

ELWIRA WOROBIJ, RAFAŁ WOŁOSIAK, MARTA CHWALISZ

WŁAŚCIWOŚCI BIAŁEK PREPARATÓW CZĘŚCI BIAŁKOWEJ JAJA W PROCESIE UTLENIANIA

Streszczenie

W pracy badano właściwości przeciwutleniające podstawowych frakcji białek części białkowej jaja kurzego (owoalbuminy, lizozymu) oraz preparatów handlowych białka jaja i albumin (żelującej i pianistej). Badano też modyfikacje białek spowodowane autooksydacją kwasu linolowego.

Badane preparaty handlowe wykazały dobrą aktywność przeciwutleniającą wobec rodników $\bullet\text{OH}$, natomiast nieco słabiej działały jako inhibitory autooksydacji kwasu linolowego. Lizozym wykazał lepsze właściwości przeciwutleniające niż owoalbumina.

Zmiany białek pod wpływem działania nadtlenu kwasu linolowego badano przez pomiar zmian zawartości tryptofanu i powstających w wyniku utleniania pochodnych karbonylowych. Wyniki wskazują, że białka jaja uczestniczące w inhibicji utleniania kwasu linolowego ulegają zmianom wynikającym z modyfikacji oksydacyjnej wchodzących w ich skład aminokwasów (m.in. degradacja tryptofanu).

Słowa kluczowe: białka jaja kurzego, przeciwutleniacze, nadtlenu kwasu linolowego, utlenianie białek

Wprowadzenie

Białka jaja kurzego mają różnorodne właściwości funkcjonalne, takie jak: żelowanie, koagulowanie, tworzenie i stabilizowanie piany oraz utrzymywanie wody, dzięki czemu znalazły szerokie zastosowanie jako dodatki do żywności [12]. Są wykorzystywane w serowarstwie (sery dojrzewające), przemyśle mięsnym (mięso i ryby w stanie surowym, pasztety, pieczenie, kiełbasy, konserwy mięsne), w ciastkarstwie, cukiernictwie artykułów piankowych, przy produkcji piwa, wina, miodów pitnych, a także w przemyśle tłuszczowym (oleje). Łatwość otrzymywania preparatów białkowych z jaja kurzego stanowi dodatkową zaletę ich zastosowania.

Dr inż. E. Worobiej, dr inż. R. Wołosiak, mgr inż. M. Chwalisz, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

Wykorzystanie białek jaja kurzego jako dodatków funkcjonalnych wzbogaca równocześnie wartość odżywczą żywności. Białka te charakteryzują się, bowiem kompleksowym składem aminokwasowym, mają bardzo dobrą strawność i są łatwo przyswajalne przez organizm człowieka.

Wyniki ostatnich badań wykazały, że białka pochodzące z różnych surowców mogą pełnić ponadto rolę naturalnych przeciwutleniaczy. Ich obecność zabezpiecza przed niekorzystnymi zmianami i stratami składniki żywności w procesie utleniania, szczególnie lipidy [15, 16, 17]. Działając jako przeciwutleniacze białka mogą ulegać jednocześnie licznym zmianom (modyfikacja reszt aminokwasów, fragmentacja lub tworzenie poprzecznych wiązań i agregacja białek), które skutkują obniżeniem ich wartości biologicznej [4, 6, 14].

Celem niniejszej pracy było określenie właściwości przeciwutleniających preparatów handlowych białka jaja i albuminy (żelującej i piennej) oraz wybranych frakcji białek części białkowej jaja kurzego (owoalbuminy, lizozymu), a także określenie wpływu procesu utleniania na białka.

Materiał i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły preparaty handlowe białek części białkowej jaja - albumina piana, albumina żelująca, białko jaja w proszku (Zakłady Jajczarskie „Ovopol”) oraz standardy białek - owoalbumina (Sigma) i lizozym (Fluka).

Charakterystyka białek preparatów obejmowała oznaczenie:

- powierzchniowej hydrofobowości aromatycznej białek metodą z kwasem 8-anilino-1-naftalenosulfonowym (ANSA, Sigma) przez pomiar intensywności fluorescencji przy $\lambda_{wz} = 390$ nm i $\lambda_{em} = 479$ nm,
- zawartości dostępnych grup sulfhydrylowych w reakcji z 2,2'-ditiobis(5-nitro-pirydyną) (DTNP, Sigma) metodą spektrofotometryczną przy $\lambda = 386$ nm,
- zdolności chelatowania jonów żelaza(II) metodą spektrofotometryczną z ferrozyną przy $\lambda = 562$ nm,
- rozdział elektroforetyczny frakcji na żelach poliakrylamidowych z SDS [8].

Aktywność przeciwutleniającą białek części białkowej jaja oznaczano wobec rodników hydroksylowych, a także nadlenków w emulsji kwasu linolowego. Rodniki $\cdot\text{OH}$ wytwarzano w mieszaninie zawierającej Cu(II)/H₂O₂/benzoesan sodu/DTET [5]. Na podstawie wartości intensywności fluorescencji ($\lambda_{wz} = 308$ nm i $\lambda_{em} = 410$ nm) powstających w reakcji hydroksylowych pochodnych benzoesanu obliczano aktywność przeciwrodnikową preparatów wobec $\cdot\text{OH}$ [%].

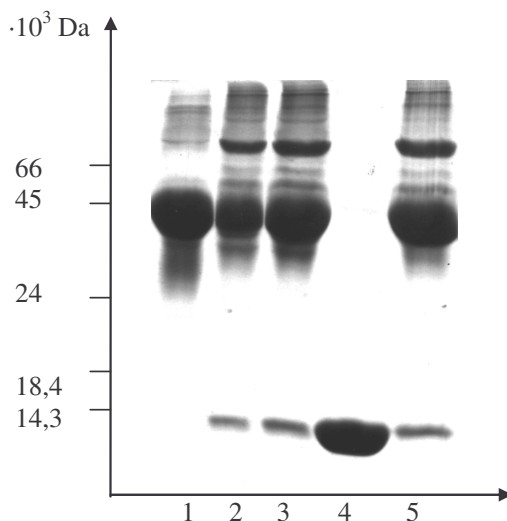
Właściwości przeciwutleniające białek wobec nadlenków wytwarzanych w reakcji katalizowanej hemoglobina w emulsji kwasu linolowego badano metodą spektrofotometryczną z tiocyjanianem amonu przy $\lambda = 480$ nm [7], również przeliczając uzyskane wyniki absorbancji na aktywność wyrażoną w [%].

Zmiany białek w wyniku działania nadtlenków kwasu linolowego monitorowano po określonym czasie (0, 1, 3, 7, 14 dniach) inkubacji próbek w temp. 60°C poprzez pomiar zmian intensywności fluorescencji tryptofanu ($\lambda_{wz} = 282$ nm i $\lambda_{em} = 331$ nm) oraz pochodnych karbonylowych białek ($\lambda_{wz} = 350$ nm i $\lambda_{em} = 450$ nm) [13].

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statgraphics Plus 3.0, obliczając współczynniki korelacji liniowej oraz statystyczną istotność różnic między wartościami średnimi (test LSD).

Wyniki i dyskusja

Na podstawie rozdzielów elektroforetycznych (rys. 1) wykazano, że w skład białek preparatów handlowych białka jaja i albumin (żelującej i pianistej) wchodziły frakcje o m.cz.: $14,3 \cdot 10^3$ Da (lizozym), $45 \cdot 10^3$ Da (owoalbumina), oraz kilka frakcji powyżej $66 \cdot 10^3$ Da, między innymi owotransferyna o m. cz. $76 \cdot 10^3$ Da [12], która w warunkach denaturujących rozdziela się elektroforetycznie w nieco niższym zakresie masy [11]. W elektroforegramie preparatu wysoko oczyszczonej owoalbuminy widoczna jest charakterystyczna frakcja tego białka o m. cz. $45 \cdot 10^3$ Da, oraz śladowe ilości frakcji powyżej $66 \cdot 10^3$ Da.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

1 – albumina jaja / egg albumin; 2 – albumina żelująca / gelling albumin; 3 – albumina pianista / foaming albumin; 4 – lizozym / lysozyme; 5 – białko jaja w proszku / egg white powder

Rys. 1. Elektroforetyczny rozdział preparatów białek jaja.

Fig. 1. Gel electrophoresis patterns of egg white protein preparations.

W hamowaniu procesu utleniania lipidów, według Tonga i wsp. [15], ważną rolę pełnią grupy sulfhydrylowe białek. Wykazują one zdolność rozkładania wodoronadtlenków oraz wygaszania wolnych rodników. Zawartość dostępnych grup tiolowych (tab. 1) kształtowała się na podobnym poziomie w badanych preparatach białek jaja (22–25 μM -SH/g białka), z wyjątkiem lizozymu (ok. 10 μM -SH/g białka). Lizozym charakteryzował się również najniższą (5-krotnie niższą w porównaniu z oczyszczoną frakcją owoalbuminy) powierzchniową hydrofobowością aromatyczną (tab. 1). Wielkości hydrofobowości preparatów białka jaja oraz albuminy żelującej były zbliżone i nieco wyższe od standardu albuminy. Najwyższą, spośród badanych preparatów handlowych białek, powierzchniową hydrofobowość aromatyczną stwierdzono w przypadku albuminy pianistej. Mogło to być spowodowane dodatkiem substancji powierzchniowo czynnej (TEC – ester trietylowy kwasu cytrynowego) podczas produkcji preparatu albuminy pianistej, co poprzez obniżenie polarności środowiska wpłynęło na rozwinięcie struktury białka i zwiększenie dostępności aminokwasów hydrofobowych.

Tabela 1

Charakterystyka białek preparatów części białkowej jaja.
The characteristic of egg white protein preparations.

Preparat Preparation	Zawartość dostępnych grup tiolowych [μmole -SH/g białka] Available thiol groups content	Powierzchniowa hydrofobowość aromatyczna [j.u. FI/g białka] Aromatic surface hydrophobicity	Chelatowanie jonów żelaza(II) [μmole Fe/g białka] Fe(II) ions chelating
Owoalbumina Egg albumin	21,66	2477,77	n.w*
Albumina żelująca Gelling albumin	22,11	2939,93	36,50
Albumina pianista Foaming albumin	24,96	3642,12	36,44
Lizozym Lysozyme	9,88	477,83	32,33
Białko jaja w proszku Egg white powder	24,19	2862,92	47,88

*n.w. – nie wykazano / not indicated

Katalizatorem reakcji utleniania są jony metali przejściowych m.in. jony żelaza, które przyspieszają zarówno proces tworzenia rodników tlenowych, jak i nadtlenków kwasów tłuszczowych oraz ich dalsze przemiany. Wykazano, że lepszą zdolnością wiązania jonów żelaza charakteryzował się preparat białka jaja (ok. 48 μM Fe/g białka) w porównaniu z preparatami albumin żelującej i pianistej (ok. 36 μM Fe/g białka). Na podstawie tych wyników i uzyskanych w rozdziałach elektroforetycznych można stwierdzić, że zdolność do wiązania jonów żelaza mają preparaty zawierające w swoim składzie owotransferynę – białko wykazujące dobre właściwości chelatujące [2], a także lizozym. Natomiast wysoko oczyszczona albumina jaja, w preparacie której nie występują wyżej wymienione frakcje białek, w zastosowanych warunkach oznaczenia nie wykazała właściwości chelatujących.

Preparaty handlowe albumin mają zbliżone wartości aktywności antyrodnikowej (63–64%), natomiast w przypadku wysoko oczyszczonej albuminy jaja uzyskano o połowę niższą zdolność do inaktywacji rodników hydroksylowych (tab. 2). Preparat białka jaja wykazał aktywność przeciworodnikową na poziomie ok. 50%. Najwyższą aktywnością dezaktywacji rodników hydroksylowych charakteryzował się preparat lizozymu (82%).

Tabela 2

Aktywność przeciwutleniająca białek preparatów części białkowej jaja.
Antioxidant activities of the egg white preparation of white part of an egg.

Preparat Preparation	Aktywność wobec rodników $\bullet\text{OH}$ [%] Activity against $\bullet\text{OH}$	Aktywność wobec nadtlenczków [%] Activity against peroxides
Owoalbumina Egg albumin	36,9 \pm 0,8	37,8 \pm 0,1
Albumina żelująca Gelling albumin	64,1 \pm 0,9	35,2 \pm 0,1
Albumina pianista Foaming albumin	62,6 \pm 1,5	43,5 \pm 0,1
Lizozym Lysozyme	81,7 \pm 1,1	87,0 \pm 0,0
Białko jaja w proszku Egg white powder	51,48 \pm 0,6	62,9 \pm 0,1

Nie stwierdzono dodatniej korelacji między aktywnością antyrodnikową badanych preparatów białek wobec rodników hydroksylowych a ich zdolnością do

chelatowania jonów żelaza. Nie wykazano również zależności pomiędzy aktywnością a zawartością dostępnych grup tiolowych – chelatorów jonów miedzi [10].

Preparat handlowy białka jaja był efektywniejszym przeciwutleniaczem wobec nadtlenków (63%) niż preparaty albumin (35-45%), z których wyższą aktywność wykazywała albumina pienista (tab. 2). Preparaty albumin są uszlachetnioną odmianą białka w proszku, w produkcji których stosuje się proces odcukrzania metodą enzymatyczną z dodatkiem H_2O_2 . W wyniku reakcji utleniania pod wpływem H_2O_2 część aminokwasów, charakteryzujących się dobrymi właściwościami przeciwutleniającymi wobec nadtlenków, uległa prawdopodobnie modyfikacji, zmniejszając przez to skuteczność działania preparatów w inhibicji reakcji autooksydacji kwasu linolowego.

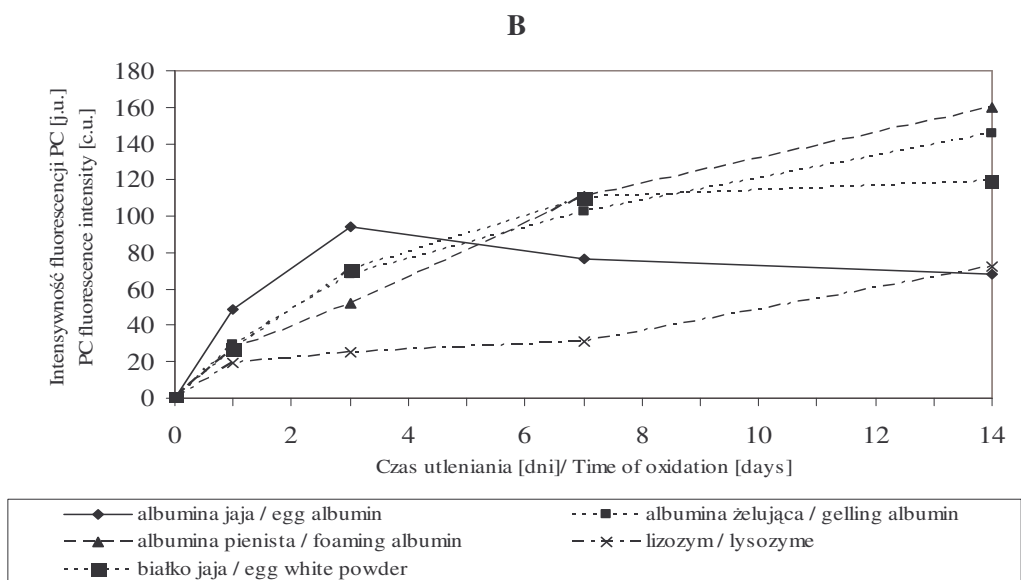
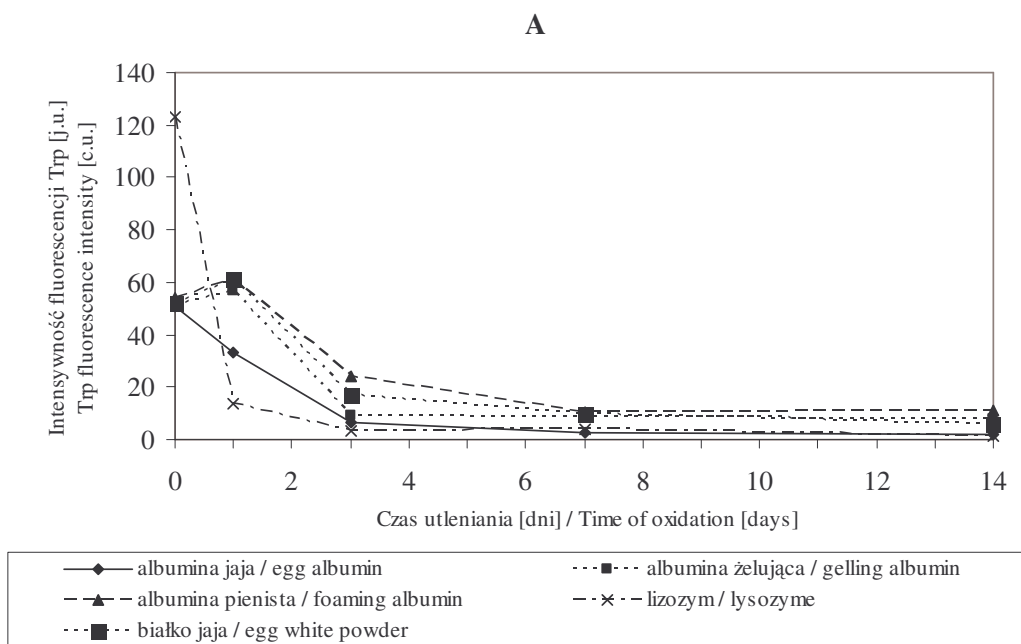
Lizozym, pomimo najmniejszej wśród badanych preparatów białek jaja powierzchniowej hydrofobowości aromatycznej, wykazał najlepszą zdolność do hamowania utleniania emulsji kwasu linolowego (87%). Może to wynikać z dużej zawartości w jego cząsteczce aminokwasów alifatycznych (walina, leucyna, alanina, glicyna) [1], decydujących o hydrofobowości alifatycznej białka, która również zapewnia zdolność do inhibicji procesu utleniania. Chen i wsp. [3] stwierdzili, że obecność hydrofobowych aminokwasów alifatycznych (waliny i leucyny) na N-końcu łańcucha peptydowego ma wpływ na właściwości przeciwutleniające peptydów wyizolowanych z białek soi.

Zmiany w białkach zachodzące pod wpływem reakcji utleniania kwasu linolowego przedstawiono na rys. 2A i 2B.

W pierwszej dobie inkubacji preparatów albuminy żelującej i albuminy pienistej z nadtlenkami kwasu linolowego następował wzrost intensywności fluorescencji Trp (rys. 2A). Mógł on być spowodowany zmianami konformacyjnymi cząsteczki białka i odsłonięciem aminokwasów (w tym tryptofanu), które w stanie natywnym są ukryte wewnątrz cząsteczki. W standardach owoalbuminy i lizozymu od początku inkubacji następowało zmniejszanie zawartości tryptofanu. Kolejne dni inkubacji powodowały istotne zmniejszenie zawartości tego aminokwasu we wszystkich preparatach do zbliżonego poziomu.

Od pierwszej doby inkubacji, aż do ostatniego dnia utleniania stwierdzono znaczny wzrost zawartości pochodnych karbonylowych pod wpływem działania nadtlenków kwasu linolowego w preparatach albuminy żelującej i albuminy pienistej oraz w preparatach białka jaja (rys. 2B). W preparacie lizozymu następował mniej intensywny wzrost poziomu pochodnych karbonylowych w porównaniu z pozostałymi badanymi preparatami. Próbką owoalbuminy charakteryzowała się natomiast całkowicie niespecyficznym przebiegiem zmian zawartości pochodnych karbonylowych w czasie inkubacji z nadtlenkami kwasu linolowego. Po początkowym

wzroście zawartości (do 3. dnia przechowywania) następowało zmniejszenie poziomu pochodnych karbonylowych (w 7. i 14. dniu inkubacji).



Rys. 2. Zmiany zawartości tryptofanu (A) i pochodnych karbonylowych (B) w preparatach części białkowej jaja pod wpływem reakcji utleniania kwasu linolowego.

Fig. 2. The changes of tryptophan (A) and carbonyl derivatives (B) content in the egg white preparations upon linoleic acid oxidation reaction.

Wnioski

1. Preparaty handlowe części białkowej jaja wykazały dobrą aktywność przeciwrodnikową wobec $\cdot\text{OH}$, nieco słabiej działały natomiast wobec nadtlenków w procesie autooksydacji kwasu linolowego.
2. Najskuteczniejsze działanie w zapobieganiu reakcji utleniania kwasu linolowego spośród preparatów handlowych stwierdzono w przypadku preparatu białka jaja.
3. Lizozym wykazał lepsze właściwości przeciwutleniające w porównaniu z główną frakcją białek jajka – owoalbuminą.
4. Badanie zmian zachodzących w białkach pod wpływem nadtlenków kwasu linolowego wykazało istotną degradację tryptofanu we wszystkich preparatach, przy czym najintensywniej proces ten zachodził w przypadku lizozymu.
5. Największy przyrost pochodnych karbonylowych, będących produktami modyfikacji oksydacyjnej aminokwasów, stwierdzono w przypadku preparatów handlowych albumin.

Praca była prezentowana na XI Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Warszawa, 24–25 maja 2006.

Literatura

- [1] Belitz H.-D., Grosh W.: Food Chem.. Ed. Springer, 1999.
- [2] Beltran E., Pla R., Yuste Y., Mor-Mur M.: Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries. *Meat Sci.*, 2004, **66**, 719-725.
- [3] Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F.: Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 574-578.
- [4] Davies K.J.A., Delsignoret M. E., Lin S. W.: Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 9902-9907.
- [5] Hunt J.V., Simpson J.A., Dean R.T.: Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins. *Biochemistry J.*, 1988, **250**, 87-93.
- [6] Kamin-Belsky N., Brillon A.A., Arav R., Shaklai N.: Degradation of myosin by enzymes of the digestive system: comparison between native and oxidative cross-linked protein. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 1641-1646.
- [7] Kuo J.M., Yeh D.B., SunPan B.: Rapid photometric assay evaluating activity in edible plant material. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3206-3209.
- [8] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- [9] Larson R.A.: The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 1988, **27**, 969-978.

- [10] Lippard S.J., Berg J.M.: Podstawy chemii bionieorganicznej. PWN. Warszawa 1998.
- [11] Matsudomi N., Takasaki M., Kobayashi K.: Head - induced aggregation of lysozyme with ovotransferrin. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, **55**, 1651-1653.
- [12] Mine Y.: Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends Food Sci. Technol.*, 1995, **6**, 225-232.
- [13] Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R.: *Techniques in free radical research*, Ed. Elsevier. Amsterdam 1991.
- [14] Sanchez-Vioque P., Vioque A., Pedroche J., Bautista J., Millan F.: Interaction of chickpea (*Cicer arietinum* L.) legumin with oxidized linolic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 813-818.
- [15] Tong L.M., Sasaki S., McClenents D.J., Decker E.A.: Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 1473-1478.
- [16] Ulu H.: Effect of wheat flour, whey protein concentrate and soya protein isolate on oxidative processes and textural properties of cooked meatballs. *Food Chem.*, 2004, **87**, 523-529.
- [17] Wołosiak R., Worobiej E., Aktywność antyoksydacyjna izolatu i hydrolizatów białek grochu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1999, **3 (20) Supl.** 105-111.

THE PROPERTIES OF EGG WHITE PROTEIN PREPARATIONS IN AN OXIDATION PROCESS

S u m m a r y

Antioxidant properties of egg white proteins were investigated in this study: main fractions (ovalbumin, lysozyme), commercial preparations (gelling and foaming albumin, egg white proteins). The protein modifications caused by acid autoxidation were also studied.

The commercial preparations investigated exhibited good antioxidant activity against the radicals, but were worse linoleic acid autoxidation inhibitors. Lysozyme showed better antioxidative properties than ovalbumin.

The protein change under linoleic acid peroxides were determined by the measurement of tryptophan and protein carbonyls content changes. The results indicate that an egg proteins participating in the inhibition of linoleic acid oxidation undergo changes resulting from the oxidative modification of their amino acid (tryptophan degradation).

Key words: egg white proteins, antioxidants, linoleic acid peroxides, protein oxidation ☒