

Anna Jędrusek-Golińska, Józef Korczak, Wojciech Białas*, Marzanna Heś, Anna Gramza
Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, Katedra Technologii Żywnienia Człowieka
* Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Właściwości przeciwutleniające hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej otrzymanych w różnych warunkach hydrolizy

Antioxidant activity of protein hydrolysates from defatted rapeseed meal obtained in various conditions of hydrolysis

Słowa kluczowe: hydrolizaty białkowe, śruta rzepakowa, hydroliza kwasowa, warunki hydrolizy kwasowej, aktywność przeciwutleniająca hydrolizatów

Celem pracy było poddanie śruty rzepakowej hydrolizie z użyciem kwasu solnego w różnych warunkach oraz porównanie właściwości przeciwutleniających uzyskanych hydrolizatów. Zmienne warunki hydrolizy obejmowały różne stężenia kwasu solnego oraz czas procesu przy stałej temperaturze podczas hydrolizy oraz stałym stopniu neutralizacji uzyskanych hydrolizatów.

Hydrolizaty scharakteryzowano pod względem zawartości azotu ogólnego, azotu α -aminowego, soli, polifenoli, popiołu, suchej masy, cukrów prostych oraz barwy. Aktywność przeciwutleniającą oszacowano w oparciu o metody zmiatania rodnika DPPH^{*}, zdolność chelatowania jonów metali i siłę redukującą. Obliczono korelacje między aktywnością przeciwutleniającą wykazywaną przez hydrolizaty w przedstawionych metodach oraz ich składem chemicznym.

Key words: protein hydrolysates, rapeseed meal, acid hydrolysis, conditions of acid hydrolysis, antioxidant activity of hydrolysates

The aim of the study was to produce the protein hydrolysates from defatted rapeseed meal by hydrochloric acid hydrolysis in various conditions and to compare the antioxidant activity of the obtained hydrolysates. Various conditions of hydrolysis concern concentration of the used hydrochloric acid (4.5 and 6 M) and the time of the process (6 and 12 h). The temperature of the hydrolysis (105°C) and the degree of neutralization (pH 5.5) were constant.

The contents of total nitrogen, amino nitrogen, salt, polyphenols, ash, dry matter, monosaccharides, and color were determined in the hydrolysates. The antioxidant activity was evaluated by using scavenging effect of DPPH^{*}, chelating activity and reducing power methods. The correlations between scavenging effect of DPPH^{*}, chelating activity, reducing power and the composition of the hydrolysates were calculated.

The obtained results indicate that the protein hydrolysates from defatted rapeseed meal showed good antioxidant activity in used methods, depending first of all on the time of hydrolysis. Higher antioxidant activity show the products hydrolysed in shorter time (6 h). The antioxidant activities of the protein hydrolysates are correlated with the level of Maillard reactions products ($r = 0.9237$, $p < 0.001$ for scavenging effect of DPPH^{*} and $r = 0.8774$, $p < 0.05$ for reducing power) and polyphenols included in them ($r = 0.9842$, $p < 0.05$ for reducing power). The protein hydrolysates from defatted rapeseed meal could be taken into consideration as natural antioxidants in food production to limit fat oxidation.

Wstęp

Właściwości przeciwutleniające hydrolizatów białkowych związane są z występowaniem w nich aminokwasów i peptydów, produktów reakcji Maillarda, a także związków fenolowych odpornych na hydrolizę oraz będących produktami degradacji ligniny. Sumaryczny efekt przeciwutleniający takiej mieszaniny zależy od składu ilościowego i jakościowego związków powstałych w wyniku fragmentacji surowca białkowego, ilości i rodzaju polifenoli oraz wtórnych reakcji zachodzących podczas hydrolizy w środowisku kwaśnym (Bishov i Henick 1972, Korczak i in. 1998, Moon i in. 2002, Pham i Rosario 1983a, b).

Aminokwasy i peptydy wykazują zróżnicowany wpływ na kinetykę utleniania tłuszczów. Na ich aktywność przeciwutleniającą wpływa wiele czynników. W literaturze opisuje się kilka mechanizmów działania tych związków jako przeciwutleniaczy. Mogą one rozkładać nadtlenki na drodze nierodnikowej dzięki obecności bardzo reaktywnej grupy aminowej (lizyna) albo przekształcać je do nieaktywnych pochodnych hydroksylowych (metionina, cysteina, cystyna). Zachodzące przy pomocy aminokwasów regenerowanie przeciwutleniaczy pierwszorzędowych wiąże się z odtwarzaniem z rodników przeciwutleniaczy aktywnych, zredukowanych form wyjściowych. Osiąga się w ten sposób nasilenie lub znaczące wydłużenie działania przeciwutleniaczy pierwszorzędowych. Aminokwasy i peptydy wykazują ponadto zdolność chelatowania metali oraz wygaszania tlenu singletowego (Ahmad i in. 1983, Seher i Löscher 1986, Taylor i Richardson 1980).

Złożony przebieg reakcji Maillarda oraz jej zależność od wielu czynników sprawiają, że niemożliwe jest jednoznaczne wskazanie składników charakteryzujących się właściwościami przeciwutleniającymi. Na podstawie przeprowadzonych rozdziałów mieszaniny PRM wykazano, że aktywność przeciwutleniającą wykazują związki o różnej masie cząsteczkowej oraz budowie chemicznej, w tym nawet składniki lotne (Elizalde i in. 1992). PRM mogą hamować procesy utleniania poprzez zmiatanie wolnych rodników lipidowych, np. hydroksylowych, chelatowanie metali, regenerowanie przeciwutleniaczy pierwszorzędowych, wygaszanie tlenu singletowego do stanu tripletowego czy inaktywację enzymów utleniających, np. oksydazy polifenolowej i oksydazy ksantanowej (Brun-Merimee i in. 2004, Korczak 1998, Yen i Hsieh 1995, Wijewickreme i in. 1997, Wijewickreme i in. 1999).

Właściwości przeciwutleniające polifenoli warunkuje ich budowa, tj. występowanie w ich cząsteczkach grup fenolowych powiązanych z węglami pierścienia aromatycznego. Po oddaniu wodoru, związki polifenolowe łatwo przechodzą w bardzo reaktywne rodniki fenoksyłowe, które są stabilizowane przez przemieszczanie się niesparowanych elektronów w pierścieniu aromatycznym (Sokół-Łętowska i Oszmiański 1998, Wilska-Jeszka 1999). Grupy alkilowe i hydroksylowe zwiększają reaktywność polifenoli w stosunku do rodników lipidowych i przyczyniają się do wzrostu stabilności rodników fenolowych (Decker 1998). Polifenole mogą

oddziaływać jako przeciwutleniacze na jednej lub kilku z możliwych dróg: jako substancje redukujące, jako związki zmiatające wolne rodniki, poprzez tworzenie kompleksów z metalami katalizującymi reakcje utleniania, poprzez unieczynnianie tlenu singletowego i tym samym ograniczanie jego zdolności do zapoczątkowania wolnorodnikowych reakcji łańcuchowych czy też poprzez hamowanie aktywności enzymów utleniających, np. lipooksygenaz (Shahidi i Naczek 2004, Sokół-Łętowska i Oszmiański 1998).

Przeciwutleniające działanie hydrolizatów białkowych związane jest z obecnością w nich związków polifenolowych, wolnych aminokwasów i peptydów oraz produktów reakcji Maillarda. Zmienne warunki hydrolizy warunkują stopień rozpadu białka na peptydy i aminokwasy, powstanie produktów reakcji Maillarda oraz zawartość polifenoli, które mogą być częściowo uwalniane z połączeń z białkami, jak również degradowane. Stąd celowe wydawało się podjęcie próby takiego doboru warunków hydrolizy kwasowej śruty rzepakowej, by otrzymane z niej hydrolizaty posiadały jak najlepsze właściwości przeciwutleniające.

Material i metody

Do badań wykorzystano ciemnonasienną odmianę rzepaku Kana, pochodzącą z Hodowli Roślin „Strzelce” Oddział Borowo. Nasiona rozdrobniono, a następnie odtłuszczono w aparacie Soxhleta przy użyciu eteru naftowego, uzyskując w ten sposób odtłuszczone śrutę rzepakową. Śrutę poddano hydrolizie kwasowej, ogrzewając ją z dodatkiem kwasu solnego pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 105°C. Zastosowano cztery warianty hydrolizy obejmujące zmienny czas procesu, tj. 6 i 12 godzin, oraz stężenie katalizatora — 4,5 i 6 M HCl. Ilość kwasu solnego dobierano zgodnie z praktyką przemysłową na podstawie zawartości azotu ogólnego w surowcu wyjściowym (Pazoła i in. 1958, Pazoła 1970). Następnie hydrolizaty zobojętniono przy pomocy bezwodnego węgla sodu do pH 5,5. Wszystkie hydrolizaty filtrowano i odbarwiano 2% dodatkiem węgla „Carbopol” CWO-3 i poddawano tzw. procesowi dojrzewania w temperaturze pokojowej w ciągu dwóch tygodni. W tym czasie nabierały one odpowiednich cech smakowych i zapachowych. Po etapie dojrzewania hydrolizaty filtrowano i suszono rozpyłowo. Proces hydrolizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla każdego surowca.

Hydrolizaty scharakteryzowano pod względem zawartości azotu ogólnego, azotu α -aminowego, soli, popiołu, suchej masy, cukrów prostych, polifenoli oraz barwy. Zawartość azotu aminowego oznaczono metodą Spiesa i Chambersa (Spies 1957), która polega na kompleksowaniu wolnych aminokwasów i niskocząsteczkowych peptydów związkami miedzi. Powstałe kompleksy o różnym zabarwieniu przeprowadza się w kompleksy alaniny i mierzy ekstynkcję związków barwnych przy długości fali $\lambda = 620$ nm. Pomiarów dokonano na spektrofotometrze „Spekol 11”

firmy Carl Zeiss Jena. Zawartość polifenoli ogółem oznaczono kolorymetrycznie przy długości fali 750 nm metodą Folina-Ciocalteu (Horwitz 1970). Wyniki analiz przedstawiono jako ekwiwalent stężenia kwasu sinapowego w mg/g hydrolizatu. Chlorki w hydrolizatach oznaczono metodą Mohra (Pluszyński i Bagdach 1967), ekstrahując sól wodą, a następnie miareczkując chlorki mianowanym roztworem azotanu srebra w obecności nasyconego chromianu potasu. Zawartość cukrów prostych (glukozy, ksylozy, galaktozy, mannozy i arabinozy) oznaczono techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) przy użyciu aparatu Merck-Hitachi. Barwę określono poprzez pomiar ekstynkcji roztworów hydrolizatów o zawartości 0,05% azotu ogólnego przy długości fali 420 nm. Obliczono stopień hydrolizy białka jako proporcję azotu aminowego do ogólnego.

Właściwości przeciwutleniające hydrolizatów oszacowano na podstawie zdolności hydrolizatów do zmiatania rodnika DPPH^{*} (1,1 – diphenyl – 2 picrylhydrazyl), aktywności chelatującej i siły redukującej. Zdolność zmiatania rodnika DPPH^{*} określono na podstawie oznaczonych kolorymetrycznie ($\lambda = 517$ nm) zmian stężenia stabilnego rodnika DPPH^{*} wobec próby zerowej (Sanchez-Moreno i in. 1998, Mensor i in. 2001). Wyniki przedstawiono jako aktywność przeciwutleniającą (AA) wyrażoną równaniem:

$$AA [\%] = 100 - \{[(Abs_{\text{próby właściwej}} - Abs_{\text{próby zerowej}}) \times 100] / Abs_{\text{próby kontrolnej}}\}$$

Oznaczenie zdolności chelatowania metali (Tang i in. 2002) polegało na kolorymetrycznym pomiarze stopnia odbarwienia przez roztwory hydrolizatów białkowych kompleksów chlorku żelaza (II) (Merck) z ferrozyną (Sigma). Zastosowano długość fali równą 562 nm. Aktywność chelatującą metali (Ach) wyznaczono z równania:

$$Ach [\%] = \{1 - Abs_{\text{próby właściwej}} / Abs_{\text{próby kontrolnej}}\} \times 100$$

Oznaczenie siły redukującej (RP) roztworów hydrolizatów białkowych polegało na kolorymetrycznym pomiarze stopnia odbarwienia przez hydrolizaty białkowe roztworów żelaza (III). Absorbancję mierzono przy długości fali 700 nm (Oyaizu 1986). Wyniki przedstawiono w przeliczeniu na kwas sinapowy na gram próby. Wartości te odczytano z krzywej wzorcowej, przygotowanej dla kwasu sinapowego.

Wyniki

Skład chemiczny otrzymanych hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej przedstawiono w tabelach 1–3. Wpływ warunków hydrolizy na zmiany zachodzące w białku oceniano na podstawie różnic w zawartości azotu ogólnego, azotu α -aminowego, jak również stopnia hydrolizy (tab. 1). Badano także wpływ wydłużania czasu hydrolizy i zwiększania stężenia kwasu solnego na zawartość soli, popiołu, suchej masy, cukrów prostych, jak również polifenoli i barwy (tab. 2 i 3). Wzrost

stężenia katalizatora nie spowodował większej defragmentacji białka, wskazuje to, że 4,5 M stężenie kwasu solnego jest wystarczające do zhydrolizowania śruty rzepakowej. Zbędne jest zwiększanie jego ilości, bowiem pociąga to za sobą większe zużycie neutralizatora i przez to niekorzystnie wzrasta zawartość soli (Jędrusek-Golińska i in. 2002). Również przedłużenie czasu hydrolizy do 12 godz. nie przyczyniło się do zwiększenia rozpadu białka na aminokwasy określane zawartością azotu aminowego.

Tabela 1

Zawartość azotu ogólnego, azotu α -aminowego i stopień hydrolizy białka w hydrolizatach białkowych otrzymanych ze śruty rzepakowej w różnych warunkach — *The content of total nitrogen, amino nitrogen and degree of hydrolysis in protein hydrolysates obtained from defatted rapeseed meal in various conditions of hydrolysis*

Warunki hydrolizy <i>The conditions of hydrolysis</i>		Azot ogólny <i>Total nitrogen</i> [g/100 g]	Azot α -aminowy <i>Amino nitrogen</i> [g/100 g]	Stopień hydrolizy <i>Degree of hydrolysis</i> [%]
stężenie HCl <i>concentration of HCl</i> [M]	czas <i>time</i> [h]			
4,5	6	0,88 \pm 0,005 ^{b*}	0,68 \pm 0,007 ^a	77,27
	12	0,88 \pm 0,009 ^b	0,68 \pm 0,002 ^a	77,27
6,0	6	0,83 \pm 0,027 ^a	0,65 \pm 0,025 ^a	78,31
	12	0,88 \pm 0,009 ^b	0,68 \pm 0,014 ^a	77,27

* Dane przedstawiają wartości średnie z trzech powtórzeń oraz odchylenie standardowe; wartości oznakowane innymi literami w tej samej kolumnie różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,05$
Data presents mean value from three replicates and standard deviation; data marked by different letter within the same column are significantly different at $p < 0.05$

Tabela 2

Zawartość soli, popiołu i suchej masy oraz barwa hydrolizatów białkowych otrzymanych ze śruty rzepakowej w różnych warunkach — *The content of sodium chloride, ash, dry weight and the colour of protein hydrolysates obtained from defatted rapeseed meal in various conditions of hydrolysis*

Warunki hydrolizy <i>The conditions of hydrolysis</i>		NaCl <i>Salt</i> [%]	Popiół <i>Ash</i> [%]	Sucha masa <i>Solids</i> [%]	Barwa <i>Colour</i> [E ₄₂₀]
stężenie HCl <i>concentration of HCl</i> [M]	czas <i>time</i> [h]				
4,5	6	20,63 \pm 0,792 ^{a*}	21,34 \pm 1,072 ^{ab}	29,23 \pm 0,734 ^a	0,437 \pm 0,2665 ^b
	12	19,94 \pm 0,161 ^a	20,83 \pm 0,176 ^a	28,70 \pm 0,192 ^a	0,193 \pm 0,0024 ^a
6,0	6	22,86 \pm 0,489 ^b	23,57 \pm 0,278 ^{bc}	31,26 \pm 0,698 ^b	0,505 \pm 0,0020 ^b
	12	23,05 \pm 0,737 ^b	23,95 \pm 0,042 ^d	31,83 \pm 0,087 ^b	0,208 \pm 0,0053 ^a

* Objasnienia jak w tabeli 1 — *Explanations as in Table 1*

Tabela 3

Zawartość cukrów prostych i polifenoli w hydrolizatach otrzymanych ze śruty rzepakowej w różnych warunkach — *The content of monosaccharides and polyphenols in the protein hydrolysates obtained from defatted rapeseed meal in various conditions of hydrolysis*

Warunki hydrolizy <i>The conditions of hydrolysis</i>		Glukoza <i>Glucose</i> [g/l]	Arabinoza <i>Arabinose</i> [g/l]	Ksyloza, galaktoza, mannoza <i>Xylose, galactose, mannose</i> [g/l]	Polifenole ogółem <i>Polyphenols</i> [mg/g]
stęż. HCl <i>concentration of HCl</i> [M]	czas <i>time</i> [h]				
4,5	6	4,26 ± 0,382 ^{c*}	0,96 ± 0,107 ^b	1,28 ± 0,187 ^a	0,870 ± 0,0398 ^b
	12	1,35 ± 0,312 ^a	0,58 ± 0,095 ^a	0,82 ± 0,160 ^a	0,452 ± 0,0560 ^a
6,0	6	5,84 ± 0,337 ^d	1,24 ± 0,171 ^c	1,24 ± 0,193 ^a	1,031 ± 0,1104 ^c
	12	2,05 ± 0,101 ^b	0,64 ± 0,081 ^a	1,08 ± 0,095 ^a	0,383 ± 0,0318 ^a

* Objasnienia jak w tabeli 1 — *Explanations as in Table 1*

Zawartość polifenoli w hydrolizatach śruty rzepakowej była sumą ilości tych związków, które nie uległy degradacji podczas hydrolizy, a na którą składały się wolne kwasy fenolowe, kwasy fenolowe uwolnione z połączeń estrowych i glikozydowych, taniny i flawonoidy (Shahidi i Naczek 2004, Zadernowski 1987, Zadernowski i in. 1991). Także ligniny, a przynajmniej ich część rozpuszczalna w kwasach, mogą ulec w badanych warunkach degradacji do związków o charakterze polifenoli (Barclay i in. 1997). Największe zawartości polifenoli uzyskano dla hydrolizy przez 6 godzin przy 6 M stężeniu katalizatora.

Barwa hydrolizatów białkowych powinna zależeć w dużej mierze od zawartości produktów reakcji Maillarda (PRM). Morales i Jimenez-Perez (2001) wykazali, że w miarę upływu czasu zwiększa się natężenie barwy ogrzewanych mieszanin cukrów i aminokwasów. W niniejszych badaniach najciemniejszy kolor miały próby hydrolizowane przez 6 godzin, zarówno 4,5-, jak i 6-molowym kwasem solnym. Analiza statystyczna wykazała silną dodatnią korelację między barwą i zawartością polifenoli ($r = 0,9239$, $p < 0,001$). Można więc sądzić, że barwa hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej nie była pochodną jedynie ilości PRM, ale także zawartości polifenoli. Powstające PRM w pierwszym stadium reakcji są bezbarwne, chociaż mogą charakteryzować się dobrymi właściwościami przeciwutleniającymi (Korczak 1998). Znaczny ubytek cukrów i utworzenie początkowych produktów reakcji Maillarda, zwłaszcza w przypadku glukozy, przy wydłużeniu czasu hydrolizy mógł być z tym związany.

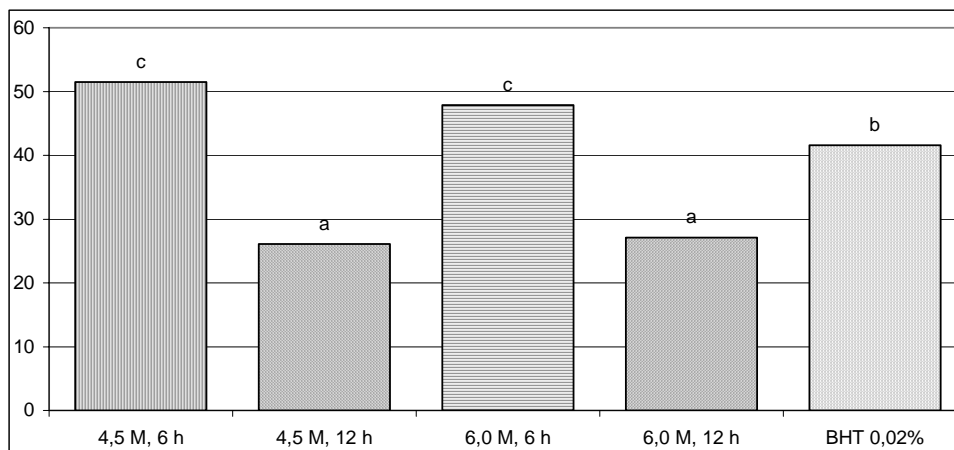
Właściwości przeciwutleniające hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej

Istnieje wiele mechanizmów, zgodnie z którymi przeciwutleniacze zapobiegają czy spowalniają utlenianie. Mogą np. hamować powstawanie wolnych rodników poprzez chelatowanie metali, zmiatać wolne rodniki i w ten sposób zapobiegać inicjacji łańcucha autooksydacji albo przerywać ten łańcuch na etapie propagacji (Frankel 1998, Shi i in. 2001). Aby to ocenić, zastosowano różne metody pomiaru aktywności przeciwutleniającej badanych prób.

a) zdolność hydrolizatów do zmiatania rodnika DPPH[•]

Zmiatanie rodników polega na przerywaniu łańcucha reakcji w wyniku tworzenia stabilnych kompleksów z rodnikami, głównie ponadtlenkowymi, powstającymi w czasie utleniania w fazie propagacji. Efektywność zmiataczy rodników zależy od ich cech chemicznych i fizycznych. Zmiatacz jest tym lepszy, im niższa jest w jego cząsteczce energia wiązania atomu wodoru, dzięki czemu jon ten może być łatwo przyłączony do rodnika. Ważne jest także, aby po odłączeniu wodoru zmiatacz miał energię na tyle niską, by sam nie stał się efektywnym katalizatorem reakcji utleniania i nie wchodził w gwałtowne reakcje z tlenem (Shahidi i Wanasundara 1992). Aktywność przeciwrodnikową wykazują grupy hydroksylowe (np. polifenoli), sulfhydrylowe (np. cysteiny) i aminowe (Decker 1998).

Na rysunku 1 przedstawiono zdolność zmiatania rodników DPPH[•], wyrażoną w procentach, obliczoną dla poszczególnych rodzajów hydrolizatów białkowych. W każdej próbce analizowano wpływ 2 mg hydrolizatu (0,1 ml roztworu o stężeniu 2%) na zdolność zmiatania DPPH[•].



Rys. 1. Wpływ warunków hydrolizy na zdolność zmiatania rodnika DPPH[•] przez 2% roztwory hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej [%] — *The influence of the conditions of hydrolysis on the DPPH[•] scavenging effect of 2% solutions of protein hydrolysates from defatted rapeseed meal [%]*

Najwyższą aktywność w zmiataniu rodników DPPH[•] wykazały hydrolizaty otrzymane przez traktowanie śruty rzepakowej 4,5 M i 6 M kwasem solnym przez 6 godzin. Uzyskane wartości, tj. odpowiednio 51,5 i 47,9% oznaczają, że podczas 30-minutowej inkubacji w ciemności w temperaturze pokojowej, 2% roztwory tych hydrolizatów spowodowały unieczynnienie (zmielenie) ponad połowy wolnych rodników DPPH[•]. Istotnie niższą aktywność przeciwutleniającą wykazały 0,02% BHT oraz hydrolizaty białkowe poddane działaniu 4,5 lub 6 M kwasu solnego przez 12 godzin.

Uzyskane wyniki świadczą o wysokiej aktywności przeciwutleniającej hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej, zwłaszcza tych otrzymanych w wyniku 6-godzinnej hydrolizy, porównywalnej np. z aktywnością ekstraktów herbaty zielonej, oolong i czarnej, których 2 mg dawki zmiatały odpowiednio 59,4, 54,6 i 49,0% rodników DPPH[•] (Yen i Chen 1995). Z kolei frakcje tanin skondensowanych, wyekstrahowane z okrywy owocowo-nasiennej nasion rzepaku canola przez Amarowicza i in. (2000c), w dawce 1 mg dawały efekt zmiatania na poziomie ok. 35%, podczas gdy w przypadku różnych frakcji polifenoli nietaninowych wpływ ten zaznaczał się na poziomie od 6% do 80,7%. Porównanie aktywności przeciwutleniającej rzepaku i canoli, również w dawce 1 mg, wykazało, że niższą zdolność do zmiatania wolnych rodników DPPH[•] posiadały frakcje surowych tanin różnych odmian rzepaku — kształtowała się ona w granicach 35,2–40,7% wobec 44,5–50,5% obliczonych dla wysokotaninowych odmian canoli (Amarowicz i in. 2000a). Wskazuje to na dobre właściwości hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej w zakresie zmiatania wolnych rodników DPPH[•].

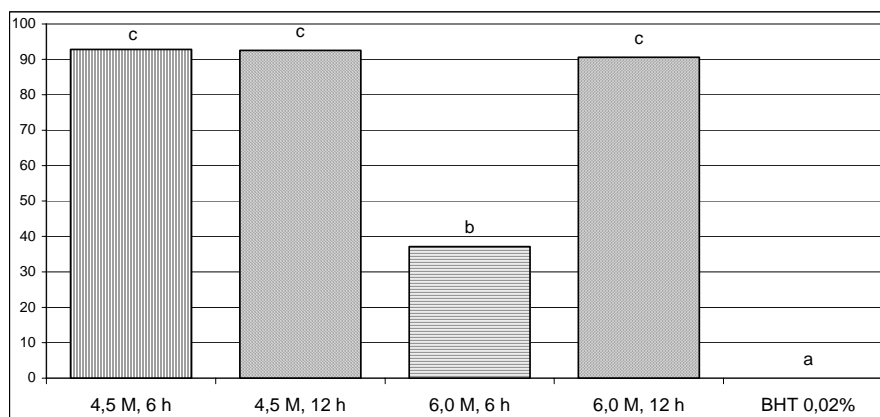
Analiza statystyczna wykazała dodatnią korelację między aktywnością przeciwutleniającą, mierzoną przy pomocy tego testu, a barwą hydrolizatów ($r = 0,9237$, $p < 0,001$). Wskazuje to, że duży udział w zmiataniu wolnych rodników miały PRM, które prawdopodobnie powstały w wyniku reakcji aminokwasów i peptydów z cukrami prostymi, a także z produktami rozpadu włókna pokarmowego. Dodatnią korelację barwy i właściwości przeciwutleniających, szacowanych zdolnością zmiatania wolnych rodników, dla produktów reakcji Maillarda zanotowali Alaiz i in. (1999), a w sosach sojowych także Moon i in. (2002).

Nie wykazano zależności między zdolnością zmiatania rodnika DPPH[•] a zawartością polifenoli oraz azotu ogólnego i aminowego. Przyczyny tego należy upatrywać albo w blokowaniu aminokwasów przez polifenole, albo w niewystarczającym stężeniu aminokwasów. Wg Deckera (1998) aminokwasy, by wykazywać aktywność przeciwrodnikową muszą występować w dużo wyższych stężeniach niż inne zmiatacze, co sugeruje, że nie tyle przerywają one łańcuch reakcji utleniania, co współzawodniczą z lipidami we wchodzeniu w reakcje z rodnikami o dużej energii.

b) zdolność hydrolizatów do chelatowania jonów żelaza

Zdolność chelatowania metali może w znaczący sposób wpływać na przebieg reakcji o charakterze oksydacyjnym, dlatego związki wiążące metale zalicza się do inhibitorów utleniania (Wilska-Jeszka 1999). Należą do nich polifenole, PRM oraz niektóre aminokwasy i białka. Te ostatnie z reguły wiążą żelazo w formie utlenionej (Fe^{3+}).

Szczegółowe wyniki przedstawiające zdolność badanych hydrolizatów do chelatowania jonów żelaza, zestawiono na rysunku 2. W każdej próbce analizowano aktywność chelatującą 20 mg hydrolizatu (1 ml roztworu o stężeniu 2%).



Rys. 2. Wpływ warunków hydrolizy na aktywność chelatującą 2% roztworów hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej [%] — *The influence of the conditions of hydrolysis on the chelating activity of 2% solutions of protein hydrolysates from defatted rapeseed meal [%]*

Analiza zależności wykazała istotny wpływ warunków hydrolizy na zdolność kompleksowania jonów żelaza przez hydrolizaty białkowe czarnonasiennej śrutę rzepakowej. Aktywność chelatująca trzech hydrolizatów była bardzo wysoka i kształtowała się na poziomie 90,6–92,8%. Tylko hydrolizat, otrzymany w wyniku działania na śrutę rzepakową 6 M kwasem solnym przez 6 godzin, ujawnił niższą zdolność chelatowania, utrzymującą się na poziomie 37,1%. Hydrolizat ten charakteryzował się jednocześnie ciemną barwą (tab. 2) i wysoką zawartością glukozy (tab. 3). Sugeruje to, że na efekt przeciwutleniający produktów brązowienia nie-enzymatycznego wpływał rodzaj cukrów wchodzących w reakcję Maillarda. Jak podają Davidek i współpracownicy (1990), produkty interakcji glukozy z aminokwasami wykazują niską aktywność przeciwutleniającą.

Analiza statystyczna nie wykazała korelacji między aktywnością chelatującą a barwą oraz zawartością azotu ogólnego i aminowego w hydrolizatach. Zaobserwowano natomiast wpływ polifenoli, w tym kwasów fenolowych, na kształtowanie właściwości chelatujących hydrolizatów.

Substancją, która uchodzi za wzorcowy chelator metali, jest EDTA. Już w stężeniach bardzo niskich 0,15–0,2 mg kompleksowała ona jony żelaza prawie w 100% (Singh i Rajini 2004, Tang i in. 2002). Z kolei galusan epigalokatechiny w dawce 0,4 mg wykazał aktywność chelatującą na poziomie 38%, a galusan katechiny — na poziomie 19% (Tang i in. 2002). Wodne ekstrakty z łupin ziemniaków w ilości 5 mg chelatowały jony żelaza w 50% (Singh i Rajini 2004). Na tym tle hydrolizaty białkowe śruty rzepakowej wypadają dość dobrze. Wysoką aktywność chelatującą uzyskano dla nich co prawda w wyższych dawkach w porównaniu z wyżej przytoczonymi badaniami, pamiętać jednak należy, że hydrolizaty dodaje się do produktów spożywczych w znacznie wyższych stężeniach i w takich należy rozpatrywać ich wpływ na utlenianie lipidów. Z reguły jest to dodatek na poziomie 2%. Wydaje się, że zastosowanie w produktach żywnościowych takich dodatków hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej dawałoby dobry efekt w zapobieganiu procesom utleniania, katalizowanym przez jony żelaza.

c) siła redukująca hydrolizatów

Redukcja polega na przyłączeniu elektronów, jest więc związana ze zwiększaniem się ładunku ujemnego, czyli z obniżaniem stopnia utlenienia. Z wykorzystaniem tej zasady badano w pracy zdolność hydrolizatów do redukcji jonów żelaza Fe^{3+} .

Stężenia hydrolizatów dobrano tak, by odczyt pochłanianej przez próby fali światła mieścił się w granicach 0,1–0,9 (Szmal i Lipiec 1988). Wyniki, przedstawione w ekwiwalentach kwasu sinapowego, ujęto na rysunku 3. Wydaje się, że zaproponowany sposób podawania danych posiada pewne zalety. Daje np. możliwość porównywania ze sobą wyników uzyskanych dla różnych koncentracji związków o charakterze redukującym w najbardziej wiarygodnym zakresie pomiaru absorpcji. Tym niemniej, dodatkowo, by móc odnieść otrzymane wartości do danych literaturowych, podano także wartości absorpcji dla poszczególnych prób (tab. 4). Pomiaru siły redukującej dokonano dla 10 lub 5 mg prób hydrolizatów (w przypadku roztworów odpowiednio 1 i 0,5%).

Najwyższą wartość siły redukującej zanotowano dla hydrolizatów otrzymanych w wyniku działania na śrutę 4,5 i 6 M kwasem solnym przez 6 godzin, a najniższą — dla prób hydrolizowanych przez 12 godzin (rys. 3).

Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała dodatnią korelację między siłą redukującą a barwą hydrolizatów ($r = 0,8774$, $p < 0,05$) oraz ilością zawartych w nich polifenoli ogółem ($r = 0,9842$, $p < 0,05$). Na tej podstawie można przyjąć, że za właściwości redukujące hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej odpowiadają PRM oraz polifenole. Zaobserwowana silna dodatnia korelacja barwy z ilością polifenoli ($r = 0,9239$, $p < 0,001$) skłania jednak do przypisania polifenolom dużo większej roli w kształtowaniu aktywności redukującej hydrolizatów.

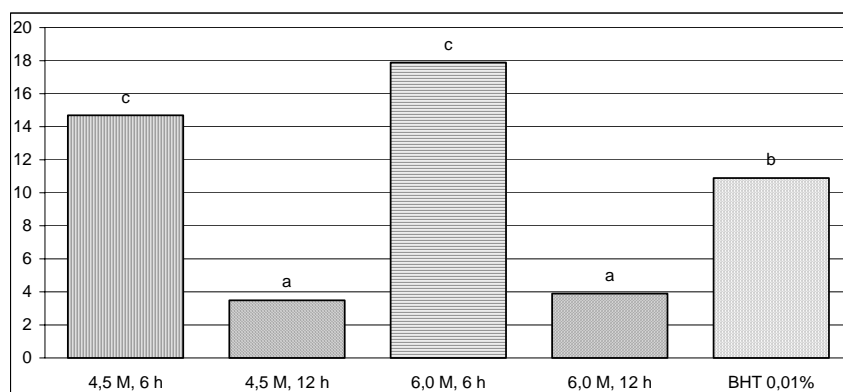
Tabela 4

Wpływ warunków hydrolizy na siłę redukującą 1% roztworów hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej – porównanie dwóch sposobów przedstawiania wyników — *The influence of the conditions of hydrolysis on the reducing power of 1% solutions of protein hydrolysates from defatted rapeseed meal – the comparison of two methods of data presentating*

Warunki hydrolizy <i>The conditions of hydrolysis</i>		Siła redukująca <i>Reducing power</i> [mEq sinapic acid/g hydrolysate]	Absorpcja <i>Absorption</i> [E ₇₀₀]
stężenie HCl <i>concentration of HCl</i> [M]	czas <i>time</i> [h]		
4,5	6	14,7 ± 1,13 ^{c*}	0,361
	12	3,5 ± 0,59 ^a	0,216
6,0	6	17,9 ± 1,72 ^c	0,456 ^{**}
	12	3,9 ± 0,71 ^a	0,228
BHT 0,01%		10,9 ± 0,49 ^a	0,551

* Objaśnienia jak w tabeli 1 — *Explanations as in Table 1*

** Stężenie 0,5%



Rys. 3. Wpływ warunków hydrolizy na siłę redukującą 1% roztworów hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej [mEq kwas sinapowy / g hydrolizatu] — *The influence of the conditions of hydrolysis on the reducing power of 1% solutions of protein hydrolysates from defatted rapeseed meal [mEq sinapic acid. / g hydrolysate]*

Szczegółowe badania, dotyczące określenia siły redukującej polifenoli rzepaku i canoli, wykonali Amarowicz i współpracownicy. Okazało się, że poszczególne frakcje polifenoli rzepaku wykazały zdolność redukcji rosnącą w miarę zwiększania stężenia i w dawce 1 mg dającą absorpcję rzędu 0,6–0,75 (Amarowicz i in. 2003). Siła redukująca ekstraktów surowych tanin z okrywy owocowo-nasiennej rzepaku była niższa (0,3–0,4) niż otrzymanych z canoli (0,7–1,1) (Amarowicz i in.

2000a). Z kolei frakcje oczyszczonych tanin skondensowanych, ekstrahowanych z canoli, wykazały wyższą zdolność redukcji, która już przy dawce 0,5 mg kształtowała się na poziomie 0,8–1,6 (Amarowicz i in. 2000c). Siła redukująca nietaninowych polifenoli wyekstrahowanych z okrywy canoli była również funkcją stężenia. Absorpcja surowego ekstraktu w dawce 1 mg, podobnie jak kwasu sinapowego i ferulowego, wyniosła ok. 0,6, a poszczególnych frakcji — od 0,1 do 0,9 (Amarowicz i in. 2000b).

Wydaje się, że na tym tle siła redukująca hydrolizatów białkowych śruty rzepakowej wypada dobrze. Oszacowana aktywność świadczy o tym, że hydrolizaty są dobrymi donorami elektronów i atomów wodoru. Mogą przerywać łańcuch reakcji rodnikowych poprzez konwersję wolnych rodników do produktów bardziej stabilnych lub reagować z niektórymi prekursorami nadtlenków i w ten sposób zapobiegać powstawaniu nadtlenków (Amarowicz 2000a, b, c, Singh i Rajini 2004, Yen i Chen 1995).

Wnioski

1. Otrzymane hydrolizaty białkowe śruty rzepakowej wykazują dobre właściwości przeciwutleniające.
2. Właściwości przeciwutleniające tych hydrolizatów są skorelowane z poziomem zawartych w nich produktów reakcji Maillarda oraz polifenoli.
3. Warunki hydrolizy kwasowej mają wpływ na aktywność przeciwutleniającą hydrolizatów, lepsze właściwości przeciwutleniające wykazują hydrolizaty otrzymane w wyniku krótszego czasu hydrolizy.

Literatura

- Ahmad M.M., Al-Hakim S., Shenata A.Y. 1983. The antioxidant activity of amino acids in two vegetable oils. *JAOCS*, 60 (4): 837-840.
- Alaiz M., Hidalgo F.J., Zamora R. 1999. Effect of pH and temperature on comparative antioxidant activity of non-enzymatically browned proteins produced by reaction with oxidized lipids and carbohydrates. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 748-752.
- Amarowicz R., Naczek M., Shahidi F. 2000a. Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. *JAOCS*, 77 (9): 957-961.
- Amarowicz R., Naczek M., Shahidi F. 2000b. Antioxidant activity of various fraction of non-tannin phenolics of canola hulls. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2755-2759.
- Amarowicz R., Naczek M., Zadernowski R., Shahidi F. 2000c. Antioxidant activity of condensed tannins of beach pea, canola hulls, evening primrose, and faba bean. *J. Food Lipids*, 7: 195-205.

- Amarowicz R., Raab B., Shahidi F. 2003. Antioxidant activity of phenolic fractions of rapeseed. *J. Food Lipids*, 10: 51-62.
- Barclay L.R.C., Xi F., Norris J.Q. 1997. Antioxidant properties of phenolic lignin model compounds. *J. Wood Chem. Technol.*, 17 (1&2): 73-90.
- Bishov S.J., Henick A.S. 1972. Antioxidant effect of protein hydrolysates in a freeze-dried model system. *J. Food Sci.*, 40: 345-348.
- Brun-Merimee S., Billaud C., Louarme L., Nicolas J. 2004. Effect of glutathione and Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with glutathione on polyphenoloxidase from apple. II. Kinetic study and mechanism of inhibition. *Food Chem.*, 84: 235-241.
- Davidek J., Velišek J., Pokorny J. 1990. Chemical changes during food processing. Elsevier, London, 83-104.
- Decker E.A. 1998. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Sci. Technol.*, 9: 241-248.
- Elizalde B.E., Bressa F., Dalla Rosa M. 1992. Antioxidative action of Maillard reaction volatiles: influence of Maillard solution browning level. *JAOCS*, 69: 331-334.
- Frankel E. 1998. Lipid oxidation. The Oily Press, Dundee.
- Horwitz W. 1970. Official methods of analysis of the Official Analytical Chemists (AOAC). Washington, 15.049–15.055.
- Jędrusek-Golińska A., Korczak J., Kmieciak D., Czaczyk K., Heś M. 2002. Śruta rzepakowa jako surowiec do produkcji hydrolizatów białkowych. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXIII (2): 481-494.
- Korczak J. 1998. Czynniki warunkujące właściwości przeciwutleniające hydrolizatów białkowych soi i kazeiny. *Roczniki AR, Rozprawy Naukowe*, Poznań, 281.
- Korczak J., Janitz W., Heś M. 1998. Hydrolizat śruty rzepakowej jako źródło naturalnych przeciwutleniaczy. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XIX (1): 267-278.
- Mensor L.L., Menezes F.S., Leitao G.G., Reis A.S., dos Santos T.C., Coube C.S., Leitao S.G. 2001. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.*, 15: 127-130.
- Moon G., Lee M., Lee Y., Trakoontivakorn 2002. Main component of soy source representing antioxidant activity. *Int. Congress Series*, 1245: 509-510.
- Morales F.J., Jimenez-Perez S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to color and fluorescence. *Food Chem.*, 72: 19-125.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44: 307-315.
- Pazoła Z. 1970. *Technologia koncentratów spożywczych*. WNT, Warszawa.
- Pazoła Z., Ślósarek D., Świerczyński A., Świtek H. 1958: Optymalne warunki hydrolizy ciśnieniowej surowców białkowych za pomocą kwasu solnego. II. Hydroliza poekstrakcyjnych śrutów sojowych, arachidowych i rzepakowych. *Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przem. Spoż.*, 1: 57-71.
- Pham C.B., Rosario R.R. 1983a. The preparation of protein hydrolysate from defatted coconut and soybean meals. I. Effect of process variables on the amino nitrogen released and flavour development. *J. Food Technol.*, 18: 21-34.
- Pham C.B., Rosario R.R. 1983b. The preparation of protein hydrolysate from defatted coconut and soybean meals. II. Quality and sensory evaluation of products. *J. Food Technol.*, 18: 163-170.
- Pluszyński E., Bagdach J. 1967. *Metody oznaczania żywności wg norm*. WPLiS, Warszawa.

- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 76: 270-276.
- Seher A., Löschler D. 1986. Natürliche Antioxidanten. VI. Aminosäure-Gemische als effiziente Synergisten. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 88: 1-6.
- Shahidi F., Naczki M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, London.
- Shahidi F., Wanasundara U. 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32: 67-103.
- Shi H., Noguchi N., Niki E. 2001. Natural antioxidants. Introducing natural antioxidants. W: Antioxidants in food. J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (Eds.). CRC Press, Boca Raton., 147-159.
- Singh N., Rajini P.S. 2004. Free radical activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem.*, 85: 611-616.
- Sokol-Łętowska A., Oszmiański J. 1998. Właściwości przeciwutleniające naturalnych polifenoli. *Zesz. Nauk. AR Wrocław XII*, 328: 73-83.
- Spies J.R. 1957. *Methods in enzymology*. vol. III. Academic Press, New York.
- Szmal Z.S., Lipiec T. 1988. *Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej*. PZWL, Warszawa.
- Tang S.Z., Kerry J.P., Shehan D., Buckley D.J. 2002. Antioxidative mechanism of tea catechins in chicken meat systems. *Food Chem.*, 76: 45-51.
- Taylor M.J., Richardson T. 1980. Antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by hemoglobin. *J. Food Sci.*, 45: 1223-1227.
- Wijewickreme A.N., Kitts D.D., Durance T.D. 1997. Reaction conditions influence the elementary composition and metal chelating affinity of nondialyzable model Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 4577-4583.
- Wijewickreme A.N., Krejpcio Z., Kitts D.D. 1999. Hydroxyl scavenging activity of glucose, fructose, and ribose – lysine model Maillard products. *J. Food Sci.*, 64 (3): 457-461.
- Wilska-Jeszka J. 1999. Struktura i właściwości antyoksydacyjne polifenoli. W: *Antyoksydanty w żywności – aspekty technologiczne i zdrowotne. Materiały II Konferencji Naukowej „Żywność a zdrowie”* Łódź, 27-36.
- Yen G.C., Chen H.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 3: 27-32.
- Yen G.C., Hsieh P.P. 1995. Antioxidant activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine Maillard reaction products. *J. Sci. Food Agric.*, 67: 415-420.
- Zadernowski R. 1987. *Studia nad związkami fenolowymi mąk rzepakowych i rzepikowych*. *Acta Acad. Agricult. Tech. Olszt. Technol. Aliment.*, 21F: 1-55.
- Zadernowski R., Nowak H., Kozłowska H. 1991. Natural antioxidants from rapeseed. Rapeseed in a Changing World. 8th International Rapeseed Congress, Saskatoon, Canada, 883-887.
- Za: Wanasundara U., Amarowicz R., Shahidi F. 1994. Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 1285-1290.