
5. Hunt J. V., Simpson J. A., Dean R. T., (1988), Biochem. J., 250, 87-93.
6. Miszkiewicz H., Rozwandowicz A., Bielecki S., (2004), Chem. Pap., 58(6), 424-428.
7. Wołosiak R., Klepacka M., (2002), EJPAU, 5, 11.
8. Bradford M., (1976), Anal. Biochem., 72, 248-254.
9. Hayakawa S., Nakai S., (1985), J. Food Sci., 50, 486-491.
10. Laemmli U. K., (1970), Nature, 227, 680-685.
11. Chen H. M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K., Nokihara K., (1998), J. Agric. Food Chem., 46, 49-53.
12. Miller N., Rice-Evans C., Davies M., Gopinathan V., Milner A., (1993), Clinical Science, 84, 407-412.
13. Flaczyk E., (1995), Roczn. AR Pozn. CCLXX, Technol. Żywn., 19, cz. 2, 67-72.
14. Worobiej E., Klepacka M., (1999), XXX Sesja Naukowa KtiChŻ PAN, Kraków, materiały konferencyjne.