

UNIwersytet Rzeszowski

Wydział Technologiczno-Przyrodniczy



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Kacper Roman Kut

Wybrane aspekty metodyczne oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej produktów żywnościowych zawierających białka i polifenole

Promotor: prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

DZIEDZINA: NAUKI ROLNICZE
DYSCYPLINA: TECHNOLOGIA ŻYWNOSCI I ŻYWIENIA

Rozprawa doktorska wykonana
w Pracowni Biochemii Analitycznej,
Instytutu Technologii Żywności i Żywienia,
Wydziału Technologiczno-Przyrodniczy,
Uniwersytetu Rzeszowskiego

Rzeszów, 2025

Składam serdeczne podziękowania

*Pani Promotor – Prof. dr hab. Izabeli Sadowskiej-Bartosz
za opiekę naukową, wszelką pomoc w badaniach naukowych oraz wyrozumiałość*

*Mojej ukochanej, Kamili
za wiarę we mnie, wsparcie i obecność, dzięki którym łatwiej było pokonać wszystkie trudności*

*Rodzinie i przyjaciołom
za wyrozumiałość, cierpliwość oraz ogromne wsparcie*

*Koleżankom i Kolegom z Uniwersytetu Rzeszowskiego
za nieustanne wsparcie moralne, motywację i dobrą atmosferę*

Spis treści

1. INFORMACJE WPROWADZAJĄCE	5
1.1 Źródła finansowania badań:.....	5
1.2 Dorobek naukowy	5
1.2.1 Pozostałe publikacje ze współautorstwem mgr inż. Kacpra Kut:.....	6
2. STRESZCZENIE.....	7
3. ABSTRACT	8
4. WYKAZ SKRÓTÓW	9
5. WSTĘP	10
6. CEL I ZAKRES PRACY	18
7. MATERIAŁY I METODY	19
7.1 Odczynniki	19
7.2 Materiał badawczy	21
7.3 Aparatura	21
7.4 Metody badań.....	22
7.4.1 Oznaczanie zawartości związków fenolowych	22
7.4.2 Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej metodą redukcji DPPH*	22
7.4.3 Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej metodą redukcji rodnika ABTS*	22
7.4.4 Metoda oznaczenia zdolności redukowania jonów miedzi CUPRAC	22
7.4.5 Metoda oznaczenia zdolności redukowania jonów żelaza FRAP (ang. <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	23
7.4.6 Generowanie nadtlenu wodoru (H ₂ O ₂)	23
7.4.7 Detekcja wytworzonego H ₂ O ₂	24
7.4.8 Denaturacja białek.....	24
7.4.9 Trawienie enzymatyczne białek	24

7.4.10 Nitrowanie reszt tyrozynowych albuminy surowicy bydlęcej (BSA)	25
7.4.11 Oznaczanie fluorescencyjne tworzenia ditryozyny	25
7.4.12 Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego	25
7.4.13 Statystyka	25
8. WYNIKI	27
8.1 Zawartość polifenoli w roślinnych naparach i przyprawach	27
8.2 Całkowita zdolność przeciwutleniająca w roślinnych naparach i przyprawach	28
8.3 Aktywność antyoksydacyjna aminokwasów	32
8.4 Aktywność antyoksydacyjna białek po denaturacji i trawieniu	32
8.5 Generacja nadtlenu wodoru	34
8.6. Analiza wizualna produktów reakcji ABTS*	38
8.7 Charakterystyka reakcji ABTS* z białkami i tworzenie fioletowego produktu	39
8.8 Charakterystyk fioletowego produktu	41
8.9 Charakterystyk tyrozyny	43
9. Dyskusja wyników	46
10. Wnioski	57
11. Bibliografia	58
12. ANEKS	68
12.1 Wykaz Rycin	68
12.2 Wykaz Tabel	68
12.3 Wykaz wykresów	68
12.4 Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów	69

1. INFORMACJE WPROWADZAJĄCE

1.1 Źródła finansowania badań:

1. Subwencja na działalność naukową Pracowni Biochemii Analitycznej na rok 2023 i 2024, Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego

BADANIA WYKONANO WE WSPÓŁPRACY Z:

2. Instytutem Inżynierii Materiałowej, Wydziału Nauk Ścisłych i Technologicznych Uniwersytetu Rzeszowskiego - dr hab. Ireneuszem Stefaniukiem, prof. UR

1.2 Dorobek naukowy

Rozprawa doktorska składa się z cyklu 3 publikacji naukowych, których sumaryczny Impact Factor w roku opublikowania jest równy 10,5 a liczba punktów MNiSW wynosi 310

1. **Kut, K.**, Tama, A., Furdak, P., Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2024). *Generation of Hydrogen Peroxide and Phenolic Content in Plant-Material-Based Beverages and Spices. Processes*, 12(1), 166.
Impact Factor₂₀₂₃ = 2.8; Liczba punktów_{MNiSW} = 70;
2. **Kut, K.**, Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2023). *Denaturation and Digestion Increase the Antioxidant Capacity of Proteins. Processes*, 11(5), 1362.
Impact Factor₂₀₂₃ = 2.8; Liczba punktów_{MNiSW} = 100;
3. **Kut, K.**, Stefaniuk, I., Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2023). Formation of a Purple Product upon the Reaction of ABTS Radicals with Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8912.
Impact Factor₂₀₂₃ = 4.9; Liczba punktów_{MNiSW} = 140.

1.2.1 Pozostałe publikacje ze współautorstwem mgr inż. Kacpra Kut:

1. **Kut, K.**, Cieniek, B., Stefaniuk, I., Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2022). *A Modification of the ABTS[•] Decolorization Method and an Insight into Its Mechanism. Processes*, 10(7), 1288.

Impact Factor₂₀₂₂ = 3.5; Liczba punktów_{MniSW} = 70;

2. **Kut, K.**, Bartosz, G., Soszyński, M., & Sadowska-Bartosz, I. (2022). *Antioxidant properties of hispidulin. Natural Product Research*, Vol. 36, 6401-6404.

Impact Factor₂₀₂₂ = 1.9; Liczba punktów_{MniSW} = 70;

3. Bartosz, G., Pieńkowska, N., **Kut, K.**, Cieniek, B., Stefaniuk, I., & Sadowska-Bartosz, I. (2023). *Effect of Low Concentration of Nitroxides on SH-SY5Y Cells Transfected with the Tau Protein. International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), 16675.

Impact Factor₂₀₂₃ = 4.9; Liczba punktów_{MniSW} = 140;

4. **Kut K.**, Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. (2025). Effect of storage on the absorption and fluorescence spectra of extracts of petals of selected anthocyanin-containing flowers. *Processes*, 2025, 13(6), 1826;

Impact Factor₂₀₂₃ = 2.8; Liczba punktów_{MniSW} = 70;

Sumaryczna wartość współczynnika Impact Factor dorobku publikacyjnego łącznie z publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej (według daty opublikowania) wynosi 23.6, a liczba punktów MNiSW = 660 punktów. Liczba cytowań według bazy Scopus: 57, h-index = 4.

Komunikaty Zjazdowe

1) "9th International Conference" Human-Nutrition-Environment" University of Rzeszow, 2023 r.

Prezentacja posterowa pt.: „**Cellular effects of low concentrations of nitroxyl free**”

2) "BIO 2023 | 5th Congress of Polish Biosciences" Szczecin 2023 r

Prezentacja posterowa pt.: „**Formation of a purple product in the reaction of ABTS[•] with proteins**”

3) „8th International Conference" Human-Nutrition International Conference Human-Nutrition-Environment", University of Rzeszow, 2023 r.

Prezentacja posterowa pt: „**Antioxidant properties of hispidulin**”

2. STRESZCZENIE

Rozprawa doktorska obejmuje dwie komplementarne części poświęcone oznaczaniu aktywności antyoksydacyjnej w produktach żywnościowych zawierających polifenole i białka. Pierwsza część pracy dotyczy właściwości przeciwutleniających naparów roślinnych i przypraw. Analizowano zawartość związków fenolowych, całkowitą zdolność przeciwutleniającą (TAC) oraz ilość generowanego nadtlenu wodoru (H_2O_2), badając zależności między tymi parametrami. Wykazano wysoką korelację między zawartością polifenoli a TAC oznaczaną metodami redukcji ABTS*, CUPRAC, FRAP i redukcji DPPH*. Jednocześnie nie stwierdzono jednoznacznej korelacji między zawartością polifenoli a ilością generowanego H_2O_2 . Podano, że chociaż ilość polifenoli wpływa na powstawanie H_2O_2 (na skutek autooksydacji), to jego stężenie w próbce zależy również od zdolności przeciwutleniającej ekstraktu, czyli również od szybkości usuwania H_2O_2 .

Druga część pracy obejmuje analizę metodycznych uwarunkowań oznaczania aktywności antyoksydacyjnej w obecności białek. Badania prowadzono z użyciem aminokwasów oraz modelowych białek (albuminy surowicy bydlęcej i białka jaja kurzego), które poddawano denaturacji i trawieniu enzymatycznemu. Wykazano, że te procesy znacząco zwiększają właściwości przeciwutleniające białek, co przypisano zwiększeniu dostępności redoks aktywnych aminokwasów takich jak tyrozyna, tryptofan, cysteina, cystyna, histydyna oraz arginina. Szczególną uwagę poświęcono reakcji tyrozyny z rodnikiem ABTS*, w której zaobserwowano powstawanie trwałego, fioletowego adduktu ABTS–tyrozyna oraz dityrozyny. Produkt ten może wpływać na interpretację wyników testu redukcji ABTS*, wskazując na ograniczenia tego testu w analizie próbek białkowych.

Wyniki obu części pracy rzucają nowe światło na mechanizmy działania antyoksydantów w matrycach żywnościowych oraz na metody ich oznaczania. Podkreślono złożoność reakcji rodnikowych oraz potrzebę krytycznego podejścia do stosowanych metod analitycznych, zwłaszcza przy interpretacji danych złożonych matryc biologicznych takich jak żywność.

3. ABSTRACT

The dissertation comprises two complementary parts focused on the determination of antioxidant activity in food products containing polyphenols and proteins. The first part addresses the antioxidant properties of plant infusions and spices. The study involved the analysis of polyphenol content, total antioxidant capacity (TAC), and the amount of hydrogen peroxide (H_2O_2) generated spontaneously in the extracts, examining the relationships between these parameters. A strong correlation was observed between polyphenol content and TAC determined by ABTS[•] reduction, CUPRAC, FRAP, and DPPH[•] reduction assays. However, no direct correlation was found between polyphenol content and the amount of H_2O_2 produced. Although phenolics contribute to H_2O_2 formation through autooxidation, its concentration also depends on the antioxidant potential of the extract, particularly its capacity to eliminate H_2O_2 .

The second part of the study concerns the methodological evaluation of antioxidant activity measurements in the presence of proteins. The analysis included amino acids and model proteins (bovine serum albumin and hen egg white protein), which were subjected to denaturation and enzymatic hydrolysis. It was demonstrated that these processes significantly enhance the antioxidant properties of proteins, which was attributed to an ~~release~~ increase in accessibility of redox active amino acids such as tyrosine, tryptophan, cysteine, cystine, histidine, and arginine. Particular attention was given to the reaction of tyrosine with the ABTS[•] radical, in which formation of a stable, violet-colored ABTS-tyrosine adduct and dityrosine were observed. These products may interfere with the interpretation of ABTS[•] assay results, highlighting limitations in the analysis of protein-containing samples.

In summary, the results obtained from both the analysis of plant extracts and protein-based models confirm the complexity of reactions underlying antioxidant activity measurements. The two parts of the study complement each other, highlighting not only the practical relevance of TAC measurement methods but also their limitations resulting from the presence of protein or phenolic components. The identified interferences and secondary products of radical reactions emphasize the need for a critical approach to data interpretation and for selecting analytical methods suited to the nature of the tested matrix.

4. WYKAZ SKRÓTÓW

ABTS* - kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)

BME - β -merkaptoetanol

BSA (ang. *Bovine serum albumin*) - albumina surowicy bydłej

CUPRAC (ang. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*) - zdolność redukcji jonów miedzi (II) przez antyoksydanty

DPPH* - 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl

DTT - ditiotreitol

EPR (ang. *Electron paramagnetic resonance*) - elektronowy rezonans paramagnetyczny

FRAP (ang. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) - zdolność redukcji żelaza (III) przez antyoksydanty

GAE (ang. *Gallic Acid Equivalents*) —równoważnik kwasu galusowego

GPx (ang. *Glutathione peroxidase*) - peroksydaza glutationowa

GSH (ang. *Glutathione reduced*) - glutation zredukowany

GSSG (ang. *Glutathione oxidized*) - glutation utleniony

HAT (ang. *Hydrogen Atom Transfer*) - transfer atomu wodoru

ORAC (ang. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) - pojemność pochłaniania rodników tlenowych

PBS - (ang. *Phosphate-Buffered Saline*) - sól fizjologiczna buforowana fosforanem

pK_a - Ujemny logarytm dziesiętny stałej dysocjacji kwasu; miara kwasowości związku chemicznego, określająca skłonność do oddawania protonu

RFT - reaktywne formy tlenu

SDS - dodecylosiarczan sodu

SET (ang. *Single Electron Transfer*) - transfer pojedynczego elektronu

SPLET (ang. *Sequential Proton Loss Electron Transfer*) - mechanizm redoks: sekwencyjna utrata protonu, a następnie transfer elektronu.

SOD (ang. *superoxide dismutase*) - dysmutaza ponadtlenkowa

TAC (ang. *Total Antioxidant Capacity*) - całkowita zdolności antyoksydacyjna

TE (ang. *Trolox equivalent*) - równoważnik troloxu

TEAC (ang. *Trolox equivalent antioxidant capacity*) - zdolność antyoksydacyjna wyrażona w równoważnikach Troloksu

TRAP (ang. *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) - całkowita zdolność wychwytywania rodników przez antyoksydanty

Trolox - kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy

5. WSTĘP

Reaktywne formy tlenu (RFT) to cząsteczki zawierające tlen, charakteryzujące się wysoką reaktywnością chemiczną. Obejmują zarówno wolne rodniki, jak i niewolnorodnikowe formy, takie jak nadtlenek wodoru (H_2O_2) czy tlen singletowy (1O_2). Wśród RFT istotną rolę odgrywają wolne rodniki, czyli atomy lub cząsteczki zawierające co najmniej jeden niesparowany elektron na jednym z orbitali, co czyni je wyjątkowo reaktywnymi chemicznie. Taki stan jest energetycznie niestabilny, dlatego rodniki dążą do osiągnięcia stabilizacji poprzez oddanie lub przyjęcie elektronu w reakcjach z innymi cząsteczkami [1,2]. Najpowszechniej wytwarzanym wolnym rodnikiem jest anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$, a najbardziej reaktywnym - rodnik hydroksylowy $\cdot OH$. W utlenianiu żywności istotne są także te RFT, które nie są wolnymi rodnikami, zwłaszcza H_2O_2 i 1O_2 .

W żywności rodniki powstają wskutek szeregu reakcji inicjowanych przez czynniki związane z procesem produkcyjnym produktów spożywczych, przechowywaniem i przetwarzaniem. Główne źródła inicjacji procesów sprzyjających powstawania rodników w żywności to:

1. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe ulegają samorzutnemu utlenianiu w obecności tlenu (autooksydacja) na drodze reakcji wolnorodnikowej [3];
2. Reakcje Fentona i Haber-Waissa, katalizowana głównie przez jony metali Fe^{2+} , ale także inne jony metali: miedzi, chromu, kobaltu i wanadu które inicjują powstawanie rodników poprzez reakcję Fentona [4,5];
3. Intensywne ogrzewanie, występujące podczas obróbki termicznej (smażenie, gotowanie, pieczenie) inicjuje reakcje rodnikowe i przyspiesza utlenianie lipidów [6];
4. Napromieniowanie żywności światłem UV (np. podczas dezynfekcji) może inicjować reakcje rodnikowe, czego efektem jest pogorszenie cech sensorycznych. Również napromienianie żywności promieniami jonizującymi indukuje oderwanie się atomu wodoru od łańcuchów nienasyconych kwasów tłuszczowych. W wyniku radiolizy są generowane także RFT w tym rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) [7,8];
5. Polifenolowa oksydaza (PPO) i peroksydazy katalizują utlenianie fenoli, wytwarzając wolne rodniki oraz nadtlenek wodoru [9].

Szkodliwe działanie wolnych rodników i innych RFT można ograniczyć poprzez odpowiednio zbilansowaną dietę, bogatą w związki bioaktywne o właściwościach antyoksydacyjnych, zdolne do redukcji utleniaczy przy jednoczesnym powstawaniu produktów o niskiej bądź znikomej toksyczności. Ich działanie dobrze oddaje definicja zaproponowana przez Halliwella i wsp. (2019): „*antyoksydant to substancja występująca w niskim stężeniu w porównaniu do stężenia utleniającego się substratu, która opóźnia lub hamuje utlenianie tego substratu*”. Antyoksydanty mogą występować w żywności naturalnie lub być dodawane w trakcie procesu produkcyjnego [1,2,10,11]. Oprócz zastosowania w technologii żywności, związki te pełnią również kluczową rolę w fizjologii organizmów żywych, gdzie uczestniczą w neutralizacji RFT. W organizmach żywych występują dwa podstawowe systemy obrony przed stresem oksydacyjnym: mechanizmy enzymatyczne i nieenzymatyczne. Do enzymatycznych przeciwutleniaczy zalicza się między innymi, dysmutazę ponadtlenkową, katalazę, peroksydazę glutationową, peroksydazy roślinne, peroksyredoksyny, transferazę glutationową oraz peroksydazę cytochromu c. Do nieenzymatycznej grupy antyoksydantów zalicza się niskocząsteczkowe związki o właściwościach antyoksydacyjnych, takie jak witaminy E, A, C i K, karotenoidy, związki siarkowe (np. indole), kofaktory enzymów przeciwutleniających (np. koenzym Q₁₀), a także liczne związki fenolowe, w tym kwasy fenolowe i flawonoidy. Do nieenzymatycznych przeciwutleniaczy należą również drobnocząsteczkowe związki o silnym potencjale redukcyjnym, jak glutation, ergotioneina czy kwas moczowy [1,2,11,12,13].

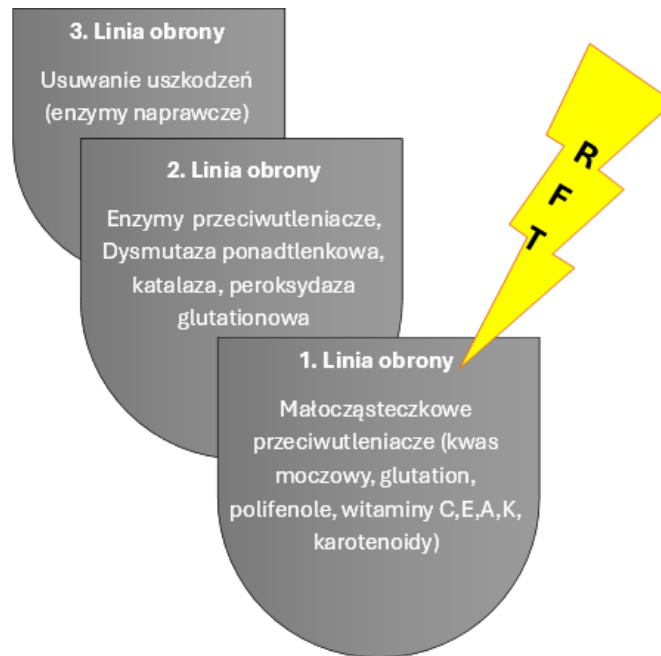
Znaczącą rolę w określaniu aktywności antyoksydacyjnej żywności odgrywają związki fenolowe, zwłaszcza polifenole, które są powszechnie obecne w produktach roślinnych. Jak wskazano w licznych publikacjach, polifenole odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu wysokiej TAC wielu produktów spożywczych, istotną zarówno z punktu widzenia chemii żywności, jak i potencjalnych korzyści zdrowotnych [14,15,16,17,18,19]. Autorzy tacy jak Wu i wsp. (2004) oraz Carlsen i wsp. (2010), Pellegrini i wsp. (2020) podkreślają, że przyprawy, owoce jagodowe, zioła i orzechy, bogate w polifenole, wykazują szczególnie wysoką aktywność antyoksydacyjną [14,15,16]. Floegel i wsp. (2011) natomiast wykazali silną korelację między zawartością polifenoli a wynikami oznaczeń TAC z wykorzystaniem rodników ABTS[•] i DPPH[•], potwierdzając przy tym ich istotny udział w pomiarach aktywności antyoksydacyjnej [18]. Podobnie, Prior i Wu (2013) podkreślają znaczenie polifenoli w diecie

jako czynnika wpływającego na redukcję stresu oksydacyjnego oraz poprawę stanu zdrowia, wskazując, na to że dieta bogata w produkty spożywcze w polifenole może przyczynić się do zmniejszenia ryzyka rozwoju wielu chorób przewlekłych, w tym cukrzycy typu 2, miażdżycy i chorób neurodegeneracyjnych [19]. Mając na uwadze znaczenie polifenoli w żywności oraz ich potencjalny wpływ na zdrowie człowieka, warto przyjrzeć się ich rzeczywistym zawartościom w popularnych produktach spożywczych. Poniżej zamieszczono tabelę przedstawiającą ich przeciętne wartości (Tabela 1).

Tabela 1. Całkowita zawartość polifenoli w różnych surowcach i produktach spożywczych [opracowana na podstawie 21,22,23].

Grupa produktów	Średnia (mg/100 g lub mg/100 ml)	Minimalna (mg/100 g lub mg/100 ml)	Maksymalna (mg/100 g lub mg/100 ml)	Odchylenie standardowe
Przyprawy	2551,35	90	24390	1949,31
Zioła	1421,15	47,66	11500	1021,75
Fasolowate	2141,03	9	9360	1682,86
Kakao	5624,23	3712	8033	1577,42
Orzechy	662,03	0,1	3673	173,01
Zboża	195,92	0,79	3300	226,25
Owoce jagodowe	584,67	20	2556	177,88
Owoce pestkowe	194,8	23,2	1400	100,78
Produkty zbożowe	417,03	131	842	60,19
Owoce ziarnkowe	163,6	15,86	690	99,64
Kapustowate	152,09	10,4	679	93,48
Wina czerwone	215,48	73,59	417,7	65,22
Likiery owocowe	237,41	23,9	388,4	92,95
Owoce cytrusowe	139,07	8,7	337	74,75
Kawa	267,44	245,54	281,82	12,65
Cebule (<i>Allium cepa</i> i <i>Allium ascalonicum</i>)	80,8	16,8	180,84	47,14
Warzywa korzeniowe	98,42	8,21	168	33,75
Herbata Czarna (zaparzona)	104,48	12,26	134,9	25,96
Cydr	98,27	13	130	45,3
Owoce dyniowate	73,45	5,8	124	51,88
Herbata Zielona (zaparzona)	61,86	28,7	102,9	19
Wina białe	32,1	9,6	85,4	16,72
Piwa	33,49	3,6	69,6	12,52
Warzywa łodygowe	13,65	12,6	15,29	1,37

Białka mają wiele funkcji takich jak: strukturalne, regulacyjne, transportowe, metaboliczne. Jednak nie tylko one decydują o ich znaczeniu w organizmie żywym, bowiem część protein uczestniczy w ochronie przed stresem oksydacyjnym. Nie tylko niskocząsteczkowe antyoksydanty chronią organizmy przed niekorzystnym działaniem RFT, również białka pełnią istotną rolę w ich neutralizowaniu oraz ograniczaniu stresu oksydacyjnego. W rzeczywistości wiele białek i peptydów wykazuje zdolność do zmiatania wolnych rodników, chelatowania jonów metali oraz hamowania procesów utleniania lipidów, co przyczynia się do ochrony komórek przed RFT [1,2,24]. Pierwszą enzymatyczną linią obrony przed anionorodnikiem ponadtlenkowym ($O_2^{\bullet-}$) jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD). SOD katalizuje przekształcanie $O_2^{\bullet-}$ w H_2O_2 i tlen, redukując jego toksyczność i utrzymując równowagę redoksową w komórkach [1,24,25]. Powstały w wyniku działania SOD nadtlenek wodoru jest mniej reaktywny niż anionorodnik ponadtlenkowy, ale wciąż stanowi zagrożenie dla komórek, ponieważ może ulegać przemianie w bardziej toksyczne formy, chociażby może uczestniczyć w reakcji Fentona, prowadzącej do powstania wysoce toksycznego OH^{\bullet} . Dlatego organizm wytworzył kolejną linię obrony w postaci katalazy, która przekształca nadtlenek wodoru w wodę i tlen cząsteczkowy, chroniąc tym samym komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [1,5,26] oraz peroksydaz i peroksyredoksyn. Peroksydaza glutationowa (GPx) redukuje toksyczne nadtlenki lipidowe i H_2O_2 do mniej szkodliwych produktów, wykorzystując glutation (GSH). Chroni błony komórkowe przed peroksydacją lipidów. Podczas reakcji glutation ulega utlenieniu do disiarczku glutationu (GSSG). GSH jest regenerowany z GSSG za pomocą kolejnego enzymu, reduktazy glutationowej, umożliwiając przy tym dalsze działanie GPx [2,24,27,28].



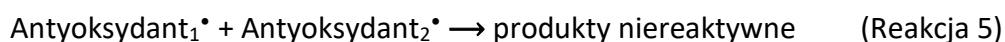
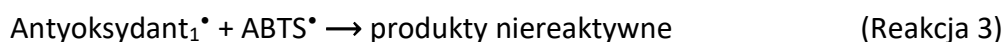
Rysunek 1. Model potrójnej tarczy chroniącej przed RFT [opracowany na podstawie 28].

Warto podkreślić że, białka enzymatyczne nie są jedynymi przedstawicielami białek, które uczestniczą w ochronie przed RFT. Literatura również podaje liczne białka nieenzymatyczne i mniejsze peptydy, które wykazują właściwości antyoksydacyjne. W diecie człowieka białka te mogą pochodzić z różnych produktów spożywanych takich jak mleko, jaja, mięso, soja czy nawet zboża [29,30,31,32,33,34,35]. Aktywność przeciwutleniająca białek zależy od ich składu aminokwasowego, jak podaje Fadim i wsp. (2022) wolne rodniki i inne RFT zwłaszcza rodniki hydroksylowe mogą reagować z wszystkimi dwudziestoma podstawowymi aminokwasami białkowymi. Największą reaktywnością charakteryzują się aminokwasy aromatyczne (tyrozyna, fenyloalanina i tryptofan), aminokwasy zawierające siarkę o charakterze nukleofilowym (metionina i cysteina) oraz aminokwasy zawierające pierścień imidazolowy (histydyna) [36]. Jednakże w naturalnych strukturach białkowych te reszty aminokwasowe mogą być ukryte wewnątrz cząsteczki, co ogranicza ich dostępność do reakcji z wolnymi rodnikami. Procesy takie jak denaturacja czy hydroliza enzymatyczna mogą uwolnić te reszty, zwiększając tym samym aktywność przeciwutleniającą takich białek [29,36,37,38]. Co ciekawe, roślinne związki fenolowe, w przeciwieństwie do białek wykazują odwrotną tendencję: często tracą swoją aktywność antyoksydacyjną podczas trawienia. Aktywność przeciwutleniająca związków fenolowych zależy od pH środowiska. Antocyjany mogą przyjmować różne konformacje strukturalne w różnych pH, a tym samym wykazywać wyższą lub niższą aktywność przeciwutleniającą w miarę tworzenia się nowych struktur.

Zgodnie z tym zasadowe pH jelit powoduje zmianę struktury cząsteczek polifenoli, a to może zmniejszać ich zdolność do neutralizacji wolnych rodników [39,40]. Związki polifenolowe występują głównie w formach związanych takich jak glikozydy, estry i polimery. Zatem podczas trawienia w przewodzie pokarmowym mogą ulegać hydrolizie w wyniku działania środowiska kwasowego żołądka, środowiska alkalicznego jelit i przez działanie enzymów trawiennych. Warunki te sprzyjają modyfikacjom strukturalnym tych związków, takich jak hydroksylacja, metylacja, dimeryzacja i glikozylacja, a także mogą powstawać różne pochodne związków fenolowych przez częściową degradację ich pierwotnej struktury, jak w przypadku antocyjanów [39,41].

Zarówno białka (enzymatyczne, jak i nieenzymatyczne), jak i polifenole wykazują aktywność antyoksydacyjną, przyczyniając się do neutralizowania reaktywnych form tlenu i ochrony organizmu przed stresem oksydacyjnym. Ze względu na ich chemiczną różnorodność Pellegrini i in. (2020), uważają, że pomiar aktywności pojedynczych przeciwutleniaczy jest mało miarodajny. Z tego właśnie powodu wprowadzono koncepcję całkowitek zdolności antyoksydacyjnej (TAC), uwzględniającą synergiczne i redoksove interakcje między różnymi cząsteczkami obecnymi w żywności, jednocześnie zaznaczając, że wartości TAC należy interpretować ostrożnie w odniesieniu do zdrowia człowieka [16]. TAC mierzy się różnymi metodami, które opierają się na reakcji z modelowym utleniaczem i odzwierciedlają zdolność próbki do redukcji wolnych rodników. Wyróżnia się testy oparte na transferze pojedynczego elektronu (SET) takie jak test redukcji ABTS[•] i redukcji DPPH[•], FRAP, CUPRAC, transferze atomu wodoru (HAT) jak ORAC czy TRAP. W praktyce laboratoryjnej najczęściej stosowane są testy SET, ponieważ są łatwe w implementacji analitycznej. W testach tych zdolność antyoksydacyjna oceniana jest na podstawie zdolności próbki do redukcji substancji wskaźnikowej po ustalonym czasie reakcji redoks. Innym podziałem jest klasyfikacja metod uwzględniająca zdolność redukcji jonów metali przejściowych lub wychwytywania stabilnych rodników [16,42]. Mechanizm reakcji SET można przedstawić na przykładzie metody, w której antyoksydant redukuje rodnik kationowy ABTS[•], zmniejszając jego intensywne zabarwienie zielononiebieskie, odbarwienie, ta zmiana jest mierzona spektrofotometrycznie. Ścieżka tej reakcji opiera się na oddaniu elektronu (lub atomu wodoru) przez antyoksydant, co powoduje przejście ABTS[•] do formy ABTS (nierodnikowej). Wykazaliśmy (Kut i wsp. 2022), że reakcja antyoksydantów z ABTS[•] nie zawsze jest procesem jednoetapowym. Obecność ubocznych

reakcji, zwłaszcza między rodnikami antyoksydantów a ABTS[•], może wpływać na interpretację wyników testu. W teście redukcji ABTS[•] zachodzi szereg reakcji (reakcja 1,2,3,4,5)[42,43]:



W obecności silnych przeciwutleniaczy w trakcie reakcji ABTS[•] dochodzi do przeniesienia elektronu. Jeśli w układzie znajduje się tlen cząsteczkowy może on akceptować elektrony od rodników. To może być skutkiem powstawania rodnika O₂^{•-} który ulega dalszym reakcjom przechodząc następnie w H₂O₂ (reakcja 6,7)[43,44]:



Podobnie nadtlenek wodoru może być generowany w wyniku innych procesów oksydacyjnych. W żywności nadtlenek wodoru powstaje głównie w wyniku autooksydacji związków, takich jak polifenole, kwas askorbinowy, tiole oraz jony metali. Dodatkowo, w świeżych produktach spożywczych H₂O₂ może być generowany w wyniku aktywności enzymów, takich jak oksydaza ksantynowa w mleku oraz oksydaza glukozowa w miodzie [44]. Obecność H₂O₂ potwierdzono również w produktach alkoholowych: winie, piwach i mocnych alkoholach (brandy, whisky, likiery owocowe), a także w ziołach leczniczych, gotowanych warzywach, napojach białkowych [44,45,46,47,48,49].

6. CEL I ZAKRES PRACY

Praca składa się z dwu komplementarnych części, obejmujących charakterystykę aktywności antyoksydacyjnej) wybranych białek i związków polifenolowych oraz analizę metodycznych aspektów jej oznaczania aktywności antyoksydacyjnej w produktach żywnościowych zawierających te związki.

Pierwsza część pracy dotyczy właściwości przeciwutleniających naparów roślinnych i przypraw. Celem badań było określenie zależności pomiędzy zawartością związków fenolowych a ilością generowanego H_2O_2 oraz ich wpływu na TAC. Założono, że polifenole obecne w roślinnych naparach mogą jednocześnie generować i neutralizować H_2O_2 w wyniku autooksydacji, co znacząco wpływa na ocenę ich właściwości antyoksydacyjnych. Hipoteza badawcza zakładała również, że ilość H_2O_2 powstającego w ekstraktach może stanowić przybliżoną miarę zawartości związków fenolowych. W ramach tej części pracy oceniano również, w jakim stopniu interakcje pomiędzy polifenolami a reagentami stosowanymi w testach antyoksydacyjnych mogą prowadzić do powstawania produktów reakcji zakłócających wyniki oznaczeń.

Druga część pracy obejmuje analizę metodycznych uwarunkowań oznaczania aktywności antyoksydacyjnej w obecności białek. W ramach tej części badano, jak modyfikacje strukturalne białek - takie jak denaturacja czy trawienie enzymatyczne - wpływają na ich zdolność do neutralizowania wolnych rodników. Podjęto również próbę wyjaśnienia komplikacji jednej z najczęściej stosowanych metod spektrofotometrycznych - oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej przy użyciu rodnika ABTS*, jaką jest zauważone przeze mnie powstawanie ubocznego produktu reakcji. Hipoteza zakładała, że zarówno denaturacja jak i enzymatyczne trawienie białek mogą znacząco zwiększyć ich potencjał antyoksydacyjny a powstanie fioletowej barwy w reakcji ABTS* z białkiem jest uzależnione od zawartości reszt tyrozyny w białkach i może wpływać na dokładność i wiarygodność uzyskiwanych wyników.

7. MATERIAŁY I METODY

7.1 Odczynniki

Merck (Poznań, Polska):

- L-arginina (CAS no. 74-79-3, cat. no. 11009, czystość $\geq 99.5\%$),
- L-metionina (CAS no. 63-68-3, cat. no. M9625, czystość $\geq 98\%$),
- L-seryna (CAS no. 56-45-1, cat. no. S4500, czystość $\geq 99\%$),
- L-leucyna (CAS no. 61-90-5, cat. no. L8000, czystość $\geq 98\%$),
- monohydrochlorowodorek L-lizyny (CAS no. 657-27-2, cat. no. L5626, czystość $\geq 98\%$),
- β -alanina (CAS no. 107-95-9, cat. no. 146064, czystość $\geq 99.5\%$),
- dodecylosiarczan sodu (SDS) (CAS no. 151-21-3, cat. no. L4509, czystość $\geq 98.5\%$),
- glicyna (CAS no. 56-40-6, cat. no. 410225, czystość $\geq 98.5\%$),
- cysteina (CAS no. 52-90-4, cat. no. 168149, czystość $\geq 97\%$),
- L- glutation zredukowany (CAS no. 70-18-8, cat. no. G4251, czystość $\geq 98\%$),
- L- glutation utleniony (CAS no. 27025-41-8, cat. no. G4376, czystość $\geq 98\%$),
- glicylo-glicyna (Gly-Gly) (CAS no. 556-5-3, cat. no. G1002, czystość $\geq 99\%$),
- azotyn sodu (CAS no. 7632-00-0, cat. no. 8222850100, czystość $> 98\%$),
- jednowodny kwas cytrynowy (CAS no. 5949-29-1, cat. no. 1002441000, ACS reagent)
- sześciowodny chlorek żelaza (III) (CAS no. 10025-77-1; cat. no. 236489, czystość $\geq 97\%$),
- kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksyłowy (Trolox) (CAS no. 53188-07-1; cat. no. 238813, czystość $\geq 97\%$),
- neokuproina (CAS no. 484-11-7; cat. no. N1501, czystość $\geq 98\%$),
- papaina z lateksu papai (CAS no. 9001-73-4; cat. no. P3125, highly purified by chromatography),
- 2,4,6-tri-(2-pyridylo)-s-triazyna (TPTZ) (CAS no. 3682-35-7; cat. no. 93285, czystość $\geq 99\%$),
- trypsyna (CAS no. 9002-07-7; cat. no. T1326, czystość $\geq 99\%$),
- katalaza (CAS no. 9001-05-2, cat. no. C40, $\geq 10,000$ units/mg protein),
- dimetylosulfotlenek (DMSO) (CAS no. 67-68-5, cat. no. D2438, anhydrous, czystość $\geq 99.9\%$),
- 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH) (CAS no. 1898-66-4, cat. no. D9132, czystość $\leq 100\%$),
- kwas galusowy (CAS no. 149-91-7; cat. no. G7384; czystość 97.5-102.5% (titration),
- sól Mohra (CAS no. 7783-85-9, cat. no. 203505, czystość $\geq 99,997\%$),
- sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS) (cat. no. PBS404.200),
- nadsiarczan(VI) potasu (CAS no. 7727-21-1, cat. no. 379824, czystość 99.99%),
- pirogallol (CAS no. 87-66-1, cat. no. P0381, czystość $\geq 98\%$),
- kwercetyna (CAS no. 117-39-5, cat. no. Q4951, czystość $\geq 95\%$),

Chempur (Piekary Śląskie, Polska):

- Tris-HCl (CAS no. 77-86-1; cat. no. 118534707, czystość $\geq 99\%$),
- kwas octowy (CAS no. 64-19-7, cat. no. 425687339, czystość 80%),
- kwas solny (CAS no. 7647-01-0, cat. no. 115752837, 35-38%),
- nadtlenek wodoru (CAS no. 7722-84-1, cat. no. 118851934, 30%),
- azotyn sodu (CAS no. 7632-00-0, cat. no. 792690115, czystość $\geq 97.5\%$),
- chloroform (CAS no. 67-66-3, cat. no. 112344305, czystość $\geq 98.5\%$),
- aceton (CAS no. 67-64-1, cat. no. 111024800, czystość $\geq 99.5\%$),
- eter dietylowy (CAS no. 60-29-7, cat. No. 113842106, czystość $\geq 99.5\%$),
- kwas nadchlorowy (CAS no. 7601-90-3, cat. no. 115649402, 60%),

LAB EMPIRE (Rzeszów, Polska):

- DL- ditiotreitól (DTT) (CAS- no. 3483-12-3; cat. no. DTT001.5, czystość $\geq 99.5\%$),
- L-histydyna (CAS no. 71-00-1; cat. no. HIS100.25, czystość $\geq 98.5\%$),
- monosodowy fosforan sodu (CAS no. 10049-21-5; cat. no. SPM306.500, czystość 98-103%),
- disodowy fosforan sodu (CAS no. 7782-85-6; cat. no. SPD579.1, czystość 98-102%),

Avantor Performance Materials (Gliwice, Polska):

- pięciowodny siarczan miedzi(II) (CAS no 7758-99-8, cat. no. 658310422, czystość $\geq 98\%$),
- etanol (CAS no. 64-17-5, cat. no. 396480111, czystość $\geq 99\%$),
- bezwodny octan sodu (CAS no. 127-09-3, cat. no. BN60/6191, czystość $\geq 99\%$),
- oranż ksylenolowy (CAS no 3618-43-7, cat. no. 704590231, czystość $\leq 100\%$),

Promega (Madison, WI, USA),

- β -merkaptioetanol (BME) (CAS no. 60-24-2, cat. No. Z523A, 48,7%),
- wodorotlenek sodu (CAS no. 1310-73-2; cat. no. 056992, czystość $\geq 98\%$),

Roth (Zielona Góra, Polska):

- tryptofan (CAS no. 73-22-3; cat. no. 4858, czystość $\geq 98.5\%$),
- tyrozyna (CAS no. 60-18-4; cat. no. T207, czystość $\geq 99\%$),

Biomed (Lublin, Polska):

- L-cystyna (CAS no. 56-89-3; cat. no. 2/03/75, czystość $\geq 99.9\%$),

Becton and Dickinson Company (Le Pont de Claix, Francja):

- Bacto Peptone (cat. no. 211677),

AppliChem (Darmstadt, Niemcy):

- albumina bydlęca frakcja V (BSA) (CAS no. 9038-46-8; cat. no. A1391,0025, czystość $\geq 97\%$),

Roche (Warszawa, Polska):

- kwas 2,2'-azyno-bis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (ABTS; CAS no. 504-14-6, cat. no. 10102946001, czystość $\geq 99\%$),

Woda dejonizowana została uzyskana za pomocą systemu Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

7.2 Materiał badawczy

Analizowane produkty (biała, zielona, czarna i czerwona herbata, rooibos, yerba mate, kawa Tchibo i Brazil, kakao, zioła: rozmaryn i tymianek oraz przyprawy: ziele angielskie, chili, zielony i czarny pieprz, kminek i kolendra) zostały zakupione w lokalnych sklepach w Rzeszowie jako produkty ogólnodostępne. Materiał roślinny został rozdrobniony w moździerzu, a następnie 250 mg suchego sproszkowanego materiału potraktowano 25 mL wrzącej wody wodociągowej, aby odtworzyć warunki powszechnie stosowane do przygotowania naparów. Po 10 minutach napary odwirowano ($3000 \times g$, 10 minut), a z supernatantów pobrano porcje do oznaczenia stężenia nadtlenku wodoru, stężenia związków fenolowych oraz zdolności antyoksydacyjnej (**publikacja 1**).

Roztwory macierzyste albuminy surowicy bydlęcej (BSA) przygotowano w buforze PBS. Białko z białka jaja kurzego (zakupionego w lokalnych sklepach w Rzeszowie jako produkty ogólnodostępne) rozcieńczono dziesięciokrotnie w PBS. Błony erytrocytów ludzkich przygotowano zgodnie z modyfikacją [50] metody Dodge'a i wsp. [51] (**publikacja 2,3**).

7.3 Aparatura

Do oznaczeń używano przezroczystych, płaskodennych płytek 96-dołkowych (Greiner, Kremsmünster, Austria). Pomiar absorbancji przeprowadzono przy użyciu czytnika mikropłytek Spark multimode (Tecan Group Ltd., Männedorf, Szwajcaria).

Widma fluorescencji mierzono natychmiast po zmieszaniu oraz co 10 minut w spektrofluorymetrze Hitachi F-2500 (Tokio, Japonia).

Pomiary EPR wykonano w spektrometrze Bruker multifrequency i multi-resonance FT-EPR ELEXSYS E580 (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten, Niemcy).

7.4 Metody badań

7.4.1 Oznaczanie zawartości związków fenolowych

Zawartość związków fenolowych oznaczono przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu [52]. Jako wzorzec zastosowano kwas galusowy, a wyniki wyrażono w ekwiwalentach kwasu galusowego (GAE) (**publikacja 1**).

7.4.2 Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej metodą redukcji DPPH*

Oznaczenie przeprowadzono poprzez dodanie różnych ilości naparów lub roztworu Troloxu do 200 μ L roztworu DPPH* (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu) w stężeniu 0,3 mM w metanolu. Mieszaninę inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 30 minut, a następnie mierzono spadek absorbancji przy długości fali 517 nm (**publikacja 1**).

7.4.3 Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej metodą redukcji rodnika ABTS*

Aktywność antyoksydacyjną oznaczano zgodnie z metodą odbarwienia rodnika ABTS* opracowaną przez Re i wsp. (1963), z drobnymi modyfikacjami [43,53]. Roztwór macierzysty rodnika ABTS* przygotowano przez utlenianie ABTS nadsiarczanem potasu przez około 16 godzin. Do oznaczeń używano przezroczystych, płaskodennych płytek 96-dołkowych. Do każdego dołka dodawano 200 μ L roztworu rodnika ABTS* rozcieńczonego w PBS w taki sposób, aby uzyskać absorbancję równą 1,0 przy 734 nm w czytniku mikropłytek. Następnie do każdego dołka dodawano odpowiednie porcje (takie które nie powodowały redukcji przekraczającej 90% obecnego w próbce rodnika) naparów, roztworów aminokwasów lub białek zawierających wzrastające ilości badanych substancji lub roztworów Troloxu (wzorzec). Spadek absorbancji mierzono po 30-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej - bądź też dłuższe czasy inkubacji (**publikacja 1, 2, 3**).

7.4.4 Metoda oznaczenia zdolności redukowania jonów miedzi CUPRAC

Zastosowano zmodyfikowaną procedurę według Özyürek i wsp. (2011): 50 μ L buforu Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) zmieszano z 50 μ L roztworu CuSO₄ (10 mM), 50 μ L roztworu neokuproiny rozpuszczonej w etanolu (7,5 mM) oraz z odpowiednimi ilościami próbki lub

roztworu aminokwasów, herbat, kawy, kakao, naparów ziół oraz przypraw, Troloxu i PBS (w ilości uzupełniającej próbkę do 50 μL) w dołkach przezroczystej płytki 96-dołkowej. Po 60 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej absorbancję mierzono przy 450 nm względem próby kontrolnej, nie zawierającej antyoksydantów [54]. Metody CUPRAC nie można było wykorzystać do oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej białek, ponieważ zaobserwowano istotne wytrącanie białka, prawdopodobnie z powodu wysokiego stężenia etanolu w próbkach (**publikacja 1, 2**).

7.4.5 Metoda oznaczenia zdolności redukowania jonów żelaza FRAP (ang. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Oznaczenie przeprowadzono według zmodyfikowanej procedury Benzie i Strain (2011). Roztwór roboczy przygotowano mieszając dziesięć objętości 0,3 M buforu octanowego (pH 3,6), jedną objętość 10 mM TPTZ w 40 mM HCl oraz jedną objętość 20 mM FeCl_3 [55]. Do dołków płytki 96-dołkowej zawierających 200 μL świeżo przygotowanego roztworu roboczego dodawano porcje wzrastające ilości badanych materiałów. Próbki zawierające białka po dodaniu do roztworu roboczego stawały się lekko mętne, dlatego przed pomiarem odwirowywano je. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej mierzono absorbancję przy 593 nm względem próby odczynnikowej. Aktywność antyoksydacyjną obliczano i wyrażano w TE (**publikacja 1, 2**).

7.4.6 Generowanie nadtlenku wodoru (H_2O_2)

Generowanie nadtlenku wodoru przez ekstrakty z materiałów roślinnych badano w „czasie zerowym” (około 15 min zalaniu wrzącą wodą) oraz po dalszej inkubacji przez 1 godzinę. Kwas galusowy i pirogallol rozpuszczano w buforze fosforanowym PBS, aby ustabilizować pH. Roztwór kwercetyny (100 mM) przygotowano w DMSO, a następnie rozcieńczano w PBS. Generowanie H_2O_2 przez poszczególne polifenole (kwas galusowy, pirogallol i kwercetynę, w stężeniach 0,5, 1, 2 i 5 mM) badano w „czasie zerowym” (czyli około 5-7 minut po zalaniu substancji wodą) oraz po inkubacji ich roztworów przez 1, 2 i 3 godziny w temperaturze pokojowej). Redukcję nadtlenku wodoru przez związki fenolowe badano poprzez inkubację 5-50 μM nadtlenku wodoru z tymi polifenolami w różnych stężeniach, a następnie oznaczano stężenie H_2O_2 w próbkach (**publikacja 1**).

7.4.7 Detekcja wytworzonego H₂O₂

Stężenie nadtlenu wodoru oznaczano metodą z oranżem ksylenolowym [56], a w celu zapewnienia specyficzności oznaczenia zastosowano katalazę [57]. Do dwóch dołków płytki 96-dołkowej nanoszono po 180 µL badanego naparu. Do jednego dołka dodawano 2 µL wody destylowanej, a do drugiego 2 µL roztworu katalazy (1 mg/mL). Po 15 minutach inkubacji do obu dołków dodawano po 20,2 µL roztworu oranżu ksylenolowego (2,5 mM) oraz 2,5 mM roztworu soli Mohra w 1,1 M kwasie nadchlorowym). Następnie, po 30 minutach inkubacji, mierzono absorbancję przy długości fali 560 nm. Różnica absorbancji pomiędzy próbką bez katalazy a próbką zawierającą katalazę jest miarą stężenia H₂O₂. Ilość katalazy była dobrana tak, aby zapewniała całkowity rozkład 1 mM nadtlenu wodoru obecnego w 200 µL próbce w ciągu 15 minut. Stężenie nadtlenu wodoru obliczano na podstawie krzywej wzorcowej (**publikacja 1**).

W przypadku oznaczania materiałów zawierających wysokie stężenia polifenoli (które hamują aktywność katalazy) dla oznaczania H₂O₂, stosowano alternatywną metodę. Polegała ona na odjęciu absorbancji zmierzonej w próbce potraktowanej odczynnikami kontrolnym (zawierającym sól Mohra i kwas nadchlorowy, lecz bez oranżu ksylenolowego) od wartości absorbancji zmierzonej dla próbki badanej [47,57] (**publikacja 1**).

7.4.8 Denaturacja białek

W identyczny sposób postępowano z białkiem jaja kurzego (10 x rozcieńczonym PBS), oraz roztworem albuminy surowicy bydlęcej (BSA) (500 µg/mL w PBS). Do 9 objętości i roztworu BSA białka dodawano 1 objętość 5% roztworu SDS i porównywano z roztworem do którego w tej samej proporcji dodano wodę destylowaną. W tak przygotowanych białkach oznaczano aktywność antyoksydacyjną metodami podanymi wyżej (**publikacja 2**).

7.4.9 Trawienie enzymatyczne białek

W identyczny sposób postępowano z białkiem jaja kurzego (10 x rozcieńczonym w PBS), oraz roztworem BSA (10 mg/mL w PBS). Roztwory białek inkubowano przez 24 godziny z dodatkiem papainy (2 mg/mL) w temperaturze 37°C. Równolegle inkubowano próbki kontrolne (białka bez dodatku papainy), oraz roztwory samej papainy (2 mg/mL w PBS). Alternatywnie do BSA (5 mg/mL w PBS) i 10 x rozcieńczonego białka jaja kurzego dodano

0,05% roztworu trypsyny w stosunku 1 objętość roztworu enzymu (PBS w przypadku próby kontrolnej) na 9 części roztworu białka i inkubowano w 37°C przez 3 godziny. Następnie oznaczano TEAC białek oraz TEAC papainy lub trypsyny których aktywności odejmowano od oznaczonej dla białek strawionych odpowiednio papainą lub trypsyną (**publikacja 2**).

7.4.10 Nitrowanie reszt tyrozynowych albuminy surowicy bydlęcej (BSA)

Do roztworu BSA (20 mg/mL w 0,2 M buforze cytrynianowym sodu, pH 5, 100 µL) dodano kolejno 20 µL roztworu azotynu sodu (200 mM) oraz 20 µL roztworu H₂O₂ (200 mM), dokładnie wymieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Tę samą ilość azotynu sodu i nadtlenu wodoru dodawano jeszcze dwukrotnie w odstępach co 2 godziny (**publikacja 3**).

7.4.11 Oznaczanie fluorescencyjne tworzenia ditryozyny

Do roztworu tyrozyny (2 mM) w 50 mM buforze fosforanowym (pH 8,0) dodano równą objętość roztworu ABTS[•] o stężeniu 1,63 mM. Widma fluorescencji mierzono natychmiast po zmieszaniu oraz co 10 minut przy użyciu spektrofluorymetru Hitachi F-2500 (Tokio, Japonia) przy długości fali wzbudzenia 320 nm [58,59], stosując szerokość szczelin wzbudzenia i emisji równą 5 nm (**publikacja 3**).

7.4.12 Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego

Pomiary EPR przeprowadzono przy użyciu spektrometru FT-EPR ELEXSYS E580 firmy Bruker (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten, Niemcy) działającego w paśmie X (9,378989 GHz). Zastosowano następujące parametry pomiarowe: amplituda modulacji - 0,4 G; częstotliwość modulacji - 100 kHz; moc mikrofal - 94,64 mW; tłumienie mocy - 2 dB; czas konwersji - 25 ms; czas skanowania - 102,4 s. centralne pole magnetyczne - 3353,15 G; zakres skanowania - 100 G; liczba akumulacji - 10. Widma rejestrowano i analizowano przy użyciu oprogramowania Xepr 2.6b.74 (**publikacja 3**).

7.4.13 Statystyka

Wszystkie pomiary wykonano co najmniej w trzech powtórzeniach, a każde oznaczenie przeprowadzono co najmniej trzykrotnie na niezależnych próbkach. Ponieważ zależności zmian absorbancji od stężenia aminokwasów były liniowe, nachylenia tych krzywych obliczano za pomocą funkcji REGLINP w programie Excel. W przypadku białek do obliczeń aktywności

antyoksydacyjnej wykorzystywano liniowy zakres zależności. Błąd aktywności antyoksydacyjnej wyliczano na podstawie błędów nachyleń krzywych zmian absorbancji w funkcji ilości próbki badanej oraz dla kontroli Troloxu, stosując metodę różniczki zupełnej: błąd aktywności antyoksydacyjnej = $\sqrt{(\text{błąd nachylenia})^2 + (\text{błąd nachylenia Troloxu})^2}$.

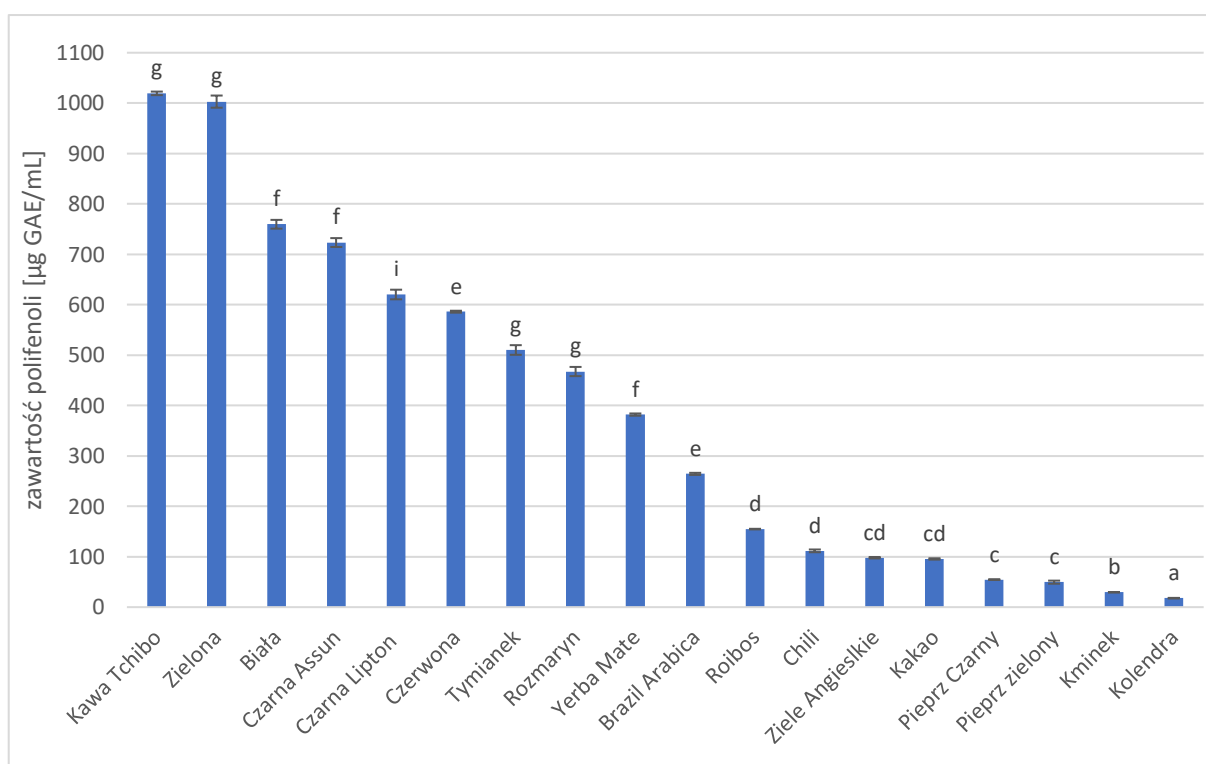
Istotność statystyczną różnic oceniano za pomocą dwustronnego testu t-Studenta (Excel) (**publikacja 1, 2,3**).

Istotność statystyczną różnic oceniano za pomocą analizy wariancji (ANOVA) z zastosowaniem testu post-hoc LSD Fishera, przyjmując granicę istotności statystycznej równą 0,05. Istotność współczynników korelacji szacowano przy użyciu testu t-Studenta. Analizę statystyczną danych przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu STATISTICA (wersja 13.1, StatSoft Inc., 2016, Tulsa, OK, USA) (**publikacja 1**).

8. WYNIKI

8.1 Zawartość polifenoli w roślinnych naparach i przyprawach

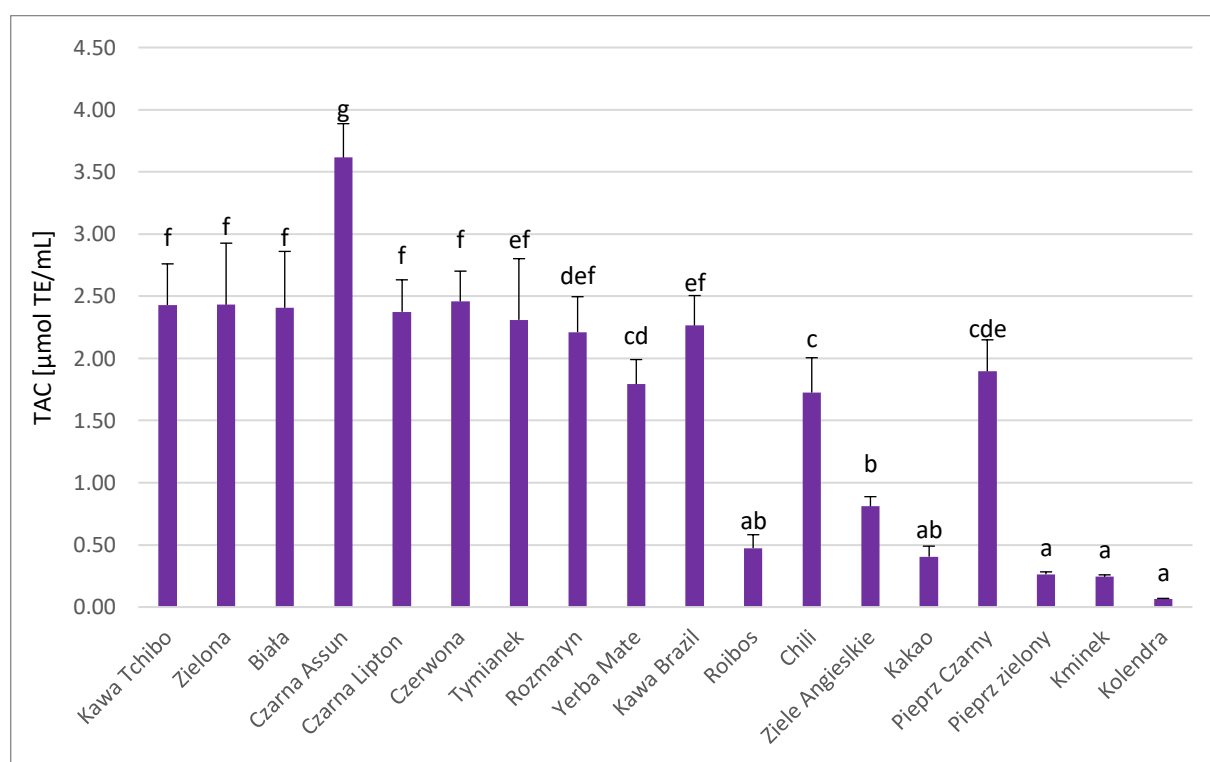
Badane napary roślinne obejmujące: herbata biała, herbata zielona, herbata czarna i herbata czerwona, rooibos, yerba mate, kawa Tchibo i Brazil, kakao, rozmaryn, tymianek Ziele angielskie, chili, zielony i czarny pieprz, kminek i kolendrę, charakteryzowały się szerokim zakresem stężenia polifenoli - od około 20 do nawet 1020 $\mu\text{g GAE/mL}$. Na (Wykresie 1) przedstawiono stężenie polifenoli wyrażone jako $\mu\text{g GAE/mL}$ w analizowanych próbkach roślinnych. Najwyższą zawartością polifenoli charakteryzowała się kawa Tchibo ($1019,33 \pm 3,53 \mu\text{g GAE/mL}$), herbata zielona ($1002,96 \pm 12,07 \mu\text{g GAE/mL}$), oraz herbata biała ($759,63 \pm 8,71 \mu\text{g GAE/mL}$). Wśród przypraw i ziół najwyższą zawartość odnotowano dla tymianku ($510,21 \pm 9,57 \mu\text{g GAE/mL}$) i rozmarynu ($467,46 \pm 9,11 \mu\text{g GAE/mL}$). Najniższą zawartość polifenoli zarejestrowano w przypadku kolendry ($17,77 \pm 0,63 \mu\text{g/mL}$).



Wykres 1. Zawartość polifenoli kawy, kakao, herbaty i ekstraktów z ziół i przypraw leczniczych. Wartości z różnymi literami są znacząco różne przy $p < 0,05$ (test ANOVA) [badania własne, publikacja 1].

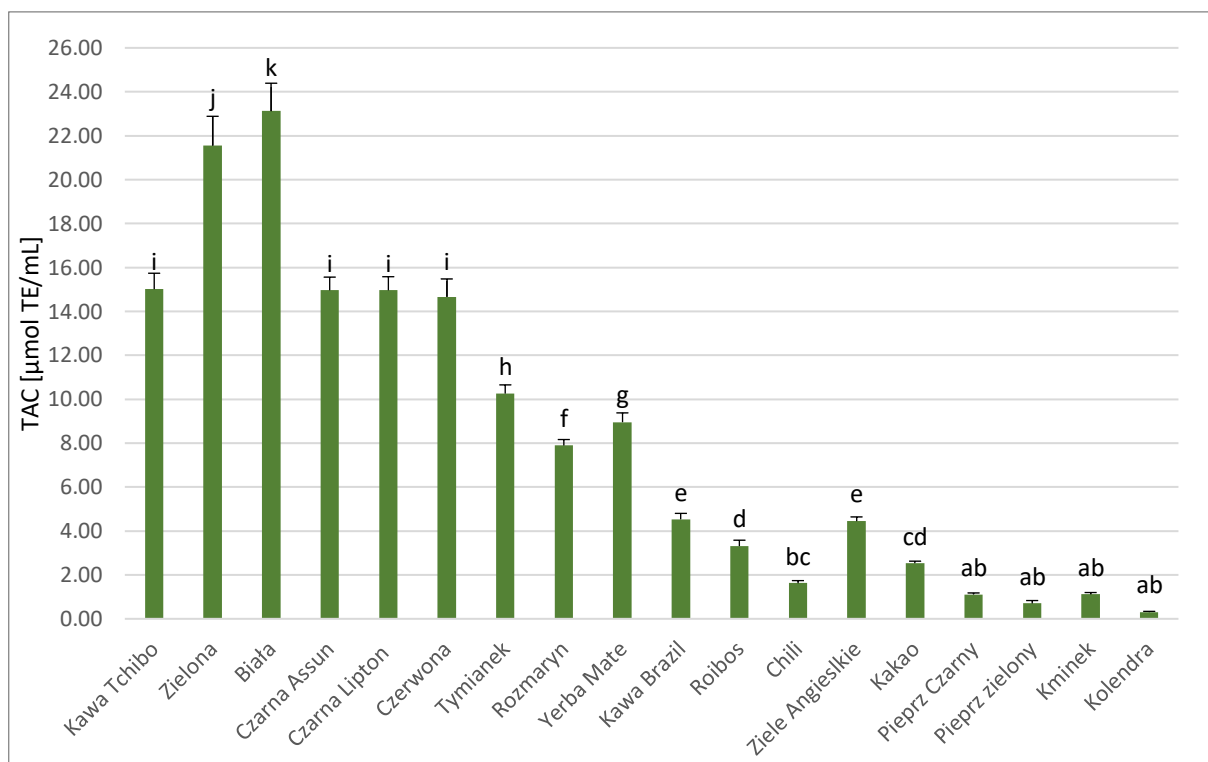
8.2 Całkowita zdolność przeciwutleniająca w roślinnych naparach i przyprawach

Podobnie jak w przypadku zawartości polifenoli TAC mierzona metodą oznaczoną z wykorzystaniem rodnika DPPH* próbki roślinne charakteryzowały się szerokim zakresem: od $0,0636 \pm 0,0062$ nmol TE/ μ L (kolendra) do $3,61 \pm 0,27$ nmol TE/ μ L (czarna herbata Assam) (Wykres 2). Stosunkowo wysokie TAC uzyskano również dla kawy Tchibo, oraz herbat: zielonej, białej, czarnej Lipton, czerwonej które były statystycznie jednorodne i mieściły się w zakresie około 2,4 nmol TE/ μ L. TAC naparów ziołowych i przypraw (tymianek, rozmaryn, yerba mate) była niższa i mieściła się w zakresie od $2,21 \pm 0,28$ nmol/ μ L (rozmaryn) do $1,8 \pm 0,20$ nmol/ μ L (yerba mate).



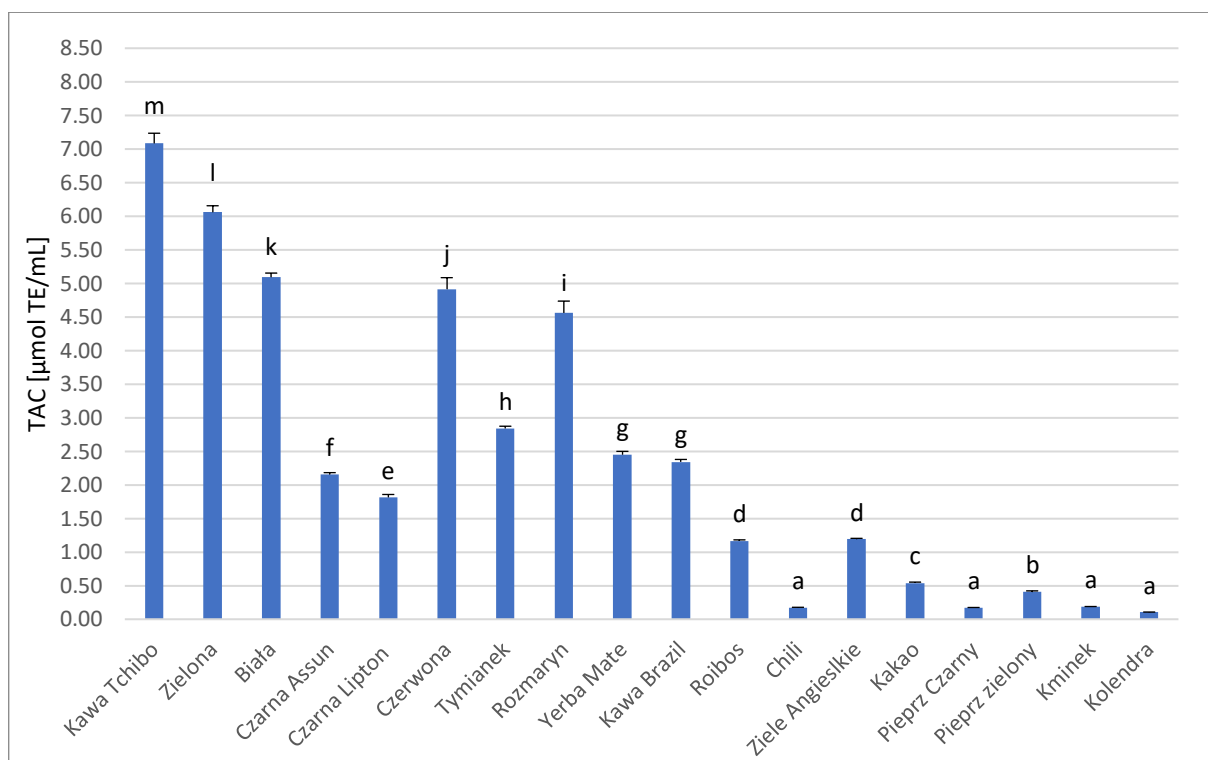
Wykres 2. Całkowita zdolność antyoksydacyjna mierzona metodą redukcji DPPH* kaw, kakao, herbat i ekstraktów z ziół i przypraw leczniczych. Wartości z różnymi literami są znacząco różne przy $p < 0,05$ (test ANOVA) [badania własne, publikacja 1].

Dla analizowanych próbek roślinnych wyznaczono także aktywność antyoksydacyjną metodą redukcji ABTS*. W przypadku ekstraktów roślinnych wartości TAC (wyrażone w nmol TE/ μ L) mieściły się w szerokim zakresie: od $0,30 \pm 0,03 \mu\text{mol TE/mL}$ (kolendra) do $23,12 \pm 1,27 \mu\text{mol TE/mL}$ (herbata biała) (Wykres 3). Najwyższą aktywność wykazały herbata biała, zielona ($21,55 \pm 1,33 \mu\text{mol TE/mL}$) oraz kawa Tchibo ($15,01 \pm 0,72 \mu\text{mol TE/mL}$). Próbkę przypraw, takie jak tymianek ($10,25 \pm 0,34$) i rozmaryn ($7,90 \pm 0,27 \mu\text{mol TE/mL}$), również wykazywały istotną aktywność przeciwutleniającą. Najniższą aktywność zaobserwowano w kolendrze pieprzu zielonym i czarnym oraz kminku a ich wartości TAC były niższe niż $< 1 \mu\text{mol TE/mL}$.



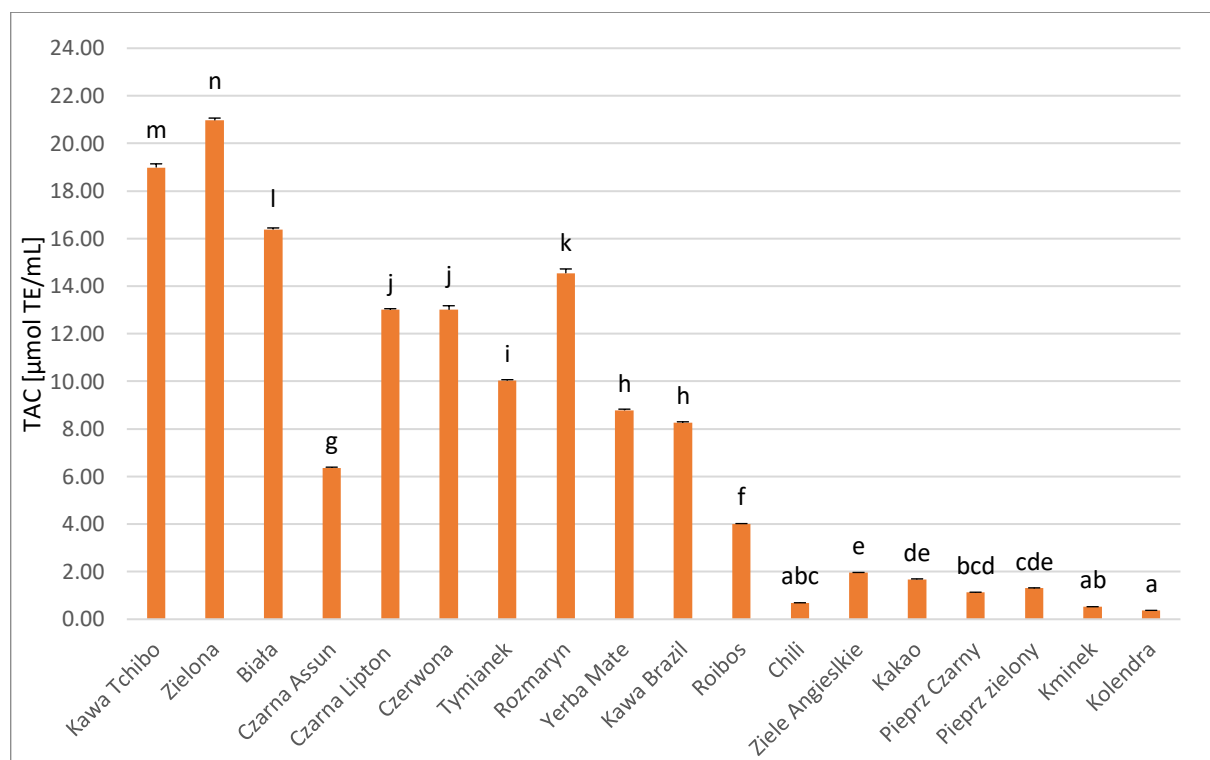
Wykres 3. Całkowita zdolności antyoksydacyjna mierzona metodą redukcji ABTS* kaw, kakao, herbat i ekstraktów z ziół i przypraw leczniczych. Wartości z różnymi literami są znacząco różne przy $p < 0,05$ (test ANOVA) [badania własne, publikacja 1].

Najwyższe wartości TAC oznaczone metodą FRAP osiągnięto dla kawy Tchibo ($7,08 \pm 0,15 \mu\text{mol TE/mL}$), a najniższe dla kolendry ($0,105 \pm 0,002 \mu\text{mol TE/mL}$) (Wykres 4). Stosunkowo wysoką aktywność wykazywały zielona herbata ($6,06 \pm 0,10 \mu\text{mol TE/mL}$) i herbata biała ($5,09 \pm 0,06 \mu\text{mol TE/mL}$). Spośród przypraw i ziół najwyższe wartości odnotowano w rozmarynie ($4,56 \pm 0,17 \mu\text{mol TE/mL}$) i tymianek ($2,84 \pm 0,17 \mu\text{mol TE/mL}$). Najniższą aktywność, kakao, pieprz zielony i czarny, kminek, chili, oraz kolendra (poniżej $0,5 \mu\text{mol TE/mL}$).



Wykres 4. Całkowita zdolności antyoksydacyjnej mierzona metodą FRAP kaw, kakao, herbat i ekstraktów z ziół i przypraw leczniczych. Wartości z różnymi literami są znacząco różne przy $p < 0,05$ (test ANOVA) [badania własne, publikacja 1].

Wartości TAC w metoda oznaczenia zdolności redukowania jonów miedzi były najwyższe dla zielonej herbaty ($21,00 \pm 0,77$ nmol TE/ μ L) i kawy Tchibo ($19 \pm 0,40$ nmol TE/ μ L), a najniższe dla kolendry ($0,37 \pm 0,023$ nmol TE/ μ L). Wyraźnie wysoką aktywność wykazały również herbata biała ($16,40 \pm 0,75$ nmol TE/ μ L), rozmaryn ($14,54 \pm 0,44$ nmol TE/ μ L) i czerwona herbata ($13,00 \pm 0,63$ nmol TE/ μ L). Najniższe wyniki (poniżej 2 nmol TE/ μ L) zaobserwowano w chili, ziele angielskim, kakao pieprzu zielonym i pieprzu czarnym, kminku oraz w kolendrze (Wykres 5).

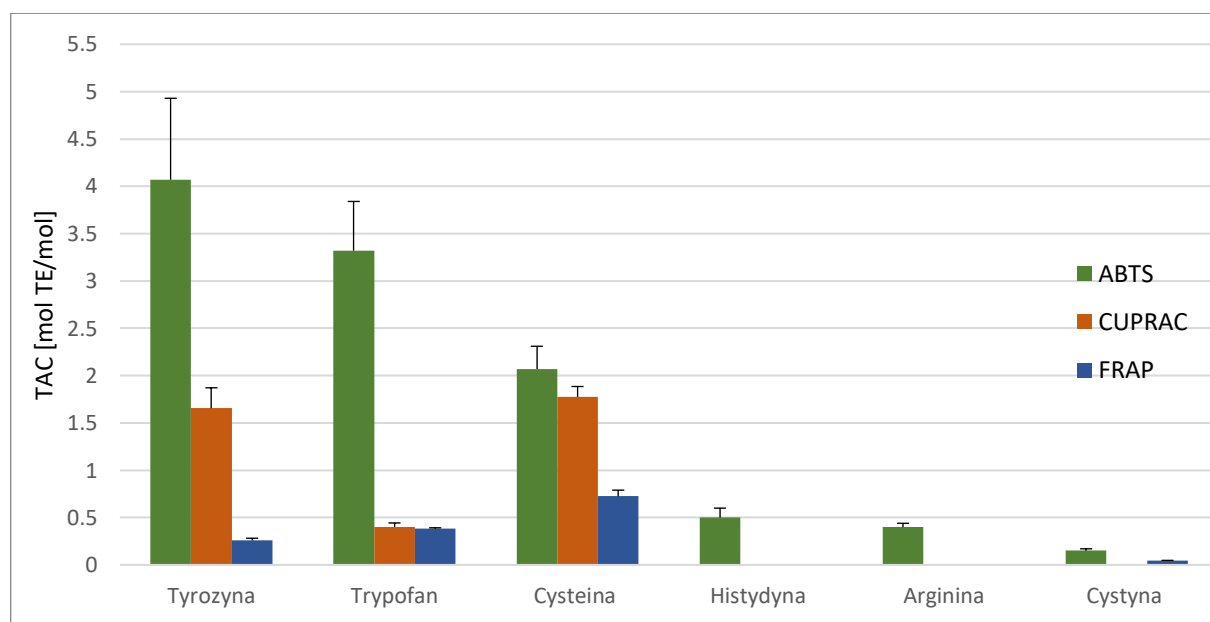


Wykres 5. Całkowita zdolności antyoksydacyjna mierzona metodą CUPRAC kaw, kakao, herbat i ekstraktów z ziół i przypraw leczniczych. Wartości z różnymi literami są znacząco różne przy $p < 0,05$ (test ANOVA) [badania własne, publikacja 1].

8.3 Aktywność antyoksydacyjna aminokwasów

Aktywność antyoksydacyjna białek jest uwarunkowana aktywnością antyoksydacyjną reszt aminokwasowych. Metodą ABTS* wykazano reaktywność sześciu aminokwasów: tyrozyny > tryptofanu > cysteiny > histydyny > argininy > cystyny. Pozostałe sprawdzane aminokwasy: glicyna, lizyna, alanina, leucyna, metionina, seryna, nie wykazywały żadnej wykrywalnej aktywności antyoksydacyjnej (Wykres 6).

W celu dalszej analizy aktywności antyoksydacyjnej badanych aminokwasów zastosowano także test CUPRAC i FRAP. W teście CUPRAC aktywność antyoksydacyjną wykazywały cysteina > tyrozyna > tryptofan osiągając wartości TAC. Pozostałe badane aminokwasy, takie jak histydyna, arginina oraz cystyna, nie wykazały tej aktywności. Podobnie jak w teście CUPRAC, również w metodzie FRAP najwyższą aktywność wykazywała cysteina a potem kolejne aminokwasy tryptofan > tyrozyna > cystyna.



Wykres 6. Reaktywność aminokwasów w trzech metodach oceny aktywności przeciwutleniającej [badania własne, publikacja 2].

8.4 Aktywność antyoksydacyjna białek po denaturacji i trawieniu

W przypadku analizy wpływu denaturacji i trawienia białek na aktywność antyoksydacyjną (Tabela 2) mierzoną metodą ABTS*. Można zaobserwować że denaturacja białek BSA detergentem SDS istotnie zwiększała aktywność z 174 ± 12 do 250 ± 23 $\mu\text{mol/g}$ (wzrost o 44%). Podobny wzrost aktywności stwierdzono po trawieniu BSA enzymami: papainą

($216 \pm 10 \mu\text{mol/g}$) i trypsyną ($199 \pm 10 \mu\text{mol/g}$) w porównaniu do próbki kontrolnej niepoddanej trawieniu i denaturacji. ($173\text{-}176 \mu\text{mol/g}$). Natomiast w przypadku białka jaja kurzego również aktywności antyoksydacyjnej po denaturacji detergentem SDS wzrosła ($6,82 \pm 0,09$ do $11,39 \pm 1,89 \mu\text{mol/mL}$; wzrost o 67%). Trawienie proteazami (papainą i trypsyną) powodowało także wzrost aktywności, choć w mniejszym stopniu, w przypadku trypsyny z $6,91 \pm 0,55$ do $8,71 \pm 0,86$ (wzrost o 26%). Z kolei wzrost aktywności antyoksydacyjnej białka jaja kurzego po trawieniu trypsyną, wynoszący o 5%, był statystycznie nieistotny.

Tabela 2. Wpływ denaturacji i trawienia na aktywność przeciwutleniającą BSA i białka jaja kurzego [badania własne, publikacja 2].

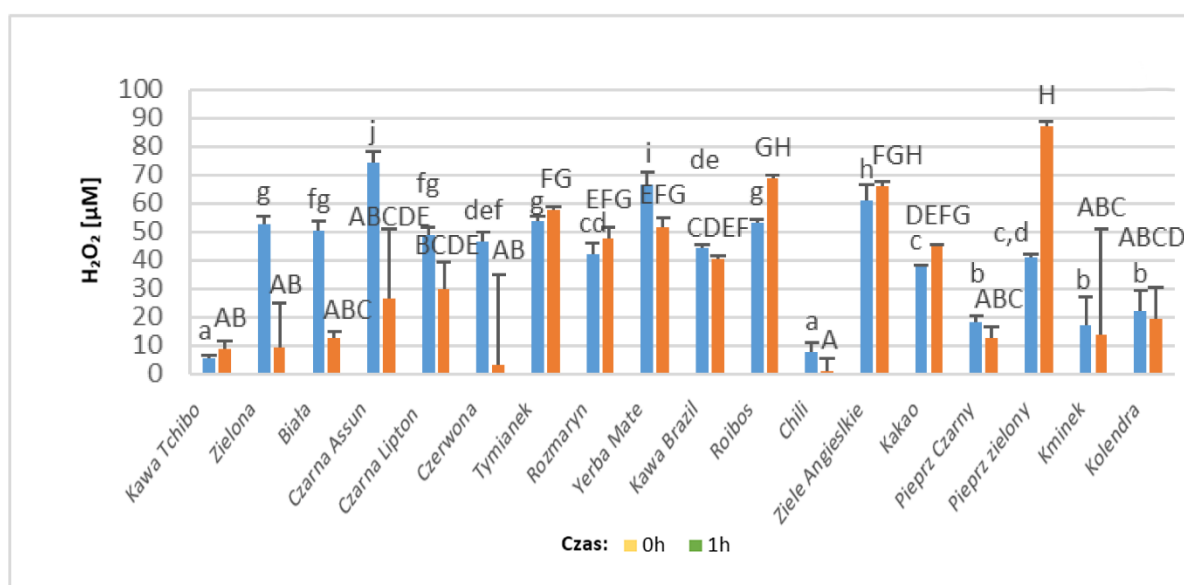
Metoda oznaczenia	Aktywność antyoksydacyjna BSA [$\mu\text{mol/g}$]		Aktywność antyoksydacyjna białka jaja kurzego [$\mu\text{mol/mL}$]	
	Kontrola	Po obróbce	Kontrola	Po obróbce
Denaturacja SDS				
Redukcja rodnika ABTS•	174 ± 12	250 ± 23 ** (144%)	$6,82 \pm 0,09$	$11,39 \pm 1,89$ *** (167%)
FRAP	$35,2 \pm 2,6$	$40,8 \pm 3,0$ * (116%)	$48,6 \pm 4,5$	$63,1 \pm 7,2$ * (130%)
Trawienie papainą				
Redukcja rodnika ABTS•	173 ± 14	216 ± 10 * (125%)	$6,91 \pm 0,55$	$8,71 \pm 0,86$ * (126%)
FRAP	$36,7 \pm 2,1$	$41,2 \pm 1,8$ * (112%)	$46,3 \pm 2,1$	$53,2 \pm 1,5$ * (115%)
Trawienie trypsyną				
Redukcja rodnika ABTS•	176 ± 11	199 ± 10 * (113%)	$6,79 \pm 0,51$	$7,10 \pm 0,38$ ^{NS} (105%)

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ^{NS}, statystycznie nieistotny

Analogicznie do wyników z reakcją z rodnikiem ABTS•, wyniki uzyskane metodą FRAP wykazały wzrost aktywności antyoksydacyjnej po traktowaniu białek roztworem SDS, oraz proteazą - papainą. Dla BSA denaturacja SDS zwiększała aktywność z $35,2 \pm 2,6$ do $40,8 \pm 3,0 \mu\text{mol/g}$ (wzrost o 16%). Podobny wzrost aktywności wykazano po trawieniu BSA enzymami: trypsyną $199 \pm 10 \mu\text{mol/g}$, (wzrost o 13%) i papainą $41,2 \pm 1,8 \mu\text{mol/g}$ (wzrost o 12%). Wzrost aktywności wykazano również w próbkach białka jaja kurzego. TAC tego białka wzrosła po denaturacji detergentem SDS z $48,6 \pm 4,5$ do $63,1 \pm 7,2 \mu\text{mol/mL}$ (wzrost o 30%). Trawienie papainą również powodowało wzrost aktywności dla z $46,3 \pm 2,1$ do $53,2 \pm 1,5 \mu\text{mol/mL}$ (wzrost o 15%).

8.5 Generacja nadtlenu wodoru

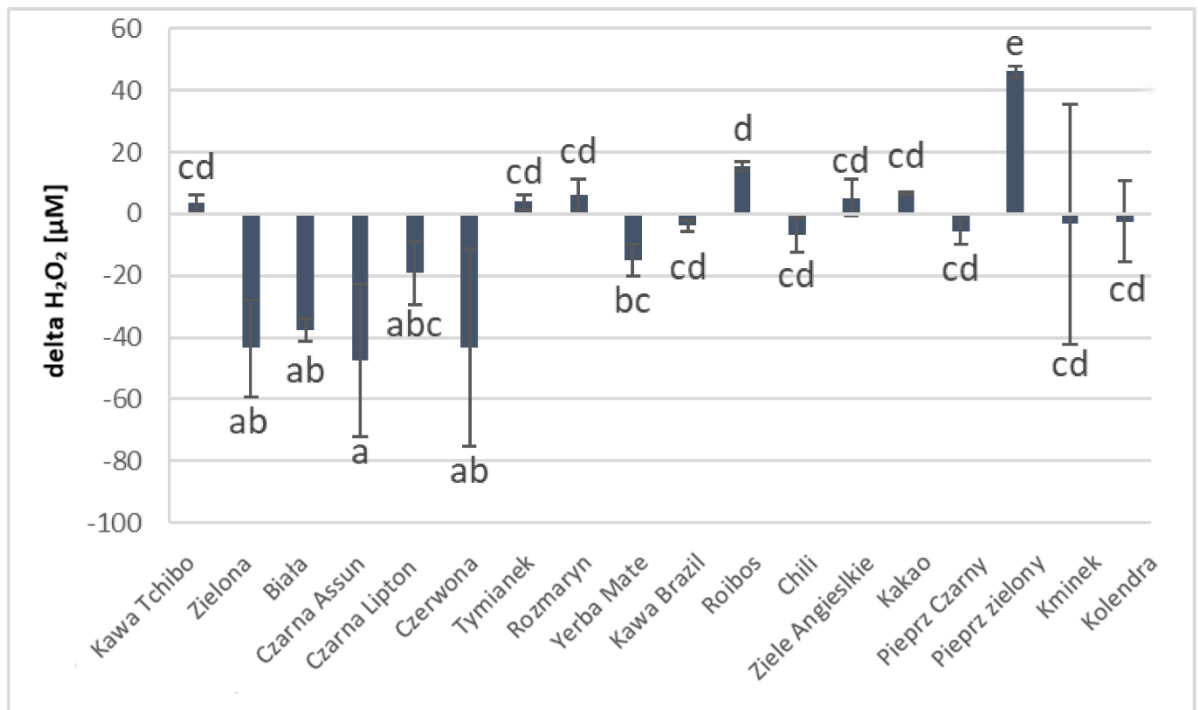
Badano stężenie H_2O_2 w świeżo przygotowanych naparach („0h”) oraz po 1 godzinie inkubacji w temperaturze pokojowej (Wykres 7). Zaobserwowano istotne różnice w ilości H_2O_2 wytworzonego na początku eksperymentu. Najwyższe początkowe stężenia H_2O_2 ($74,3 \pm 2,7 \mu M$ i $66,7 \pm 4,4 \mu M$) stwierdzono w naparach czarnej herbaty i yerba mate, natomiast najniższe ($5,4 \pm 1,2 \mu M$ i $7,7 \pm 0,2 \mu M$) w naparze kawy Tchibo oraz w ekstrakcie z chili. Po godzinie inkubacji największy wzrost stężenia H_2O_2 odnotowano w ekstrakcie z zielonej papryki. Warto zauważyć, że początkowo wysokie stężenie H_2O_2 nie zawsze wiązało się z dalszym wzrostem jego zawartości po 1 godzinie inkubacji. W niektórych ekstraktach, takich jak herbaty: czarna, biała, Assun, Lipton i czerwona stężenie H_2O_2 uległo znacznemu zmniejszeniu.



Wykres 7. Stężenie nadtlenu wodoru w ekstraktach w „zerowym” i po 1 godzinie. Wartości z różnymi literami są znacząco różne przy $p < 0,05$ (test ANOVA) [badania własne, publikacja 1].

W dalszej części pracy zbadano generowanie H_2O_2 przez wybrane polifenole (pirogallol, kwas galusowy i kwercetynę) oraz ich reakcje z H_2O_2 (Wykres 8). Wszystkie badane polifenole generowały H_2O_2 , jednak ilość H_2O_2 była nieproporcjonalna ani do czasu inkubacji, ani do stężenia polifenolu. Pirogalol wykazywał najwyższe wartości generowania H_2O_2 przy najniższym stężeniu (0,5 mM) we wszystkich punktach czasowych (0, 1, 2 i 3 godziny). Stężenie nadtlenu wodoru wzrastało po pierwszej godzinie inkubacji i pozostawało stabilne w kolejnych godzinach. Wraz ze wzrostem stężenia pirogallolu (1 i 2 mM) ilość generowanego

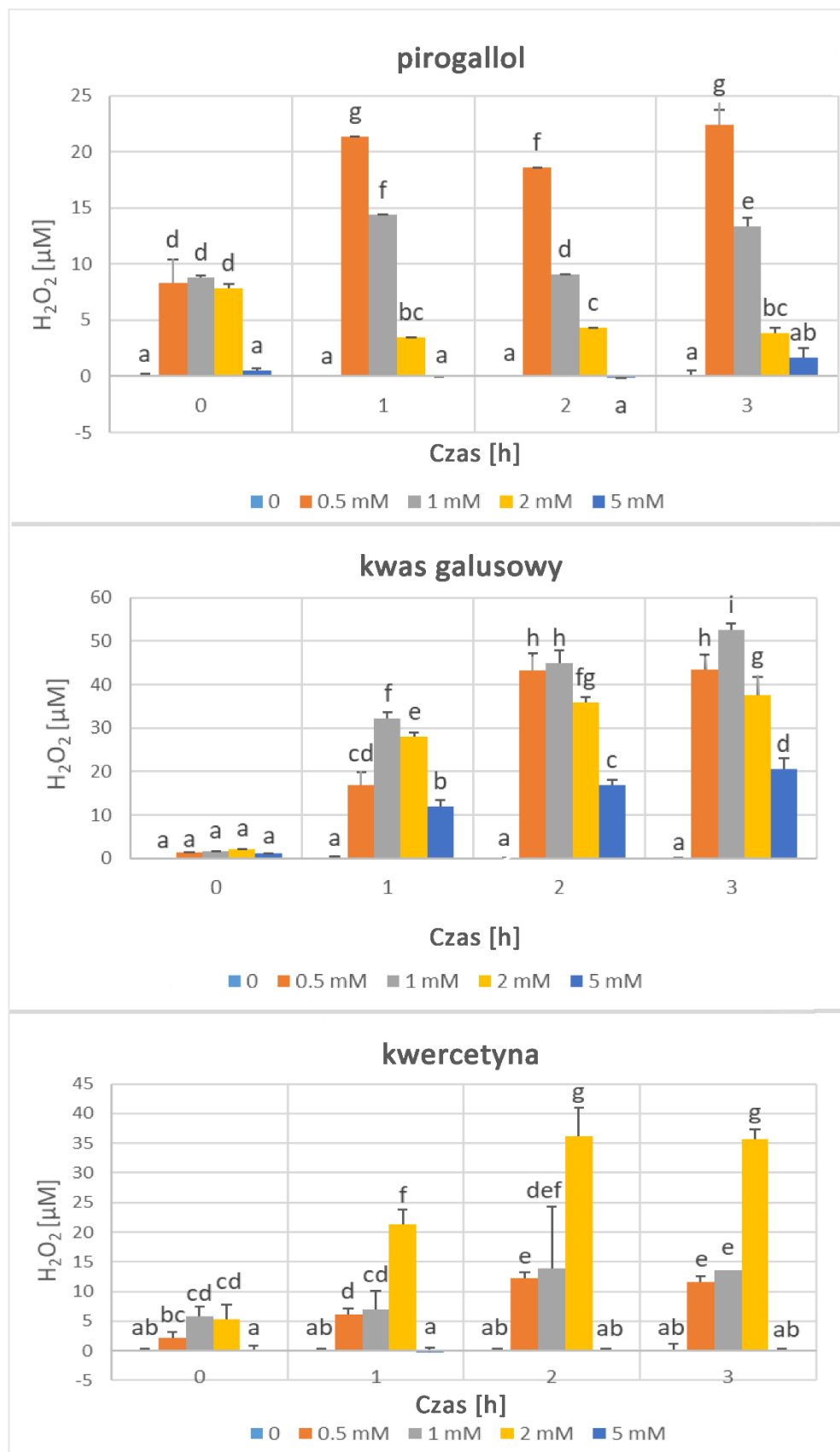
H₂O₂ była niższa niż przy 0,5 mM, a dla najwyższego stężenia (5 mM) dopiero w trzeciej godzinie inkubacji wykryto obecność H₂O₂.



Wykres 8. Różnica między czasem zerowym i po 1h stężenie nadtlenu wodoru w ekstraktach. Wartości z różnymi literami są znacząco różne przy $p < 0,05$ (test ANOVA). [badania własne, publikacja 1].

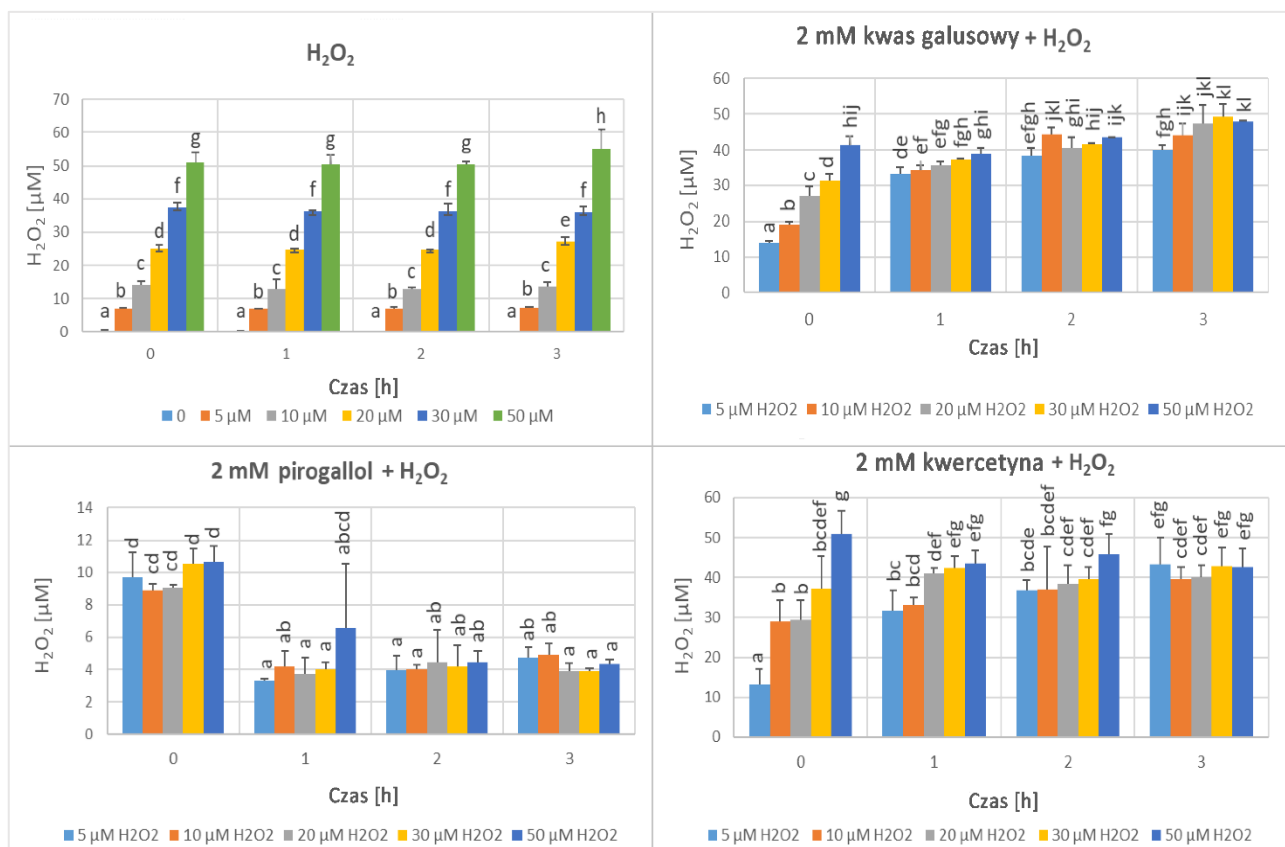
Kwas galusowy w punkcie czasowym 0h charakteryzował się bardzo niskimi stężeniami H₂O₂, porównywalnymi między wariantami. Po jednej godzinie inkubacji wzrost H₂O₂ zaobserwowano przy stężeniach 0,5-2 mM, z najwyższymi wartościami przy 1-2 mM. Po 2 i 3 godzinach poziomy te utrzymywały się na wysokim poziomie, a przy trzeciej godzinie najwyższe stężenia nadal występowały przy 2 mM. Dla 5 mM kwasu galusowego stężenie H₂O₂, ale również wykazywało tendencję wzrostową wraz z upływem czasu.

Kwercetyna początkowo (0h) generowała niewielkie ilości H₂O₂, bez wyraźnego trendu stężeniowego. Po jednej godzinie inkubacji stwierdzono wzrost generowania H₂O₂, z najwyższą przy stężeniu 2 mM. Po 2 i 3 godzinach inkubacji generowanie H₂O₂ nadal wzrastało przy stężeniu 2 mM. Wyższe stężenie 5 mM wykazywało aktywność zbliżoną do 0,5-1 mM.



Wykres 9. Stężenie nadtlenku wodoru w funkcji stężenia i czasu inkubacji, pirogallolu, kwasu galusowego i kwercetyny. Wartości z różnymi literami są znacząco różne przy $p < 0,05$ (test ANOVA) [badania własne, publikacja 1].

Sprawdzono również, że badane polifenole mogą reagować z egzogennym nadtlaniem wodoru, co prowadziło do częściowego zmniejszania się stężenia H_2O_2 (Wykres 9). Dla pirogalolu zaobserwowano największy spadek stężenia H_2O_2 w próbce z początkowym stężeniem $5 \mu M$, już po pierwszej godzinie inkubacji. W miarę wzrostu początkowego stężenia H_2O_2 różnice te stawały się mniej wyraźne, a wartości stężeń w kolejnych godzinach były zbliżone. W przypadku kwasu galusowego najwyższe spadki stężeń H_2O_2 obserwowano we wszystkich punktach czasowych przy początkowych stężeniach $5-20 \mu M$. Przy wyższych stężeniach ($30-50 \mu M$) poziomy H_2O_2 pozostawały wyższe, co może wskazywać na mniejszy wpływ kwasu galusowego w tych warunkach. Dla kwercetyny, niezależnie od początkowego stężenia H_2O_2 , widoczne było stopniowe zanikanie nadtlenu wodoru w czasie inkubacji. Największe spadki obserwowano przy początkowych stężeniach $5-20 \mu M$, podczas gdy przy wyższych stężeniach ($30-50 \mu M$) wartości były wyższe, choć nadal niższe od kontroli.



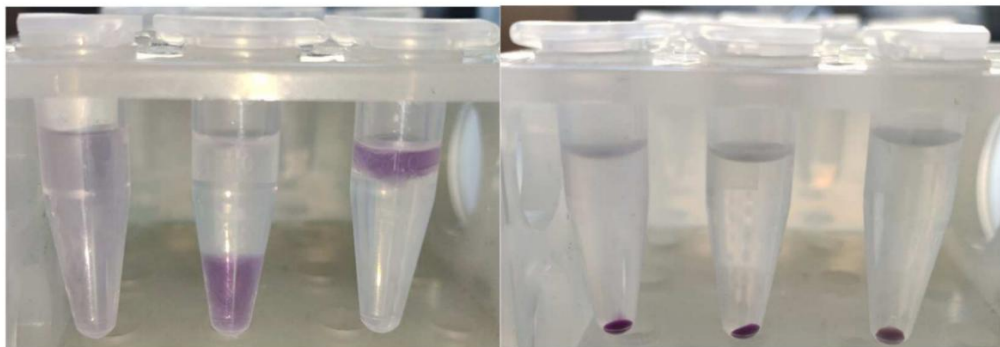
Wykres 10. Stężenia nadtlenu wodoru występujące w roztworach polifenolu zawierających różne stężenia ($5-50 \mu M$) egzogenego nadtlenu wodoru. Wartości z różnymi literami są znacząco różne przy $p < 0,05$ (test ANOVA). [badania własne, publikacja 1].

8.6. Analiza wizualna produktów reakcji ABTS[•]

W warunkach typowych reakcja rodnika ABTS[•] z przeciwutleniaczami prowadzi do zaniku intensywnej barwy, co odzwierciedla redukcję rodnika. Jednak w przypadku reakcji ABTS[•] z białkami zaobserwowano powstawanie charakterystycznego fioletowego produktu (Rysunek 2). Produkt łączył się mocno z BSA i strącał się razem z nim po dodaniu TCA, etanolu, chloroformu czy acetonu, pozostawiając klarowną, wolną od białka warstwę nad osadem lub dolną warstwę w przypadku chloroformu (Rysunek 3). W analizie aminokwasów nie stwierdzono powstawania produktu w reakcji ABTS[•] z cysteiną, cystyną, histydyną, metioniną, seryną, leucyną, alaniną, argininą ani glicyną. Również GSH, GSSG oraz glicyloglicyna nie prowadziły do reakcji w której powstawał fioletowy produkt. Wyjątek stanowiła tyrozyna, która reagowała z ABTS[•], prowadząc do powstania barwnego produktu (Rysunek 2).



Rysunek 2. Kolory powstałe w wyniku reakcji BSA (10 mg/mL) z ABTS[•] (107 μ M), z lewej, oraz reakcji tyrozyny (2 mM) z ABTS[•] (107 μ M), z prawej. Objętość reakcji: 1 mL, czas reakcji: 1 godzina [badania własne, publikacja 3].

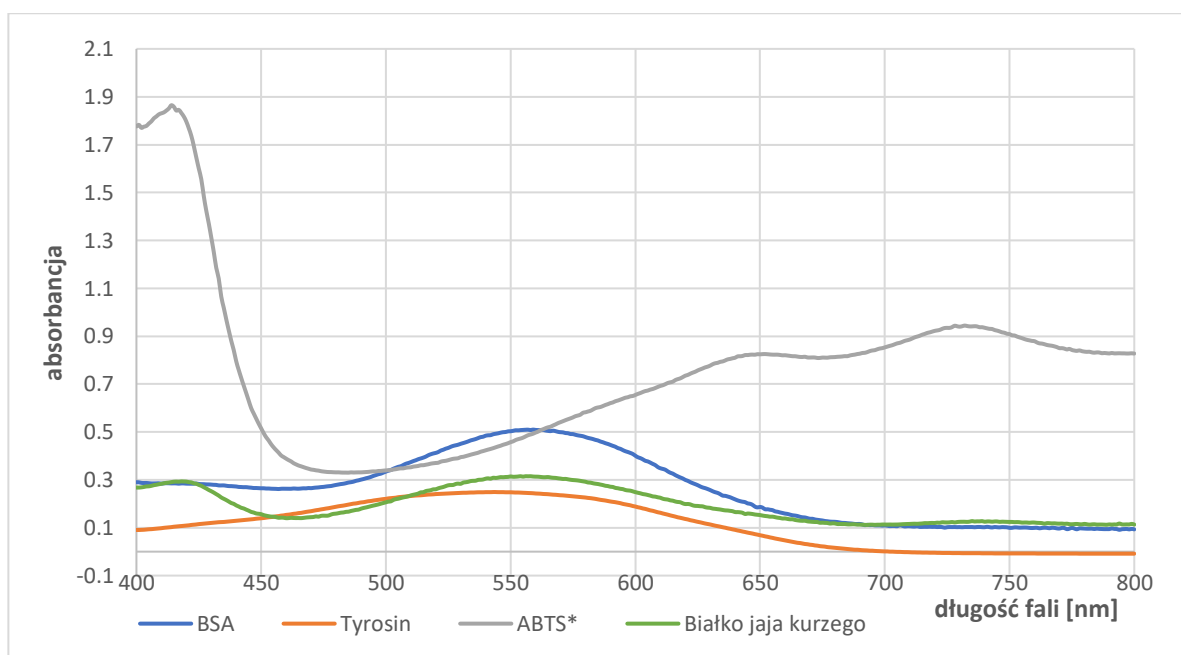


Rysunek 3. Współstrącanie fioletowego produktu z BSA po potraktowaniu (od lewej do prawej): PBS (brak wytrącania), eter dietylowy, chloroform, etanol, aceton i 10% TCA (kwas trichlorooctowy) [badania własne, publikacja 3].

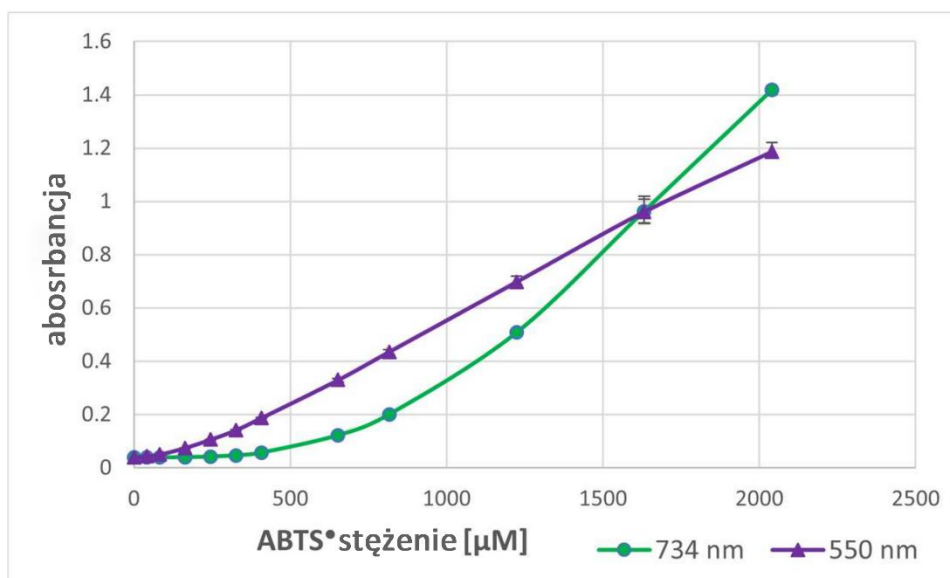
8.7 Charakterystyka reakcji ABTS* z białkami i tworzenie fioletowego produktu

W badaniu widma absorpcyjnego w zakresie 400-800 nm dla wybranych próbek (ABTS*, BSA, białko jaja kurzego, oraz tyrozyna) zaobserwowano charakterystyczne maksimum absorpcji w okolicach 650-750 nm dla rodnika ABTS*. Po inkubacji białek oraz tyrozyny z rodnikiem oprócz jego redukcji obserwujemy pojawienie się nowego pasma absorpcji w zakresie 550-560 nm (Wykres 11). Pasma to nie występowało w kontrolnych próbkach, obejmujących sam roztwór ABTS* oraz roztwory białek lub tyrozyny bez dodatku rodnika.

W dalszej części analizy oceniono powstawania produktów reakcji białek z rodnikiem w zależności od długości fal 560 i 734nm (Wykres 12). Widoczny wzrost wartości absorpcji obserwowano w obu długościach fali wraz ze zwiększającym się stężeniem ABTS*, przy czym charakter tej zależności różnił się w zależności od długości fali. W przypadku 734 nm, wykorzystywanego rutynowo w oznaczeniach aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS*, wartości absorpcji wzrastały w sposób liniowy, co odzwierciedlało bezpośrednią redukcję rodnika ABTS* przez badane próbki. Natomiast przy długości fali 550 nm również odnotowano wzrost absorpcji, co wskazuje na jednoczesne tworzenie się dodatkowego fioletowego produktu reakcji.

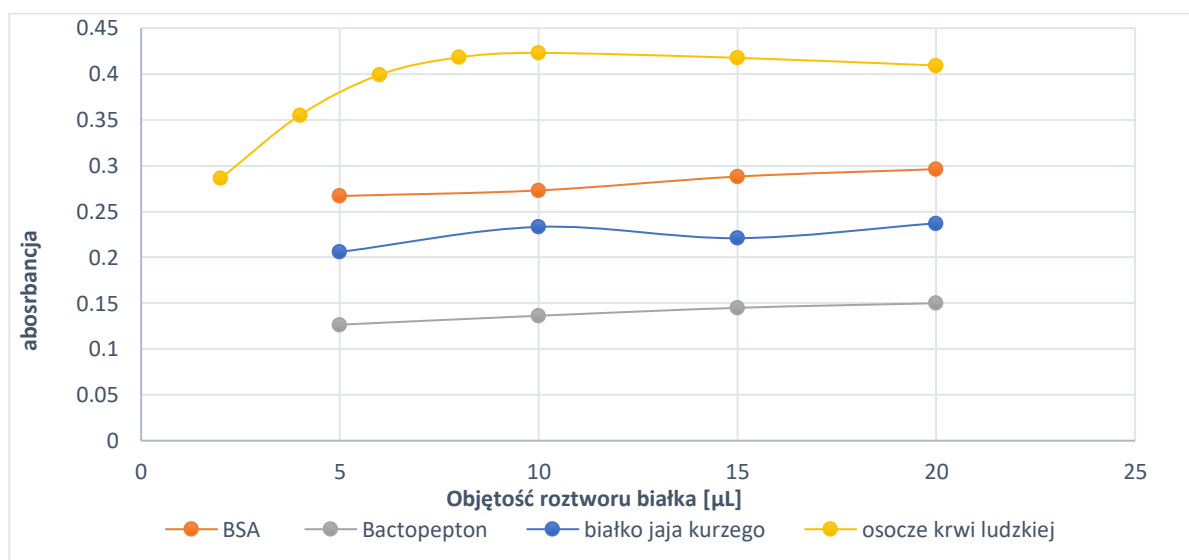


Wykres 11. Widma ABTS i fioletowych produktów reakcji BSA, białka jaja kurzego i tyrozyny z ABTS* [badania własne, publikacja 3].



Wykres 12. Zależność absorbancji produktu fioletowego (550 nm) BSA i ABTS• od stężenia ABTS•. BSA: 10 mg/ml PBS [badania własne, publikacja 3].

Następnie skupiono się na ocenie zależności absorbancji fioletowego produktu (550 nm) od objętości roztworu białka lub próbki zawierającej białko (Wykres 13). W przypadku wszystkich badanych próbek obserwowano wzrost absorbancji wraz ze zwiększającą się objętością roztworu białka, który w większości przypadków ulegał nasyceniu przy wyższych objętościach. Najwyższe wartości absorbancji odnotowano dla osocza krwi ludzkiej, w którym absorbancja wzrastała do wartości około 0,42 i osiągała mniej więcej stały poziom przy objętościach powyżej 10 μL .



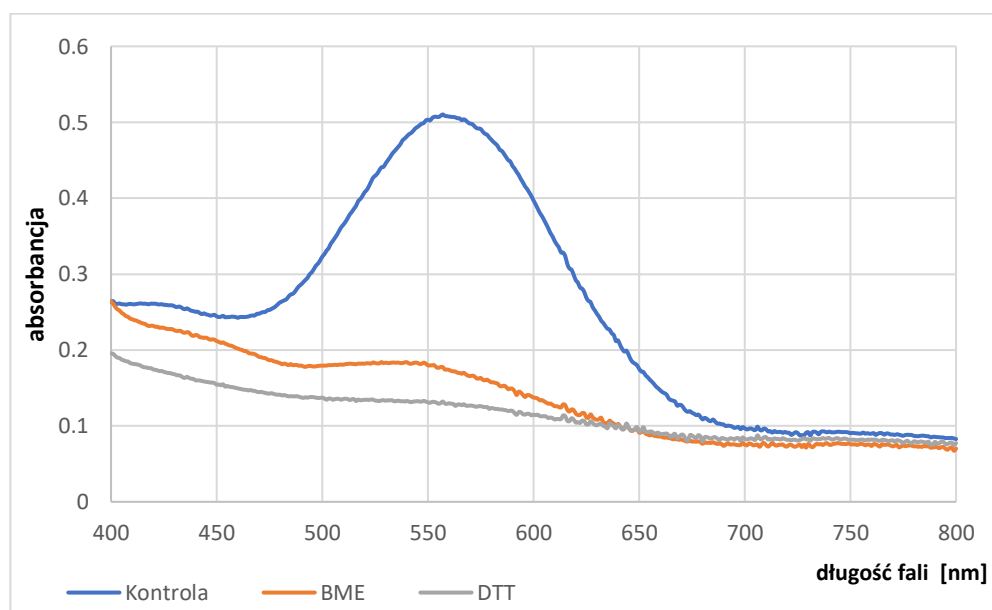
Wykres 13. Zależność intensywności barwy fioletowego produktu od ilości dodanego roztworu białka [badania własne, publikacja 3].

8.8 Charakterystyka fioletowego produktu

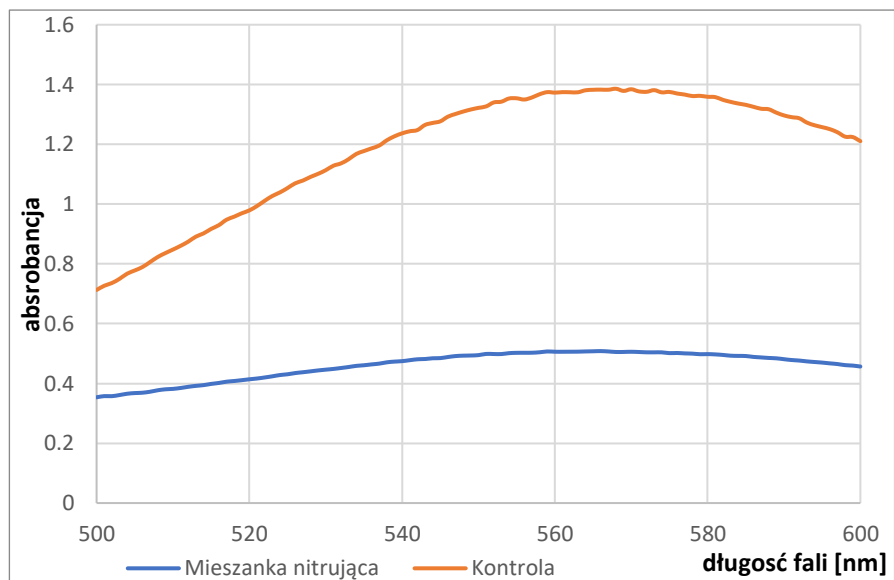
Widmo absorpcji fioletowego produktu reakcji BSA z rodnikiem ABTS[•] nie zmieniało się w obecności 2,5% SDS. Produkt utworzony przez 10 mg/mL BSA w PBS został dodany do 5 mM BME lub DTT. Czas reakcji: 1 godzina. Zauważono natomiast wyraźne zmniejszenie intensywności absorpcji po dodaniu czynników redukujących, takich jak BME i DTT (Rysunek 13).

Widma absorpcji próbek kontrolnych wykazywały wyższe wartości absorpcji w zakresie 500-600 nm w porównaniu do próbek traktowanych mieszaniną nitrującą. Wartości te były wyraźnie niższe w próbkach po zastosowaniu mieszaniny, co sugeruje wpływ tego zabiegu na widmo absorpcyjne (wykres 14).

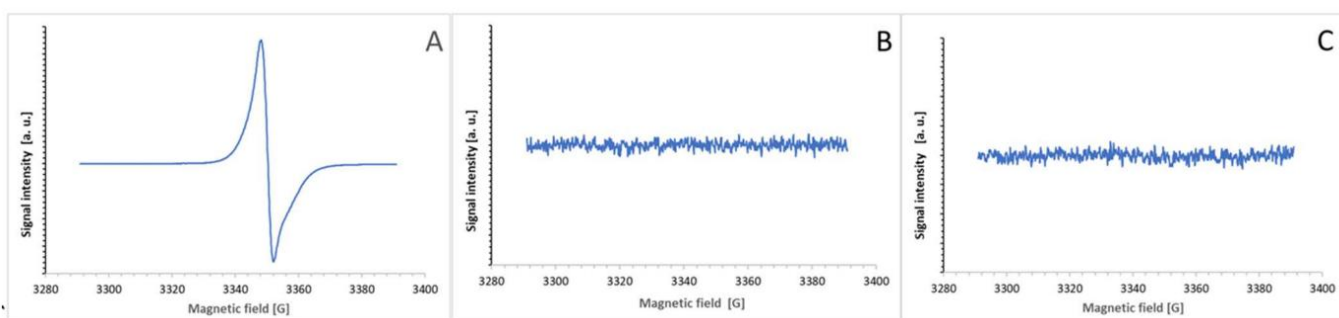
W spektroskopii EPR zaobserwowano że widma EPR produktów reakcji ABTS[•] z roztworem BSA oraz tyrozyną nie wykazywały sygnału wolnorodnikowego, w przeciwieństwie do widma samego ABTS[•], które charakteryzowało się wyraźnym sygnałem (Rysunek 4A). Produkty reakcji BSA (Rysunek 4B) i tyrozyny (Rysunek 4C) nie generowały sygnału w widmie EPR



Wykres 14. Wpływ reduktorów na widmo absorpcji fioletowego produktu reakcji BSA z ABTS[•] [badania własne, publikacja 3].



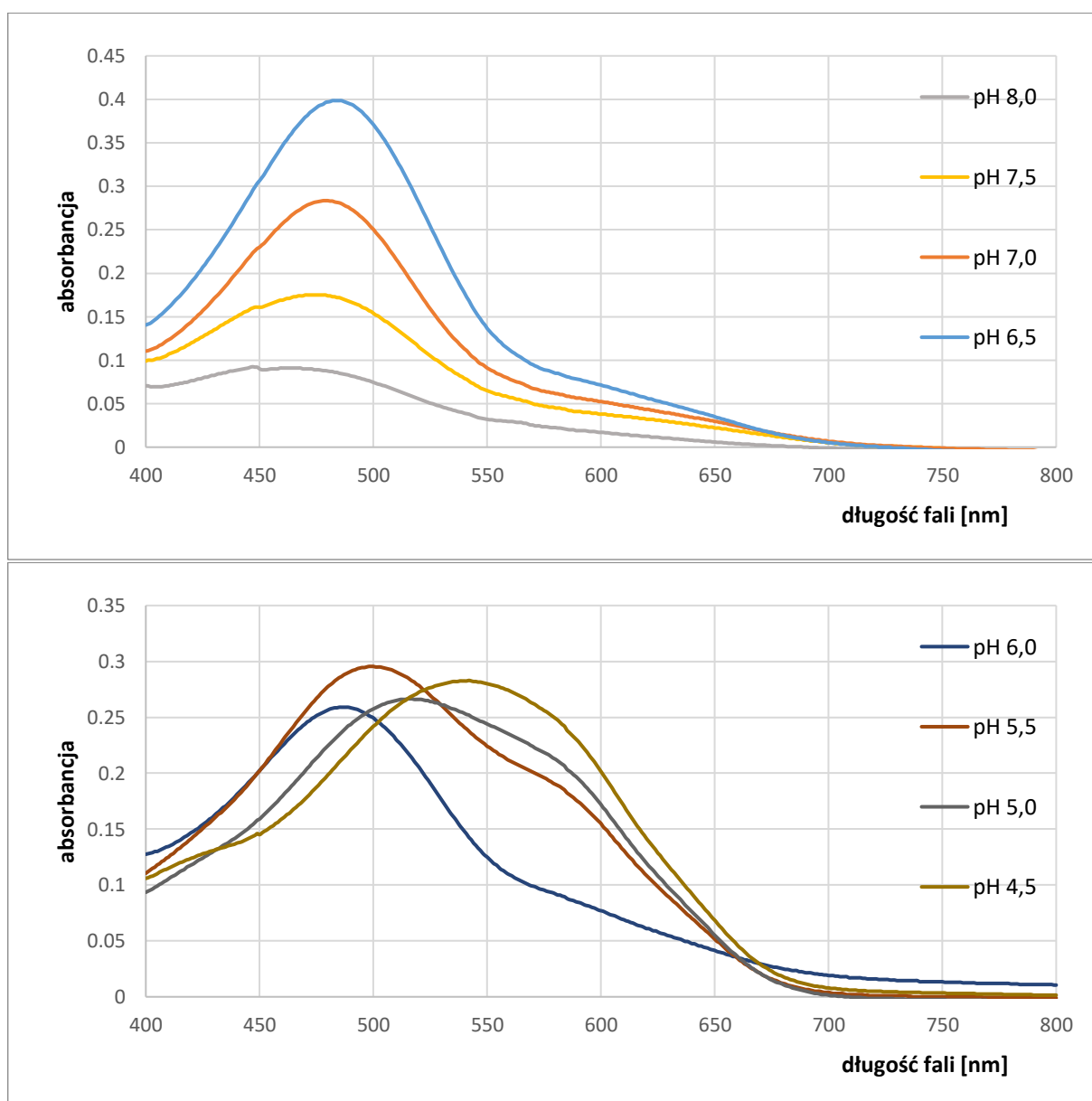
Wykres 15. Wpływ nitrowania na roztwór BSA na wydajność reakcji powstawania fioletowego produktu [badania własne, publikacja 3].



Rysunek 4. Widma EPR rodnika $ABTS^{\bullet}$ ($100 \mu M$, (A)) oraz produktów jego reakcji z BSA (20 mg/mL w PBS, (B)) i tyrozyną ($0,4 \text{ mg/mL}$ w PBS, (C)). Produkty reakcji zostały zmierzone po całkowitym odbarwieniu $ABTS^{\bullet}$ [badania własne, publikacja 3].

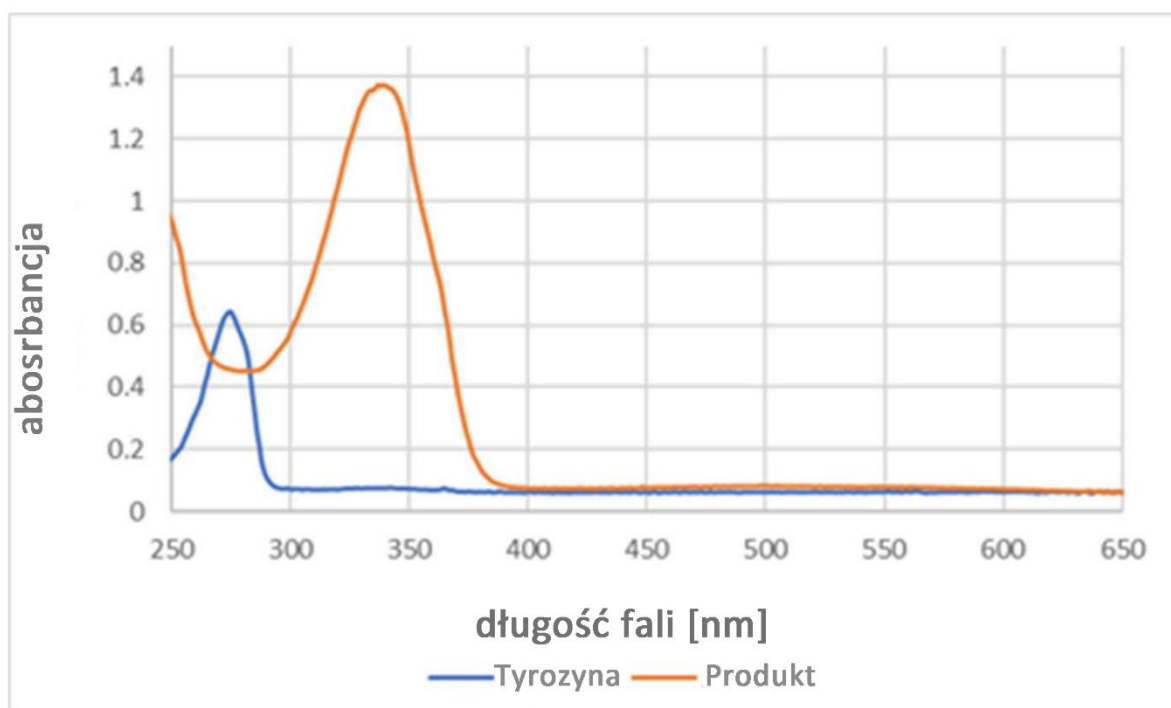
8.9 Charakterystyka tyrozyny

Wydajność reakcji oraz, w mniejszym stopniu, widma fioletowego produktu powstającego w reakcji tyrozyny z ABTS[•] były zależne od pH. Optymalne pH dla tej reakcji wynosiło 6,5, a wydajność produktu zmniejszała się wraz ze spadkiem pH poniżej tej wartości oraz przy jego wzroście powyżej 6,5. Obniżenie pH powodowało batochromowe przesunięcie widma, z maksimum absorpcji przesuwanym się z 447 nm przy pH 8,0 do 545 nm przy pH 4,0 (Wykres 16).

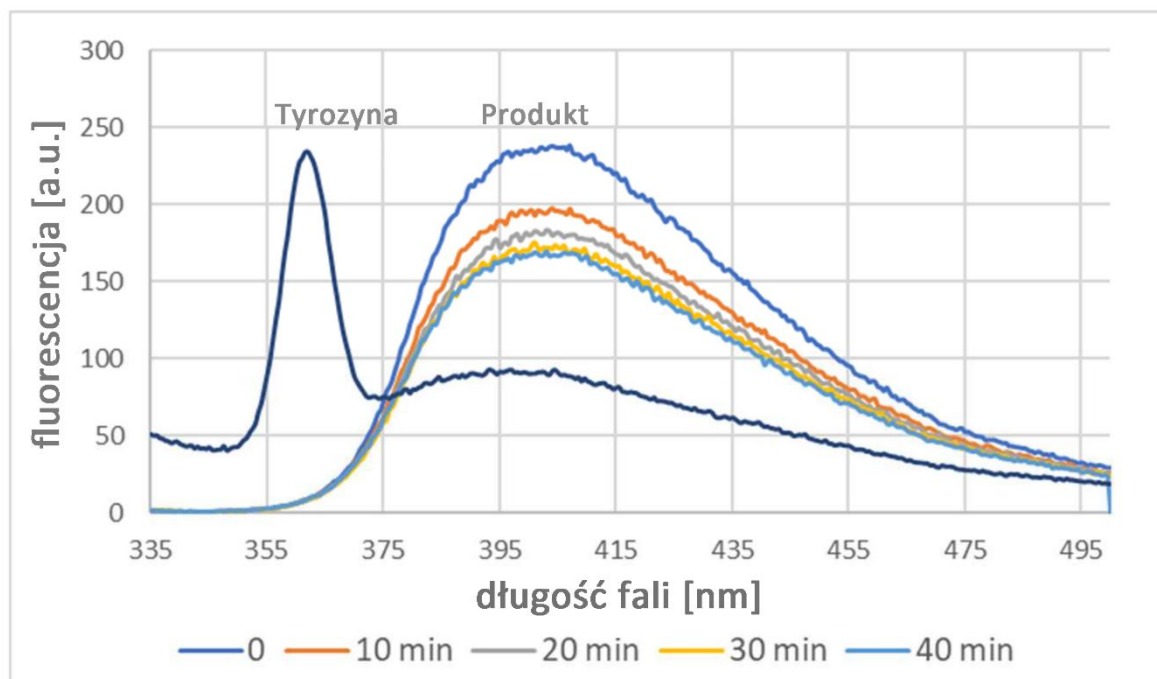


Wykres 16. Wpływ pH na powstawanie barwnego produktu w reakcji tyrozyny (2 mM) z ABTS[•] (2,5 mM) w 50 mM buforach octanowo-fosforanowych o różnych poziomach pH. Czas reakcji: 24 godziny [badania własne, publikacja 3].

Na (Wykresie 17) porównano widma absorbcyj tyrozyny oraz produktu jej reakcji z rodnikiem ABTS[•]. Tyrozyna wykazuje maksimum absorbcyj przy około 275 nm, W widmie produktu obserwuje się zanik tego pasma oraz pojawienie się nowego maksimum przy około 340 nm, typowego dla struktury ABTS po reakcji. Z kolei (Wykresie 18) przedstawia emisyjne tyrozyny (1 mM) oraz produktu reakcji tyrozyny z ABTS[•] po różnych czasach inkubacji (0-40 minut). Dla samej tyrozyny obserwowano wyraźny pik emisji przy długości fali ok. 360-370 nm. W miarę upływu czasu inkubacji po dodaniu kationorodnika ABTS[•] (1,63 mM), widoczne było stopniowe zwiększanie się intensywności emisji w zakresie 390-450 nm. Maksimum emisji tego produktu mieściło się w okolicach 405-415 nm i było wyraźnie oddzielone od sygnału pochodzącego od wolnej tyrozyny. Intensywność emisji rosła do 20-30 min inkubacji, a następnie osiągała plateau, co sugeruje nasycenie reakcji.



Wykres 17. Widma UV-vis tyrozyny (177 μM) i produkt jej reakcji z rodnikiem ABTS[•] (147 μM) [badania własne, publikacja 3].



Wykres 18. Widma emisji fluorescencji tyrozyny (1 mM) oraz produktu reakcji pomiędzy tyroziną (1 mM) a rodnikiem ABTS[•] (1,63 mM) w różnych punktach czasowych od dodaniu ABTS[•] [badania własne, publikacja 3].

9. Dyskusja Wyników

W przeprowadzonych badaniach skupiono się na analizie właściwości antyoksydacyjnych wybranych naparów roślinnych i przypraw oraz na ocenie wpływu procesów denaturacji i trawienia na aktywność antyoksydacyjną białek. Wyniki uzyskane w obu częściach pracy pozwalają na wyciągnięcie wniosków dotyczących wpływu tych czynników na ocenę aktywności antyoksydacyjnej żywności oraz wiarygodność stosowanych metod oznaczania, co zostało omówione w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy.

W trakcie analizy aktywności antyoksydacyjnej naparów roślinnych zawierających związki polifenolowe zaobserwowano zjawiska, które mogą sugerować interferencję pomiędzy tymi związkami a reagentami wykorzystywanymi w testach analitycznych. Wyniki wykazały, że polifenole obecne w badanych ekstraktach mogą pełnić zarówno funkcję donorów elektronów, jak i generatorów reaktywnych form tlenu, w tym H_2O_2 , co w istotny sposób może zaburzać interpretację oznaczanej TAC. Zaobserwowano wysokie współczynniki korelacji między zawartością polifenoli a wynikami TAC oznaczanej różnymi metodami oraz między wynikami uzyskanymi poszczególnymi testami (Tabela 3). Najwyższe wartości współczynników korelacji uzyskano pomiędzy zawartością polifenoli a TAC oznaczaną metodą odbarwienia ABTS* ($r = 0,94$) oraz metodą CUPRAC ($r = 0,93$). Najsilniejsza korelacja pomiędzy wynikami różnych metod oznaczania TAC dotyczyła metod FRAP i CUPRAC ($r = 0,95$), co jest zrozumiałe, ponieważ obie te metody opierają się na tym samym mechanizmie - redukcji jonów metali (odpowiednio Fe^{3+} i Cu^{2+}).

Tabela 3. Współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy badanymi parametrami [badania własne, publikacja 1].

Parametr	Zawartość polifenoli [µg GAE/mL]	TAC-ABTS* [µmol TE/mL]	TAC-FRAP [µmol TE/mL]	TAC-CUPRAC [µmol TE/mL]	TAC-DPPH* [µmol TE/mL]	H ₂ O ₂ czas „0h” [µM]
TAC-ABTS*	0,94 ***					
TAC-FRAP	0,90 ***	0,83 ***				
TAC-CUPRAC	0,93 ***	0,88 ***	0,95 ***			
TAC-DPPH*	0,78 ***	0,74 ***	0,63 **	0,68 ***		
H ₂ O ₂ czas „0h”	0,25	0,40	0,13	0,21	0,31	
H ₂ O ₂ po 1 h	-0,37	-0,37	-0,31	-0,30	-0,40	0,48 *
Delta H ₂ O ₂	-0,61 **	0,73 ***	0,45 *	0,49 *	0,69 ***	0,16

Podobne zależności pomiędzy całkowitą zawartością polifenoli a TAC były wcześniej raportowane w literaturze, choć w niektórych przypadkach współczynniki korelacji były niższe niż 0,8-0,99, co sugeruje udział innych klas związków w aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów. Na przykład w badaniach przeprowadzonych przez Kim i wsp., (2011) na 50 produktach spożywczych, wartości współczynnika korelacji Spearmana pomiędzy całkowitą zawartością polifenoli a TAC oznaczaną metodami redukcji ABTS*, redukcji DPPH* i ORAC wynosiły odpowiednio $r = 0,946$, $r = 0,897$ i $r = 0,547$. Korelacje między zawartością flawonoidów a TAC były niższe: $r = 0,718$ (ABTS*), $r = 0,708$ (DPPH*) i $r = 0,653$ (ORAC) [17]. Również w badaniach Alañón i wsp. (2011) dotyczących drewna dębowego używanego w procesie starzenia win, wykazano silną zależność pomiędzy zawartością poszczególnych polifenoli a aktywnością antyoksydacyjną. Współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy zawartością kwasu galusowego a TAC oznaczaną metodą redukcji DPPH* osiągały wartości $r = 0,97$, dla metody redukcji ABTS* $r = 0,95$ oraz dla FRAP $r = 0,96$ [60]. Dane te potwierdzają, że polifenole są głównymi przeciwutleniaczami w ekstraktach roślinnych, trudno jednak oczekiwać wyższych korelacji, ponieważ rośliny zawierają także inne związki przeciwutleniające np. witamina E, karotenoidy.

W przypadku aminokwasów, oznaczając ich aktywność antyoksydacyjną, uzyskano współczynniki korelacji Pearsona między wynikami poszczególnych testów. Zakładając, że brak reakcji oznacza wartość zerową, wartości te wynosiły odpowiednio: ABTS*/FRAP - $r = 0,57$ ($p = 0,24$); ABTS*/ CUPRAC - $r = 0,71$ ($p = 0,11$); oraz FRAP/CUPRAC - $r = 0,80$ ($p = 0,058$). Choć współczynniki te nie były statystycznie istotne, najwyższa korelacja została odnotowana pomiędzy wynikami metod FRAP i CUPRAC, co jest zgodne z wcześniej obserwowaną zależnością w przypadku ekstraktów roślinnych i wynika z podobnego mechanizmu reakcji redoks. Należy jednak zaznaczyć, że brak istotności statystycznej może wynikać z faktu, że niektóre aminokwasy nie wykazywały aktywności w niektórych testach, co prowadziło do obecności wartości zerowych i ograniczonej zmienności danych. Niemniej jednak, wyniki te podkreślają że tylko niektóre aminokwasy wykazują aktywność przeciwutleniającą, a tym samym decydują o aktywności przeciwutleniającej całych cząsteczek białek. Największa liczba reaktywnych aminokwasów (tyrozyna, tryptofan, cysteina, histydyna, arginina oraz cystyna) wykazała aktywność w teście odbarwiania ABTS*, a cysteina, tyrozyna i tryptofan były również reaktywne w testach CUPRAC i FRAP.

Ponadto warto zauważyć, że ocena aktywności przeciwutleniającej poszczególnych aminokwasów sugeruje, że skład aminokwasowy białek roślinnych może również w istotnym stopniu przyczyniać się do TAC ekstraktów roślinnych. Nie można zatem pominąć potencjalnego udziału białek ich składu aminokwasowego w kształtowaniu właściwości antyoksydacyjnych, zwłaszcza w przypadku roślin strączkowych bogatych w białko, takich jak soczewica, soja, ciecierzycza i łubin, które dostarczają znacznych ilości aminokwasów o udokumentowanym potencjale antyoksydacyjnym [61]. Jednakże, zgodnie z wynikami Xu i Chang (2007), istnieje silna dodatnia korelacja pomiędzy całkowitą zawartością związków fenolowych a TAC ekstraktów z nasion roślin strączkowych. Oznacza to, że tak jak w przypadku herbat, kaw, ziół i przypraw polifenole stanowią główną grupę związków odpowiedzialnych za ich TAC [62].

Różnice w reaktywności pomiędzy testami oceny aktywności przeciwutleniającej wynikają zarówno z różnych mechanizmów reakcji chemicznych zachodzących pomiędzy reagentami, jak i z odmiennego pH stosowanego w poszczególnych testach (pH 3,6 FRAP, 7,0 CUPRAC i 7,4 ABTS*,). Mechanizmy te mogą obejmować zarówno bezpośrednią neutralizację rodników (ABTS*• DPPH*), jak i redukcję jonów metali (Fe^{3+} we FRAP oraz Cu^{2+} w CUPRAC).

Warto zaznaczyć, że mechanizmy te istotnie wpływają na selektywność testów w oznaczaniu aktywności przeciwutleniającej aminokwasów szczególnie tych zawierających grupy funkcyjne zdolne do oddawania elektronów np. tiolowe i fenolowe, które wykazują najwyższą reaktywność w warunkach pH zbliżonych do fizjologicznych [63, 64]. Aktywność antyoksydacyjna związków fenolowych, zwłaszcza polifenoli, jest silnie determinowana przez ich strukturę chemiczną oraz warunki środowiskowe. Polifenole charakteryzują się wysoką zdolnością do neutralizacji wolnych rodników dzięki obecności licznych grup hydroksylowych (OH) umieszczonych na pierścieniach aromatycznych. Jak wskazano w literaturze, poziom pH znacząco wpływa na właściwości antyoksydacyjne tych związków - wyższe wartości pH prowadzą do znacznego zwiększenia obserwowanej aktywności antyoksydacyjnej. Co istotne, wrażliwość polifenoli na zmiany pH może być większa niż na liczbę oraz położenie podstawników hydroksylowych w ich cząsteczkach [65,66].

Choć większość polifenoli ma charakter hydrofilowy, niektóre z nich (metoksyloowane flawonoidy oraz ich estryfikowane pochodne) wykazują właściwości lipofilowe. Może to prowadzić do ich niedoszacowania w testach opartych na rozpuszczalnikach polarnych, takich jak test redukcji DPPH*, który wykonywany jest zazwyczaj w metanolu. Rodnik DPPH* reaguje głównie z donorami atomów wodoru, takimi jak grupy fenolowe czy tiolowe, a jego selektywność ogranicza wykrywanie aktywności przeciwutleniającej związków o mniejszej rozpuszczalności w środowisku polarnym. W efekcie TAC oznaczona metodą DPPH nie zawsze koreluje z wynikami uzyskiwanymi przy użyciu bardziej uniwersalnych testów, takich jak ABTS* czy CUPRAC [42,66,67]. Potwierdzają to również uzyskane w niniejszym badaniu niższe współczynniki korelacji pomiędzy zawartością polifenoli a TAC oznaczaną metodą DPPH* ($r = 0,78$), jak również korelacje pomiędzy wynikami testu DPPH* a innymi testami TAC ($r = 0,63-0,78$) dla analizowanych surowców roślinnych (Tabela 3).

W niektórych przypadkach aktywność przeciwutleniająca oznaczana metodami oceny TAC przekraczała wartość 1 w przeliczeniu na Troloks (TEAC > 1), co zaobserwowano zarówno dla wybranych aminokwasów (Wykres 6), jak i ekstraktów roślinnych (Wykres 2,3,4,5). Wynika to z faktu, że przykładowo w reakcji z rodnikiem ABTS* cząsteczka Troloksu redukuje dwie cząsteczki ABTS* w dwóch etapach jednoelektronowych, prowadząc ostatecznie do stabilnej formy utlenionej. W metodach oceny TAC, z wykorzystaniem Troloksu jako wzorca przyjmuje się, że taka aktywność odpowiada jednostce wzorcowej (TEAC = 1) [68,69].

W przypadku aminokwasów i polifenoli reakcje te mogą być bardziej złożone. Zarówno cząsteczki macierzyste jak i produkty powstające w wyniku jej utleniania mogą dalej reagować z ABTS[•] lub jonami Cu²⁺, ale również, choć w mniejszym stopniu, z DPPH[•] szczególnie w przypadku związków o niskim pK_a, jak flawonoidy, działających przez mechanizm SPLET w środowisku polarnym (np. metanol). Wszystko to przyczynia się do zwiększenia całkowitej stechiometrii reakcji względem Troloksu, w efekcie czego całkowita ilość zneutralizowanych rodników może przekraczać tę przyjętą dla Troloksu. Taki efekt był szczególnie widoczny w przypadku ABTS[•], gdzie rodnik ten może brać udział w reakcjach addycji lub degradacji, dodatkowo zwiększając mierzoną aktywność antyoksydacyjną [67,69].

Wśród badanych aminokwasów ciekawy przypadek stanowiła cystyna, która wykazała pewną aktywność w teście odbarwiania rodnika ABTS[•] oraz śladową aktywność w metodzie FRAP. Wynik ten można przypisać rozszczepieniu mostków dwusiarczkowych (-S-S-) i utlenianiu siarki do form sulfinowych lub sulfonowych pod wpływem obecności rodnika ABTS[•] lub jonów Fe³⁺. Proces ten wskazuje, że również utlenianie reszt cystynowych może częściowo przyczyniać się do całkowitej aktywności przeciwutleniającej białek, zwłaszcza w testach wykorzystujących silne utleniacze [70,71].

Badania kontynuowano, koncentrując się na ocenie wpływu denaturacji SDS oraz trawienia enzymatycznego (hydrolizy proteolitycznej) na właściwości antyoksydacyjne wybranych białek. Uzyskane wyniki potwierdzają, że zarówno struktura przestrzenna białek, jak i ich rozpad do mniejszych peptydów oraz wolnych aminokwasów mają istotne znaczenie dla ich zdolności do neutralizacji wolnych rodników oraz redukcji jonów metali.

Wyniki testów wykazały, że znaczącą aktywność przeciwutleniającą wykazują jedynie wybrane reszty aminokwasowe - przede wszystkim cysteina, tyrozyna, tryptofan, histydyna, arginina oraz cystyna (Wykres 6). Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, według których grupy tiolowe cysteiny są głównymi strukturami odpowiedzialnymi za aktywność antyoksydacyjną białek [36,72]. Nasze dane wskazują jednak, że reszty tyrozyny i tryptofanu - a w mniejszym stopniu także histydyny, argininy oraz cystyny - również znacząco przyczyniają się do tej aktywności, szczególnie w teście odbarwiania rodnika ABTS[•]. Sugeruje to, że potencjał antyoksydacyjny białek może wynikać z bardziej złożonego układu reszt aminokwasowych niż wcześniej zakładano. Reszty te mogą jednak pozostawać ukryte wewnątrz natywnej struktury białek, przez co nie są dostępne dla reagentów analitycznych.

Proces denaturacji, np. poprzez działanie temperatury, niskiego pH lub detergentów takich jak SDS, prowadzi do rozwinięcia struktury trzeciorzędowej i odsłonięcia reaktywnych grup funkcyjnych [73,74,75]. Aktywność przeciwutleniająca BSA zmierzona metodzie redukcji ABTS[•] wynosiła ok. 170-180 $\mu\text{mol/g}$ (Tabela 2). Na podstawie zawartości reaktywnych aminokwasów w BSA i ich znanej aktywności, teoretyczna wartość powinna wynosić ok. 780 $\mu\text{mol/g}$ (172 μmol argininy, 193 μmol histydyny, 29 μmol tryptofanu, 127 μmol tyrozyny, 15 μmol cysteiny i 250 μmol cystyny na 1 g BSA, z czego około 60% cysteiny występuje w stanie zredukowanym) [73,76,77]. Oznacza to, że tylko część aminokwasów rzeczywiście reaguje z rodnikami ABTS[•] w natywnej strukturze białka. Co również sugeruje wzrost wartości do ok. 200-250 $\mu\text{mol/g}$ po trawieniu papainą i trypsyną i denaturacją SDS w metodzie ABTS[•].

Zbliżony efekt, choć słabszy, zaobserwowano w teście FRAP. Całkowita aktywność przeciwutleniająca BSA oszacowana dla testu FRAP (ok. 66 $\mu\text{mol/g}$) była wyższa niż wartość zmierzona (ok. 35 $\mu\text{mol/g}$ - po modyfikacjach ok. 41 $\mu\text{mol/g}$). Różnica więc była mniejsza niż w teście ABTS[•]. Może to wynikać z niskiego pH testu FRAP, które powoduje częściową denaturację BSA, zwiększając dostępność reaktywnych reszt aminokwasowych dla jonów Fe^{3+} . Denaturacja wielu białek w teście FRAP może tłumaczyć mniejszą skuteczność zastosowanych procedur w porównaniu z testem odbarwiania ABTS[•] [74].

Zaobserwowano także, że skuteczność hydroliza zależy od rodzaju enzymu - papaina, o szerszym spektrum działania niż trypsyna, prowadziła do większego wzrostu TAC. Efekt ten wynika z mniejszej specyficzności substratowej papainy, umożliwiającej hydrolizę większej liczby wiązań peptydowych - umożliwia większą ekspozycję frakcje zawierające sekwencje bogate w tyrozinę, tryptofan, cysteinę i histydynę [76,77,78].

Warto podkreślić, że efekty hydrolizy białek nie zawsze są jednoznacznie korzystne. Choć enzymatyczny rozkład może zwiększać aktywność przeciwutleniającą, np. poprzez odsłonięcie reaktywnych reszt aminokwasowych, zbyt długotrwała hydroliza może prowadzić do powstawania mniej aktywnych fragmentów lub zmian konformacyjnych, które ponownie je ukrywają. Dodatkowo niekorzystne warunki, takie jak bardzo niskie pH (np. w żołądku) czy wysoka temperatura, mogą powodować agregację białek i obniżać ich rozpuszczalność, co ogranicza dostępność reszt biorące udział w reakcjach redoks [79]. Potwierdzają to wyniki badań nad białkami jaja kurzego, w których oceniano wpływ denaturacji SDS oraz trawienia enzymatycznego - aktywność antyoksydacyjna wzrastała po proteolizie papainą i trypsyną,

lecz jak podaje Rao i wsp. (2020) - nie po obróbce cieplnej. Zaznacza jednocześnie, że efekt ten zależy od warunków, takich jak pH i temperatura, a obróbka cieplna może niekiedy zwiększać aktywność antyoksydacyjną [80]. W kontekście uzyskanych wyników dotyczących białek, których aktywność przeciwutleniająca wzrastała po denaturacji i trawieniu enzymatycznym, interesujące jest zestawienie ich z zachowaniem związków fenolowych. Choć nie były one bezpośrednim przedmiotem niniejszych badań, literatura wskazuje, że ich aktywność antyoksydacyjna często spada w trakcie trawienia. Polifenole, mogą ulegać modyfikacjom strukturalnym w przewodzie pokarmowym, co obniża ich zdolność do neutralizacji wolnych rodników [39,40,41].

Po omówieniu czynników wpływających na wzrost aktywności antyoksydacyjnej badanych związków, istotne jest również uwzględnienie zjawisk, które mogą tę aktywność pozornie modyfikować lub maskować. W tym kontekście istotna może być zdolność polifenoli do autooksydacji, podczas której dochodzi do redukcji tlenu cząsteczkowego i powstawania H_2O_2 , co potwierdzono we wcześniejszych badaniach [81,82,83]. Jednak nasze wyniki wykazały, że ekstrakty o wysokiej zawartości fenoli, takie jak napary z herbat (zielonej, białej, czarnej), wykazywały zarówno wysokie, jak i spadające stężenia H_2O_2 w czasie inkubacji (Wykres 8). Wskazuje to, że fenole mogą odgrywać dwojaką rolę - zarówno prooksydacyjną (generacja H_2O_2), jak i antyoksydacyjną (reakcja z H_2O_2 i jego neutralizacja). Potwierdza to również stwierdzona ujemna korelacja między zawartością fenoli a różnicą stężenia H_2O_2 pomiędzy czasem zerowym a po jednej godzinie inkubacji ($r = -0,61$), co sugeruje, że w wielu przypadkach związki fenolowe mogą efektywnie usuwać powstały H_2O_2 . Zjawisko to było szczególnie wyraźne w przypadku niektórych naparów herbacianych, m.in. czarnej i czerwonej (Tabela 3).

Aby lepiej zrozumieć to zjawisko, przeprowadzono badania nad wytwarzaniem i eliminacją H_2O_2 przez trzy wybrane polifenole: pirogallol, kwas galusowy oraz kwercetyna. Związki te wybrano na podstawie ich udokumentowanej obecności przynajmniej w części analizowanych ekstraktów, takich jak kawa i herbata [21,22,23]. Badania wykazały, że wszystkie trzy polifenole są zdolne do generowania nadtlenu wodoru, jednak ilość powstającego H_2O_2 nie była proporcjonalna ani do stężenia, ani do czasu inkubacji. Szczególnie interesujące było to, że pirogallol generował największe ilości H_2O_2 przy najniższym stężeniu (0,5 mM), podczas gdy wyższe stężenia prowadziły do zmniejszenia tego efektu. Równocześnie

zarówno pirogalol, jak i kwas galusowy oraz kwercetyna wykazały zdolność do reagowania z egzogennym nadtlakiem wodoru, co potwierdza ich potencjał jako zmiataaczy H_2O_2 .

Literatura wskazuje, że niektóre aminokwasy zwłaszcza aromatyczne oraz zawierające siarkę mogą ulegać oksydacyjnym przemianom prowadzącym do powstawania H_2O_2 , szczególnie w obecności tlenu cząsteczkowego i śladowych ilości metali przejściowych [84]. Ponadto enzymy takie jak oksydaza D-aminokwasowa mogą bezpośrednio katalizować tworzenie H_2O_2 , choć ich aktywność w warunkach przewodu pokarmowego człowieka jest ograniczona [85]. Zjawisko generowania H_2O_2 przez produkty białkowe zostało również potwierdzone w badaniach Boatrighta i wsp. (2013), którzy wykazali, że po uwodnieniu zarówno czyste białka w proszku, jak i komercyjne mieszanki białkowe (np. z dodatkiem witaminy C) mogą generować H_2O_2 . Autorzy sugerują, że źródłem H_2O_2 są reakcje redoks z udziałem tlenu, białek i związków redukujących, takich jak witamina C [49]. Wyniki te podkreślają potencjalną rolę białek jako uczestników reakcji generujących RFT, szczególnie w obecności innych składników żywności.

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi białka i aminokwasy obecne w żywności mogą generować H_2O_2 , jednak nasze badania wykazały, że w reakcji z $ABTS^{\bullet}$ może dochodzić również do powstawania trwałego, fioletowego produktu. Początkowo efekt ten zaobserwowano jako wynik ogólnej reaktywności białek, jednak dalsze analizy z udziałem wolnych aminokwasów wykazały, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa tyrozyna. Zarówno wolna tyrozyna, jak i tyrozyna związana w strukturze białek może zatem nie tylko redukować $ABTS^{\bullet}$, ale również tworzyć trwałe produkty adduktowe, co rozszerza dotychczasowe rozumienie mechanizmu reakcji wykorzystywanej w testach oznaczania aktywności przeciwutleniającej.

Podstawą do wniosku, że to właśnie reszty tyrozyny obecnych w białkach reagują z rodnikiem $ABTS^{\bullet}$ tworząc barwny produkt są następujące obserwacje: powstały produkt w reakcji TYR- $ABTS^{\bullet}$ charakteryzuje się zbliżonym widmem do tego z jakie tworzy BSA po reakcji z rodnikiem $ABTS^{\bullet}$ (Wykres 11) czego nie zaobserwowaliśmy, przy innych testowane aminokwasy. Drugim argumentem odpowiadającym za powyższym stwierdzeniem jest to że w przypadku nitrowania BSA, które dotyczy głównie reszt tyrozynowych [86] osłabia powstawanie fioletowego produktu (Wykres 15). Dodatkowo, obserwowano współstrącanie się barwnego produktu z BSA, co również sugeruje jego kowalencyjne związanie z białkiem. Tak więc najbardziej prawdopodobnym mechanizmem prowadzącym do powstania tego

produktu jest tworzenie trwałego adduktu pomiędzy rodnikiem ABTS[•] a resztą tyrozynową obecnego w roztworze białka.

Zaobserwowany charakteryzował się wysoką stabilnością, utrzymującą się od kilku godzin do kilku dni. Maksimum absorpcji fioletowego produktu powstałego w reakcji ABTS[•] z tyrozyną znajdowało się w okolicach 550 nm. Dodatkowo zauważalne jest batochromowe przesunięcie pasma absorpcji. Im wyższe pH, tym bardziej przesuwają się one w stronę dłuższych fal, co sugeruje, że zmienia się także struktura chemiczna produktu.

Różnice w widmie absorpcyjnym pomiędzy produktem reakcji wolnej tyrozyny a BSA z ABTS[•] wynikają najprawdopodobniej z oddziaływań tyrozyny z sąsiadującymi resztami aminokwasowymi w strukturze białka. Środowisko białkowe wpływa na właściwości chemiczne i spektroskopowe reszt tyrozynowych, modyfikując ich zdolność do pochłaniania promieniowania. Zróżnicowanie widm absorpcyjnych może wynikać ze zmiennego mikrośrodowiska reszt tyrozynowych w strukturze białka. Jak pokazują dane literaturowe, wartości pK_a tyrozyny zależą od jej dostępności dla rozpuszczalnika, stopnia zanurzenia w strukturze białka oraz udziału w wiązaniach wodorowych. Wartości te mogą wahać się od $pK_a > 8$ (np. apoferrytyna ludzkiego surowicy) do $pK_a < 13$ (np. niektóre reszty tyrozynowe w białkach fotoreceptorowych). Tak szeroki zakres wartości pK_a wskazuje, że reszty tyrozynowe w różnych białkach mogą wykazywać zróżnicowaną reaktywność wobec rodnika ABTS[•], co może przekładać się zarówno na różnice w kinetyce tworzenia adduktów, jak i na widmowe właściwości powstałych produktów [87,88,89].

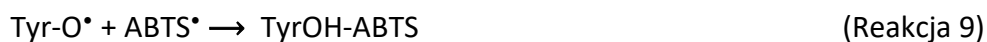
Brak sygnału EPR dla badanego produktu wskazuje, że nie ma on charakteru rodnikowego. Tym samym można wykluczyć, że obserwowana fioletowa barwa wynika z obecności birodnika ABTS, który wykazuje szerokie pasmo absorpcji z maksimum w okolicy 520 nm. Dodatkowo, jak przedstawiono na (Wykresie 18), widma UV-Vis produktu reakcji ujawniły zanik pasma absorpcji charakterystycznego dla tyrozyny przy około 280 nm oraz pojawienie się nowego pasma przy około 340 nm, typowego dla nierodnikowej formy ABTS, której maksimum absorpcji przypada na około 420 nm [90]. Obserwacja ta stanowi dodatkowe potwierdzenie nierodnikowego charakteru przyłączonego fragmentu ABTS. Ponadto, różnice w stężeniach reagentów oraz czasie inkubacji wpływają na stopień tworzenia adduktu. Pasma w zakresie światła widzialnego, odpowiadające za fioletową barwę produktu, staje się wyraźnie widoczne dopiero po zaistnieniu wystarczającego przesunięcia równowagi

reakcji w stronę tworzenia adduktu. Różnice pomiędzy widmami przedstawionymi na (Wykresie 11) maksimum absorpcji maksimum przy ok. 550 nm, natomiast w drugim (Wykresie 17) przesunięte jest w kierunku krótszych fal, do ok. 450 nm.

Powstawanie fioletowych produktów w reakcji z ABTS[•] zaobserwowano nie tylko w naszych badaniach. Również dane literaturowe wskazują na możliwość powstania adduktów tyrozyny z ABTS[•]. Przykładowo, Wang i wsp. (2020) opisali tworzenie fioletowego kompleksu w wyniku odwracalnego, kowalencyjnego przyłączenia ABTS[•] do reszty tyrozyny w lakkazie z *Sclerotinia sclerotiorum*, co prowadziło do zmiany widma UV-Vis i zwiększenia stabilności enzymu [91]. Podobną reakcję opisali Akerström i wsp. (2007), wykazując tworzenie fioletowego produktu w wyniku interakcji ABTS z lipokaliną α 1-mikroglobuliną. Produkt ten zawierał addukty ABTS z co najmniej dwiema resztami tyrozynowymi w cząsteczce białka [92]. Co wskazuje, że tworzenie fioletowych adduktów jest cechą ogólną białek. Większość białek zawiera reszty tyrozynowe [93], a zgodnie z naszymi obserwacjami białka są zdolne do redukcji rodnika ABTS[•] dzięki obecności reszt tyrozynowych, tryptofanowych, histydynowych, argininowych, cysteinowych oraz cystynowych. Jak podaje literatura reszty tyrozynowe należą do najbardziej podatnych na utlenienie aminokwasów, szczególnie w reakcjach jednoelektronowych, i mogą potencjalnie tworzyć rodniki tyrozyłowe (Reakcja 8). Gdy takie rodniki powstaną w białkach, mogą następnie tworzyć addukty z różnymi rodnikami [94].



Część rodników tyrozyłowych może wchodzić w alternatywne reakcje, prowadzące do tworzenia adduktów kowalencyjnych (Reakcja 9) oraz formowanie dityrozyny (Reakcja 10) [95]. Potwierdzenie powstawania dityrozyny uzyskano również w naszych badaniach (Wykres 17). Dodanie rodnika ABTS[•] do roztworu tyrozyny indukowało powstawanie dityrozyny, o czym świadczyła charakterystyczna fluorescencja produktu z maksimum emisji w zakresie około 400 nm przy wzbudzeniu przy 320 nm [58,59].



Do nie powstawania niespodziewanych adduktów z rodnikiem ABTS może również dochodzić z utleniania polifenoli, takich jak floroglucynol czy katechina. Jak wskazuje literatura podczas oceny aktywność antyoksydacyjną metodą ABTS nie tylko dochodzi do prostego zredukowania rodnika, ale również do powstawania trwałych produktów sprzęgania, które mogą mieć wpływ na interpretację wyników. Co więcej, formowanie takich adduktów może mieć znaczenie biologiczne, odzwierciedlając potencjalne interakcje oksydacyjnych metabolitów polifenoli z innymi cząsteczkami w warunkach stresu oksydacyjnego [93,96].

Opisywany w niniejszej pracy addukt tyrozyny z ABTS^{*} ma fioletową barwę, a jego powstawanie można łatwo monitorować spektrofotometrycznie. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że reakcja tyrozyny z ABTS^{*} nie ogranicza się wyłącznie do prostego aktu przekazania elektronu prowadzącego do redukcji rodnika, lecz obejmuje także powstawanie stabilnych produktów wtórnych, takich jak addukt ABTS–tyrozyna oraz dityrozyna. Zarówno fluorescencja tych produktów, jak i ich trwałość, sugerują, że są one integralną częścią mechanizmu reakcji, a ich obecność może znacząco wpływać na końcową efektywność redukcyjną układu. Tym samym, obserwowane zjawiska podkreślają złożoność pozornie prostej reakcji odbarwienia ABTS^{*} i wskazują na udział licznych reakcji rodnikowych prowadzących do trwałych modyfikacji tyrozyny.

Podsumowując, wyniki uzyskane zarówno w badaniach ekstraktów roślinnych, jak i roztworach białkowych potwierdzają złożoność reakcji odpowiedzialnych za aktywność antyoksydacyjną. Obie części pracy wzajemnie się uzupełniają, wskazując zarówno na praktyczne znaczenie metod oznaczeń TAC w produktach żywnościowych, jak i na ich ograniczenia wynikające z obecności komponentów białkowych lub fenolowych. Zidentyfikowane interferencje oraz produkty wtórne reakcji rodnikowych podkreślają konieczność krytycznego podejścia do interpretacji wyników i wyboru metod analitycznych dostosowanych do charakteru badanej matrycy.

10. WNIOSKI

1. Ekstrakty roślinne zawierające polifenole wykazują jednocześnie działanie antyoksydacyjne i prooksydacyjne — generują H_2O_2 w warunkach in vitro.
2. Niezbędne jest korzystanie z wielu metod oznaczania TAC oraz ich odpowiednia interpretacja, zwłaszcza przy analizie materiałów o złożonym składzie takich jak produkty żywnościowe - Różne metody oznaczania (ABTS, FRAP, CUPRAC, DPPH) różnią się selektywnością i wrażliwością - nie powinny być stosowane zamiennie bez kalibracji.
3. Procesy technologiczne żywności takie jak denaturacja oraz trawienie enzymatyczne białek (np. przez papainę, trypsynę) zwiększają ich aktywność antyoksydacyjną, dzięki ekspozycji reszt aminokwasowych (cysteina, tyrozyna, tryptofan).
4. W testach z rodnikiem ABTS• obserwuje się tworzenie trwałego fioletowego produktu w obecności białek, co może fałszować wynik oznaczeń TAC zwłaszcza w produktach i surowcach spożywczych o wysokiej zawartości białek.
5. Fioletowy produkt nie jest rodnikiem, co potwierdzono metodą spektroskopii EPR. Odróżnia go to od pierwotnego rodnika ABTS•.

11. BIBLIOGRAFIA

- [1] Bartosz, G. (2003). *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- [2] Sienkiewicz, I. (2017). Rodniki, utleniacze i przeciwutleniacze. In H. Staroszczyk & Z. Sikorski (Eds.), *Chemia żywności* (Vol. 2, pp. 35–36). Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- [3] Kubow, S. (1992). Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology and Medicine*, 12(1), 63–81.
- [4] Poljsak, B., Kovač, V., & Milisav, I. (2021). Antioxidants, food processing and health. *Antioxidants*, 10(3), 433.
- [5] Sadowska-Bartosz, I., Galiniak, S., & Bartosz, G. (2014). Reakcja Fentona. *Kosmos*, 63(3), 309–314.
- [6] Venkata, R. P., & Subramanyam, R. (2016). Evaluation of the deleterious health effects of consumption of repeatedly heated vegetable oil. *Toxicology Reports*, 3, 636–643.
- [7] Csapó, J., Prokisch, J., Albert, C., & Sipos, P. (2019). Effect of UV light on food quality and safety. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 12(1), 5–27.
- [8] Chemat, A., Song, M., Li, Y., & Fabiano-Tixier, A. S. (2023). Shade of innovative food processing techniques: Potential inducing factors of lipid oxidation. *Molecules*, 28(24), 8138.
- [9] Schweikert, C., Liskay, A., & Schopfer, P. (2002). Polysaccharide degradation by Fenton reaction- or peroxidase-generated hydroxyl radicals in isolated plant cell walls. *Phytochemistry*, 61(1), 31–35.
- [10] Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S., & Aruoma, O. I. (1995). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 35(1–2), 7–20.
- [11] Sadowska, A., Żebrowska-Krasuska, M., & Świdorski, F. (2012). Przeciwutleniacze w żywności. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, (2), 98–102.
- [12] Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113(3), 189–207.

- [13] Costa, M., Sezgin-Bayindir, Z., Losada-Barreiro, S., Paiva-Martins, F., Saso, L., & Bravo-Díaz, C. (2021). Polyphenols as antioxidants for extending food shelf-life and in the prevention of health diseases: Encapsulation and interfacial phenomena. *Biomedicines*, *9*(12), 1909.
- [14] Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Beecher, G., & Prior, R. L. (2004). Development of a database for total antioxidant capacity in foods: A preliminary study. *Journal of Food Composition and Analysis*, *17*(3–4), 407–422.
- [15] Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Locke, D. E., Tidwell, L. G., Brown, E. M., Bing-Hwa, J., Feng, Z., Wu, Y., Liao, Q., Kim, Y., Yuan, J., Zhang, Y., Nielsen, I. L. F., Guo, X., & Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, *9*, 3.
- [16] Pellegrini, N., Vitaglione, P., Granato, D., & Fogliano, V. (2020). Twenty-five years of total antioxidant capacity measurement of foods and biological fluids: Merits and limitations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(14), 5064–5078.
- [17] Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*, 1043–1048.
- [18] Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Song, W. O., Fernandez, M. L., Bruno, R. S., & Chun, O. K. (2010). Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *61*(6), 600–623.
- [19] Pompella, A., Sies, H., Wacker, R., Brouns, F., Grune, T., Biesalski, H. K., & Frank, J. (2014). The use of total antioxidant capacity as surrogate marker for food quality and its effect on health is to be discouraged. *Nutrition*, *30*(7–8), 791–793.
- [20] Prior, R. L., & Wu, X. (2013). Diet antioxidant capacity: Relationships to oxidative stress and health. *American Journal of Biomedical Sciences*, *5*(2).
- [21] Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., & Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: An online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, *2010*, bap024.

- [22] Rothwell, J. A., Urpi-Sarda, M., Boto-Ordoñez, M., Knox, C., Llorach, R., Eisner, R., Cruz, J., Neveu, V., Wishart, D., Manach, C., Andres-Lacueva, C., & Scalbert, A. (2012). Phenol-Explorer 2.0: A major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals. *Database*, 2012, bas031.
- [23] Rothwell J.A, Pérez-Jiménez J, Neveu V, Medina-Ramon A, M'Hiri N, Garcia Lobato P, Manach C, Knox K, Eisner R, Wishart D, & Scalbert A. (2013) Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*, 2013, bat070.
- [24] Kurpios-Piec, D., Grosicka-Maciąg, E., Czeczot, H., Szumilo, M., Grzela, T., & Rahden-Staron, I. (2010). Ochronny wpływ N-acetylocysteiny na prooksydacyjne i proapoptotyczne działanie tiuramu w komórkach V79 chomika chińskiego. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 43(3), 354–361.
- [25] Gałęcka, E., Jacewicz, R., Mrowicka, M., Florkowski, A., & Gałęcki, P. (2008). Antioxidative enzymes—structure, properties, functions. *Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 25(147), 266–268.
- [26] Tehrani, H. S., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 140, 5–12.
- [27] Pei, J., Pan, X., Wei, G., & Hua, Y. (2023). Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1147414.
- [28] Couto, N., Malys, N., Gaskell, S. J., & Barber, J. (2013). Partition and turnover of glutathione reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: A proteomic approach. *Journal of Proteome Research*, 12(6), 2885–2894.
- [29] Zhu, Z., Xu, Z., Li, Y., Fan, Y., Zhou, Y., Song, K., & Meng, L. (2024). Antioxidant function and application of plant-derived peptides. *Antioxidants*, 13(10), 1203.
- [30] Sgarbieri, V. (2017). Food proteins and bioactive peptides, functional diets. *Journal of Food Science & Nutrition*, 3, 023.

- [31] Nemat, M., Shahosseini, S. R., & Ariai, P. (2024). Review of fish protein hydrolysates: Production methods, antioxidant and antimicrobial activity and nanoencapsulation. *Food Science and Biotechnology*, *33*(8), 1789–1803.
- [32] Li, X. X., Han, L. J., & Chen, L. J. (2008). In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*(9), 1660–1666.
- [33] Liu, J. R., Chen, M. J., & Lin, C. W. (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(7), 2467–2473.
- [34] Manso, M. A., Miguel, M., Even, J., Hernández, R., Alexandre, A., & López-Fandiño, R. (2008). Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, *109*(2), 361–367.
- [35] Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2005). Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(19), 7600–7605.
- [36] Fadimu, G. J., Le, T. T., Gill, H., Farahnaky, A., Olatunde, O. O., & Truong, T. (2022). Enhancing the biological activities of food protein-derived peptides using non-thermal technologies: A review. *Foods*, *11*(13), 1823.
- [37] Corrochano, A. R., Sariçay, Y., Arranz, E., Kelly, P. M., Buckin, V., & Giblin, L. (2019). Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science*, *102*(1), 54–67.
- [38] Delgado, M. C. O., Galleano, M., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2015). Amaranth peptides from simulated gastrointestinal digestion: Antioxidant activity against reactive species. *Plant Foods for Human Nutrition*, *70*, 27–34.
- [39] Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—A non-systematic review. *Nutrients*, *12*(5), 1401.
- [40] Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, *113*(4), 859–870.

- [41] Kong, F., & Singh, R. P. (2010). A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach. *Journal of Food Science*, *75*(9), E627–E635.
- [42] Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2022). Evaluation of the antioxidant capacity of food products: Methods, applications and limitations. *Processes*, *10*(10), 2031.
- [43] Kut, K., Cieniek, B., Stefaniuk, I., Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2022). A modification of the ABTS• decolorization method and an insight into its mechanism. *Processes*, *10*(7), 1288.
- [44] Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2025). Hydrogen peroxide: A ubiquitous component of beverages and food. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(7), 3397.
- [45] Tama, A., Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2022). Is hydrogen peroxide generated in wine? *Food Bioscience*, *45*, 101487.
- [46] Rak, M., Mendys, D., Płatek, A., Sitarz, O., Stefaniuk, I., Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2025). Generation of hydrogen peroxide in beer and selected strong alcoholic beverages. *Processes*, *13*(1), 277.
- [47] Tama, A., Pieńkowska, N., Stefaniuk, I., Bartosz, G., Kapusta, I., & Sadowska-Bartosz, I. (2023). Is hydrogen peroxide generated in infusions of medicinal herbs? *Processes*, *11*(10), 2855.
- [48] Bartosz, G., Rajzer, K., Grzesik-Pietrasiewicz, M., & Sadowska-Bartosz, I. (2022). Hydrogen peroxide is formed upon cooking of vegetables. *Acta Biochimica Polonica*, *69*(2), 471–474.
- [49] Boatright, W. L. (2013). Hydrogen peroxide generation from hydrated protein drink mixes. *Journal of Food Science*, *78*(11), C1651–C1658.
- [50] Zavodnik, I. B., Lapshina, E. A., Zavodnik, L. B., Bartosz, G., Soszynski, M., & Bryszewska, M. (2001). Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity. *Free Radical Biology and Medicine*, *30*(4), 363–370.
- [51] Dodge, J. T., Mitchell, C., & Hanahan, D. J. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *100*(1), 119–130.

- [52] Fu, L., Xu, B. T., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xu, X. R., Xia, E. Q., & Li, H. B. (2011). Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(4), 2112–2124.
- [53] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9–10), 1231–1237.
- [54] Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Çelik, S. E., Baki, S., Yıldız, L., Karaman, Ş., & Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*, *3*(11), 2439–2453
- [55] Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70–76.
- [56] Gay, C. A., & Gebicki, J. M. (2003). Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric–xylenol orange method. *Analytical Biochemistry*, *315*(1), 29–35.
- [57] Krych, J., & Gebicka, L. (2013). Catalase is inhibited by flavonoids. *International Journal of Biological Macromolecules*, *58*, 148-153
- [58] Malencik, D. A., Sprouse, J. F., Swanson, C. A., & Anderson, S. R. (1996). Dityrosine: Preparation, isolation, and analysis. *Analytical Biochemistry*, *242*(2), 202–213.
- [59] Malencik, D. A., & Anderson, S. R. (2003). Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. *Amino Acids*, *25*, 233–247.
- [60] Alañón, M. E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Gordon, M. H., & Pérez-Coello, M. S. (2011). A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry*, *128*(4), 997–1002.
- [61] Poteraş, C. B., Culeţu, A., & Manolache, F. A. (2024). Nutritional importance of lentil, lupin, chickpea and soy legumes: A review. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, *81*(2),15-24.

- [62] Xu, B. J., & Chang, S. K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72(2), S159–S166.
- [63] Poimenova, I. A., Sozarukova, M. M., Ratova, D. M. V., Nikitina, V. N., Khabibullin, V. R., Mikheev, I. V., Proskurnina, E. V., & Proskurnin, M. A. (2024). Analytical methods for assessing thiol antioxidants in biological fluids: A review. *Molecules*, 29(18), 4433.
- [64] Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159.
- [65] Di Majo, D., La Neve, L., La Guardia, M., Casuccio, A., & Giammanco, M. (2011). The influence of two different pH levels on the antioxidant properties of flavonols, flavan-3-ols, phenolic acids and aldehyde compounds analysed in synthetic wine and in a phosphate buffer. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 265–269.
- [66] Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21(7), 901.
- [67] Gülçin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH radical scavenging assay. *Processes*, 11(8), 2248.
- [68] Yi, H., Cheng, Y., Zhang, Y., Xie, Q., & Yang, X. (2020). Potentiometric and UV-Vis spectrophotometric titrations for evaluation of the antioxidant capacity of chicoric acid. *RSC Advances*, 10(20), 11876–11882.
- [69] Ilyasov, I. R., Beloborodov, V. L., Selivanova, I. A., & Terekhov, R. P. (2020). ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1131.
- [70] Finley, J. W., Wheeler, E. L., Walker Jr, H. G., & Finlayson, A. J. (1982). Effect of cystine oxidation on lysinoalanine formation in proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(5), 818–820.
- [71] Karimi, M., Crossett, B., Cordwell, S. J., Pattison, D. I., & Davies, M. J. (2020). Characterization of disulfide (cystine) oxidation by HOCl in a model peptide: Evidence for

oxygen addition, disulfide bond cleavage and adduct formation with thiols. *Free Radical Biology and Medicine*, 154, 62–74.

[72] Ulrich, K., & Jakob, U. (2019). The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 14-27.

[73] Simpson, R. B., & Saroff, H. A. (1958). Decrease in sulfhydryl titer of serum albumin. *Journal of the American Chemical Society*, 80, 2129–2131.

[74] Michnik, A., Michalik, K., & Drzazga, Z. (2005). Stability of bovine serum albumin at different pH. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 80, 399–406.

[75] Robic, S., Linscott, K. B., Aseem, M., Humphreys, E. A., & McCartha, S. R. (2011). Bile acids as modulators of enzyme activity and stability. *Protein Journal*, 30, 539–545.

[76] Cui, J., Chong, B., Rutherford, S. M., Wilkinson, B., Singh, H., & Moughan, P. J. (2013). Gross and true ileal digestible amino acid contents of several animal body proteins and their hydrolysates. *Meat Science*, 94, 349–354.

[77] Siriwardana, K., Wang, A., Gadogbe, M., Collier, W. E., Fitzkee, N. C., & Zhang, D. (2015). Studying the effects of cysteine residues on protein interactions with silver nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 119, 2910–2916.

[78] Atanasiu, R. L., Stea, D., Mateescu, M. A., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Maupoil, V., Nadeau, R., & Rochette, L. (1998). Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 189, 127–135.

[79] Santos, S. F., Zanette, D., Fischer, H., & Itri, R. (2003). A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*, 262, 400–408.

[80] Rao, P. S., Nolasco, E., Handa, A., Naldrett, M. J., Alvarez, S., & Majumder, K. (2020). Effect of pH and heat treatment on the antioxidant activity of egg white protein-derived peptides after simulated in-vitro gastrointestinal digestion. *Antioxidants*, 9, 1114.

[81] Akagawa, M., Shigemitsu, T., & Suyama, K. (2003). Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 2632–2640.

- [82] Long, L. H., Lan, A. N. B., Hsuan, F. T. Y., & Halliwell, B. (1999). Generation of hydrogen peroxide by “antioxidant” beverages and the effect of milk addition. Is cocoa the best beverage? *Free Radical Research*, 31, 67–71.
- [83] Grzesik, M., Bartosz, G., Stefaniuk, I., Pichla, M., Namieśnik, J., & Sadowska-Bartosz, I. (2019). Dietary antioxidants as a source of hydrogen peroxide. *Food Chemistry*, 278, 692–699.
- [84] Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*, 473(7), 805–825.
- [85] Matlashov, M. E., Belousov, V. V., & Enikolopov, G. (2014). How much H₂O₂ is produced by recombinant D-amino acid oxidase in mammalian cells? *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1039–1044.
- [86] Ischiropoulos, H. (2009). Protein tyrosine nitration—An update. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 484, 117–121.
- [87] Farruggia, B., García, G., D’Angelo, C., & Picó, G. (1997). Destabilization of human serum albumin by polyethylene glycols studied by thermodynamical equilibrium and kinetic approaches. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20, 43–51.
- [88] Oktaviani, N. A., Pool, T. J., Kamikubo, H., Slager, J., Scheek, R. M., Kataoka, M., & Mulder, F. A. (2012). Comprehensive determination of protein tyrosine pKa values for photoactive yellow protein using indirect ¹³C NMR spectroscopy. *Biophysical Journal*, 102, 579–586.
- [89] Clarkson, J., & Smith, D. A. (2001). UV Raman evidence of a tyrosine in apo-human serum transferrin with a low pKa that is elevated upon binding of sulphate. *FEBS Letters*, 503, 30–34.
- [90] Ilyasov, I. R., Beloborodov, V. L., Selivanova, I. A., & Terekhov, R. P. (2020). ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1131.
- [91] Mot, A. C., Coman, C., Hadade, N., Damian, G., Silaghi-Dumitrescu, R., & Heering, H. (2020). “Yellow” laccase from *Sclerotinia sclerotiorum* is a blue laccase that enhances its substrate affinity by forming a reversible tyrosyl-product adduct. *PLoS ONE*, 15, e0225530.

- [92] Akerström, B., Maghzal, G. J., Winterbourn, C. C., & Kettle, A. J. (2007). The lipocalin alpha1-microglobulin has radical scavenging activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 31493–31503.
- [93] Osman, A. M., Wong, K. K., Hill, S. J., & Fernyhough, A. (2006). Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340, 597–603.
- [94] Houée-Lévin, C., Bobrowski, K., Horakova, L., Karademir, B., Schöneich, C., Davies, M. J., & Spickett, C. M. (2015). Exploring oxidative modifications of tyrosine: An update on mechanisms of formation, advances in analysis and biological consequences. *Free Radical Research*, 49, 347–373.
- [95] Giulivi, C., Traaseth, N. J., & Davies, K. J. (2003). Tyrosine oxidation products: Analysis and biological relevance. *Amino Acids*, 25, 227–232.
- [96] Osman, A. M., Wong, K. K., & Fernyhough, A. (2006). ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346, 321–329.

12. ANEKS

12.1 Wykaz Rycin

RYSUNEK 1. MODEL POTRÓJNEJ TARCZY CHRONIĄCEJ PRZED RFT [OPRACOWANY NA PODSTAWIE 28].....	15
RYSUNEK 2. KOLORY POWSTAŁE W WYNIKU REAKCJI BSA (10 MG/ML) Z ABTS* (107 MM), Z LEWEJ, ORAZ REAKCJI TYROZYNY (2 MM) Z ABTS* (107 MM), Z PRAWEJ. OBJĘTOŚĆ REAKCJI: 1 ML, CZAS REAKCJI: 1 GODZINA [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 3].	38
RYSUNEK 3. WSPÓŁSTRĄCANIE FIOLETOWEGO PRODUKTU Z BSA PO POTRAKTOWANIU (OD LEWEJ DO PRAWEJ): PBS (BRAK WYTRĄCANIA), ETER DIETYLOWY, CHLOROFORM, ETANOL, ACETON I 10% TCA (KWAS TRICHLOROOCYTOWY) [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 3].	38
RYSUNEK 4. WIDMA EPR RODNIKA ABTS* (100 MM, (A)) ORAZ PRODUKTÓW JEGO REAKCJI Z BSA (20 MG/ML W PBS, (B)) I TYROZYNA (0,4 MG/ML W PBS, (C)). PRODUKTY REAKCJI ZOSTAŁY ZMIERZONE PO CAŁKOWITYM ODBARWIENIU ABTS* [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 3].	42

12.2 Wykaz Tabel

TABELA 1. CAŁKOWITA ZAWARTOŚĆ POLIFENOLI W RÓŻNYCH SUROWCACH I PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH [OPRACOWANA NA PODSTAWIE 21,22,23].	13
TABELA 2. WPŁYW DENATURACJI I TRAWIENIA NA AKTYWNOŚĆ PRZECIWOULENIAJĄCĄ BSA I BIAŁKA JAJA KURZEGO [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 2].	33
TABELA 3. WSPÓŁCZYNNIKI KORELACJI PEARSONA POMIĘDZY BADANYMI PARAMETRAMI [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 1].	47

12.3 Wykaz wykresów

WYKRES 1. ZAWARTOŚĆ POLIFENOLI KAWY, KAKAO, HERBATY I EKSTRAKTÓW Z ZIÓŁ I PRZYPRAW LECZNICZYCH. WARTOŚCI Z RÓŻNYMI LITERAMI SĄ ZNACZĄCO RÓŻNE PRZY $P < 0,05$ (TEST ANOVA) [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 1].	27
WYKRES 2. CAŁKOWITA ZDOLNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA MIERZONA METODĄ REDUKCJI DPPH* KAW, KAKAO, HERBAT I EKSTRAKTÓW Z ZIÓŁ I PRZYPRAW LECZNICZYCH. WARTOŚCI Z RÓŻNYMI LITERAMI SĄ ZNACZĄCO RÓŻNE PRZY $P < 0,05$ (TEST ANOVA) [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 1].	28
WYKRES 3. CAŁKOWITA ZDOLNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA MIERZONA METODĄ REDUKCJI ABTS* KAW, KAKAO, HERBAT I EKSTRAKTÓW Z ZIÓŁ I PRZYPRAW LECZNICZYCH. WARTOŚCI Z RÓŻNYMI LITERAMI SĄ ZNACZĄCO RÓŻNE PRZY $P < 0,05$ (TEST ANOVA) [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 1].	29
WYKRES 4. CAŁKOWITA ZDOLNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA MIERZONA METODĄ FRAP KAW, KAKAO, HERBAT I EKSTRAKTÓW Z ZIÓŁ I PRZYPRAW LECZNICZYCH. WARTOŚCI Z RÓŻNYMI LITERAMI SĄ ZNACZĄCO RÓŻNE PRZY $P < 0,05$ (TEST ANOVA) [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 1].	30

WYKRES 5. CAŁKOWITA ZDOLNOŚCI ANTYOKSYDACYJNA MIERZONA METODĄ CUPRAC KAW, KAKAO, HERBAT I EKSTRAKTÓW Z ZIOŁ I PRZYPRAW LECZNICZYCH. WARTOŚCI Z RÓŻNYMI LITERAMI SĄ ZNACZĄCO RÓŻNE PRZY $P < 0,05$ (TEST ANOVA) [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 1].	31
WYKRES 6. REAKTYWNOŚĆ AMINOKWASÓW W TRZECH METODACH OCENY AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 2].	32
WYKRES 7. STĘŻENIE NADTLENKU WODORU W EKSTRAKTACH W „ZEROWYM” I PO 1 GODZINIE. WARTOŚCI Z RÓŻNYMI LITERAMI SĄ ZNACZĄCO RÓŻNE PRZY $P < 0,05$ (TEST ANOVA) [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 1].	34
WYKRES 8. RÓŻNICA MIĘDZY CZASEM ZEROWYM I PO 1H STĘŻENIE NADTLENKU WODORU W EKSTRAKTACH. WARTOŚCI Z RÓŻNYMI LITERAMI SĄ ZNACZĄCO RÓŻNE PRZY $P < 0,05$ (TEST ANOVA). [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 1].	35
WYKRES 9. STĘŻENIE NADTLENKU WODORU W FUNKCJI STĘŻENIA I CZASU INKUBACJI, PIROGALLOLU, KWASU GALUSOWEGO I KWERCETYNY. WARTOŚCI Z RÓŻNYMI LITERAMI SĄ ZNACZĄCO RÓŻNE PRZY $P < 0,05$ (TEST ANOVA) [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 1].	36
WYKRES 10. STĘŻENIA NADTLENKU WODORU WYSTĘPUJĄCE W ROZTWORACH POLIFENOLU ZAWIERAJĄCYCH RÓŻNE STĘŻENIA (5-50 MM) EGZOGENNEGO NADTLENKU WODORU. WARTOŚCI Z RÓŻNYMI LITERAMI SĄ ZNACZĄCO RÓŻNE PRZY $P < 0,05$ (TEST ANOVA). [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 1].	37
WYKRES 11. WIDMA ABTS I FIOLETOWYCH PRODUKTÓW REAKCJI BSA, BIAŁKA JAJA KURZEGO I TYROZYNY Z ABTS* [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 3].	39
WYKRES 12. ZALEŻNOŚĆ ABSORBANCJI PRODUKTU FIOLETOWEGO (550 NM) BSA I ABTS* OD STĘŻENIA ABTS*. BSA: 10 MG/ML PBS [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 3].	40
WYKRES 13. ZALEŻNOŚĆ INTENSYWNOŚCI BARWY FIOLETOWEGO PRODUKTU OD ILOŚCI DODANEGO ROZTWORU BIAŁKA [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 3].	40
WYKRES 14. WPŁYW REDUKTORÓW NA WIDMO ABSORPCJI FIOLETOWEGO PRODUKTU REAKCJI BSA Z ABTS* [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 3].	41
WYKRES 15. WPŁYW NITROWANIA NA ROZTWÓR BSA NA WYDAJNOŚĆ REAKCJI POWSTAWANIA FIOLETOWEGO PRODUKTU [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 3].	42
WYKRES 16. WPŁYW PH NA POWSTAWANIE BARWNEGO PRODUKTU W REAKCJI TYROZYNY (2 MM) Z ABTS* (2,5 MM) W 50 MM BUFORACH OCTANOWO-FOSFORANOWYCH O RÓŻNYCH POZIOMACH PH. CZAS REAKCJI: 24 GODZINY [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 3].	43
WYKRES 17. WIDMA UV-VIS TYROZYNY (177 MM) I PRODUKT JEJ REAKCJI Z RODNIKIEM ABTS* (147MM) [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 3].	44
WYKRES 18. WIDMA EMISJI FLUORESCENCJI TYROZYNY (1 MM) ORAZ PRODUKTU REAKCJI POMIĘDZY TYROZYNA (1 MM) A RODNIKIEM ABTS* (1,63 MM) W RÓŻNYCH PUNKTACH CZASOWYCH OD DODANIU ABTS* [BADANIA WŁASNE, PUBLIKACJA 3].	45

12.4 Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów

Article

Generation of Hydrogen Peroxide and Phenolic Content in Plant-Material-Based Beverages and Spices

Kacper Kut ¹, Anna Tama ¹, Paulina Furdak ¹, Grzegorz Bartosz ² and Izabela Sadowska-Bartosz ^{1,*}

¹ Laboratory of Analytical Biochemistry, Institute of Food Technology and Nutrition, College of Natural Sciences, University of Rzeszow, 35-601 Rzeszow, Poland; kkut@ur.edu.pl (K.K.); aniatama@gmail.com (A.T.); paulinaf2@o2.pl (P.F.)

² Department of Bioenergetics, Food Analysis and Microbiology, Institute of Food Technology and Nutrition, College of Natural Sciences, University of Rzeszow, 35-601 Rzeszow, Poland; gbartosz@ur.edu.pl

* Correspondence: isadowska@ur.edu.pl

Abstract: Phenolics are the main components of plant extracts contributing to their antioxidant activity. However, they autoxidize, generating hydrogen peroxide. This study aimed to examine the correlation between the phenolic content, total antioxidant capacity (TAC), and the amount of H₂O₂ generated in extracts of 18 various plant materials. A significant correlation was found between the phenolic content and TAC measured by ABTS[•] decolorization, CUPRAC, FRAP, and DPPH[•] decolorization methods (correlation coefficients *r* of 0.94, 0.93, 0.90, and 0.78, respectively). However, the correlation between the phenolic content and H₂O₂ amount generated upon brewing (*r* = 0.25) and after 1 h incubation (*r* = −0.37) was low or negative. The correlation between the phenolic content and the change of H₂O₂ concentration during 1 h incubation of the extracts was negative (*r* = −0.61). Examination of three phenolics (pyrogallol, gallic acid, and quercetin) showed that all compounds generate but also scavenge H₂O₂. Therefore, the H₂O₂ concentrations in phenolic-containing extracts represent net results of the rates of generation and scavenging of H₂O₂, which may differ depending on the composition of phenolics in the extracts, do not always increase with the increase in time and concentration of phenolics, and cannot serve as an index of the phenolic content.

Keywords: phenolics; tea; cacao; coffee; medicinal herbs; spices; hydrogen peroxide



Citation: Kut, K.; Tama, A.; Furdak, P.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartosz, I.

Generation of Hydrogen Peroxide and Phenolic Content in Plant-Material-Based Beverages and Spices. *Processes* **2024**, *12*, 166. <https://doi.org/10.3390/pr12010166>

Academic Editors: Chi-Fai Chau and Mauro Marengo

Received: 10 November 2023

Revised: 4 January 2024

Accepted: 8 January 2024

Published: 10 January 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

It has been demonstrated that beverages based on plant-derived material which are rich in polyphenols, such as tea and coffee, generate hydrogen peroxide, especially during long standing [1–7]. Hydrogen peroxide concentrations reaching 700 μM were reported in black tea 12 h after brewing [2]. We have reported the generation of hydrogen peroxide in such polyphenol-containing products as wine [8], cooked vegetables [9,10], as well as infusions of medicinal herbs [11]. Non-enzymatic autoxidation of polyphenols contributes to the generation of hydrogen peroxide in honey and thus to the antibacterial activity of honey [12].

Phenolic compounds are excellent antioxidants, scavenging reactive oxygen and nitrogen species [13–15], being the main contributors to the antioxidant capacity of plant-based food and beverages [16–18]. However, their reactivity with oxidants makes them susceptible to oxidation, including “autoxidation”, i.e., oxidation in contact with oxygen, especially in the presence of trace amounts of transition metal ions such as Fe(II) or Cu(I) acting as catalysts [12]. This property of phenolic compounds is not too important inside the cells, where oxygen concentration is lower than in the atmosphere, the environment is reducing, and primary products of oxidation can be reduced by other intracellular antioxidants [19,20]; nevertheless, this protection is lost and autoxidation commences when phenolic compounds in plant extracts or lifeless plant material contact atmospheric oxygen. The proposed mechanism of autoxidation of polyphenolic compounds QH₂ assumes the

occurrence of a two-step reaction. The first step consists in the formation of a semiquinone radical HQ^\bullet , while the second results in the formation of a quinone Q. Superoxide radical anions formed in these reactions either dismutate to form oxygen and hydrogen peroxide or oxidize available substrates, being themselves reduced to H_2O_2 . Thus, the main reason for the generation of hydrogen peroxide in plant-based beverages is the autoxidation of phenolics present in these beverages [21–23].

The occurrence of phenol autoxidation, accelerated at high temperatures during brewing tea, coffee, or herbal infusions, provokes a question of whether the generation of hydrogen peroxide may be an index of the content of phenolic compound and the antioxidant capacity of phenolic-rich materials. However, the situation may be not so simple, since polyphenols are also known to react with hydrogen peroxide. Treatment with hydrogen peroxide and peroxidase was proposed to detoxify phenol, 2-methylphenol, and chlorinated phenol derivatives [24]. Hydrotyrosol, a polyphenol from olive oil, was found to react with hydrogen peroxide but not superoxide [25]. It was demonstrated that polyphenols such as hydroquinone, quercetin, piceatannol, and resveratrol can exert an antioxidant effect in the skin by reacting with hydrogen peroxide [26]. In an aqueous peppermint extract, eriocitrin showed the highest H_2O_2 -scavenging activity followed by rosmarinic acid, while hesperidin showed a low scavenging activity, and diosmin, narirutin, and isorhoifolin exhibited almost no H_2O_2 -scavenging activity [27]. Phenolic acids, especially gallic acid and pyrogallol, were also found to react with hydrogen peroxide [28]. Benzoate derivatives were much stronger H_2O_2 scavengers than cinnamic acids [29]. Among benzoic acid derivatives, vanillic acid (3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid) was found to be the most efficient H_2O_2 scavenger with its hydrogen peroxide scavenging activity of $170.2 \mu M^{-1}$, whereas protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid) exhibited the weakest activity ($5.90 \mu M^{-1}$) [30]. In another study, from among six phenolic acids, caffeic acid was found to be the most efficient H_2O_2 scavenger with its H_2O_2 -scavenging activity of $125 \times 10^{-3} \mu M^{-1}$, while trans-cinnamic acid exhibited the weakest activity ($0.73 \times 10^{-3} \mu M^{-1}$). In that study, the H_2O_2 -scavenging activity of various herbal extracts was estimated, with black and green tea showing activities of about 1.1×10^5 mL/g and 1.3×10^5 mL/g, respectively [31]. The hydrogen peroxide-scavenging activity of infusions of *Rosa canina* L. was also reported [32]. Thus, the behavior of various phenolics is different both concerning the rate of generation and the rate of scavenging of hydrogen peroxide, and it was concluded in earlier studies that several of the beverages commonly drunk by humans show a complex mixture of anti- and pro-oxidant abilities [4].

This study was thus aimed at answering the question whether or not the generation of hydrogen peroxide in extracts of diverse plant materials may be an index of their content of phenolics on the basis of analysis of 18 extracts of various nature (coffee, tea, cocoa, extracts of medicinal plants and spices).

2. Materials and Methods

2.1. Reagents, Materials and Equipment

Acetic acid (CAS no. 64-19-7, catalog no. 425687339, 80%), hydrochloric acid (CAS no. 7647-01-0, cat. no. 115752837, 35–38%), hydrogen peroxide (CAS no 7722-84-1, cat. no. 118851934, 30%), perchloric acid (CAS no. 7601-90-3, cat. no. 115649402, 60%), and Tris base (CAS no. 77-86-1, cat. no. 118534707, purity $\geq 99\%$) were purchased from Chempur (Piekary Śląskie, Poland). 2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (CAS no. 3682-35-7, cat. no. 93285, purity $\geq 99\%$) was supplied by FLUKA—Merck (Poznań, Poland). Copper (II) sulfate pentahydrate (CAS no 7758-99-8, cat. no. 658310422, purity $\geq 98\%$), ethanol (CAS no. 64-17-5, cat. no. 396480111, purity $\geq 99\%$), sodium acetate anhydrous (CAS no. 127-09-3, cat. no. BN60/6191, purity $\geq 99\%$), and Xylenol Orange (CAS no 3618-43-7, cat. no. 704590231, purity $\leq 100\%$) were obtained from Avantor Performance Materials (Gliwice, Poland). Catalase (CAS no. 9001-05-2, cat. no. C40, $\geq 10,000$ units/mg protein), dimethyl sulfoxide (DMSO) (CAS no. 67-68-5, cat. no. D2438, anhydrous, $\geq 99.9\%$), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (CAS no. 1898-66-4, cat. no. D9132, purity $\leq 100\%$),

ferric chloride hexahydrate (CAS no. 10025-77-1, cat. no. 236489, purity $\geq 97\%$), (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox; CAS no. 53188-07-1, cat. no. 238813, purity $\geq 97\%$), gallic acid (CAS no. 149-91-7; cat. no. G7384; purity 97.5–102.5% (titration), Mohr's salt (CAS no. 7783-85-9, cat. no. 203505, purity $\geq 99,997\%$), neocuproine (CAS no. 484-11-7, cat. no. N1501, purity $\geq 98\%$), phosphate-buffered saline (PBS) (cat. no. PBS404.200), potassium persulfate (CAS no. 7727-21-1, cat. no. 379824, purity 99.99%), pyrogallol (CAS no. 87-66-1, cat. no. P0381, purity $\geq 98\%$), and quercetin (CAS no. 117-39-5, cat. no. Q4951, purity $\geq 95\%$) were provided by Merck (Poznań, Poland). 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; CAS no. 504-14-6, cat. no. 10102946001, purity $\geq 99\%$) was purchased from Roche (Warsaw, Poland).

The products analyzed (white, green, black, and red tea, rooibos, yerba mate, Tchibo and Brazil coffee, cocoa, herbs of rosemary and thyme, and spices (allspice, chili, green and black pepper, caraway seeds, and coriander) were purchased in local stores in Rzeszów as commercially available products.

Distilled water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Transparent flat-bottom 96-well plates used for the assays were obtained from (Greiner, Kremsmünster, Austria; cat. no. 655101). Absorbance was measured in a Spark multimode plate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

2.2. Extracts and Solutions

The material was crushed in a mortar and 250 mg of the dry powdered material was treated with 25 mL of hot tap water, to mimic the conditions commonly used for the preparation of infusions. After 10 min, the infusions were centrifuged ($3000\times g$, 10 min) and aliquots of the supernatants were withdrawn for the assay of the concentration of hydrogen peroxide, the concentration of phenolics, and antioxidant capacity.

2.3. Estimation of the Phenolic Content

The content of phenolic compounds was estimated using the Folin–Ciocalteu reagent [33]. Gallic acid was used as a standard and the results were expressed in gallic acid equivalents (GAE).

2.4. Estimation of Antioxidant Capacity

The antioxidant capacity of infusions was estimated by the ABTS[•] decolorization, DPPH[•] decolorization, FRAP, and CUPRAC methods.

The ABTS[•] decolorization assay developed by Re et al. [34] in a slight modification [35] was used. Briefly, the stock ABTS[•] solution was prepared by overnight oxidation of ABTS with potassium persulfate. Aliquots of the infusions or a Trolox solution were added to wells of a 96-well plate containing 200 μ L of ABTS[•] solution diluted with PBS to provide absorbance of 1.0 at 734 nm in a plate reader. The decrease in absorbance was read after 30-min incubation at ambient temperature.

The DPPH[•] decolorization assay was performed by adding various amounts of the infusions or a Trolox solution to 200 μ L of 0.3 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) solution in methanol, incubating in the dark at ambient temperature for 30 min, and measuring the decrease in absorbance at 517 nm.

For the FRAP assay, a slightly modified procedure of Benzie and Strain [36] was used. In brief, increasing volumes of the infusions or a Trolox solution were pipetted to wells of a 96-well plate containing 200 μ L of the working solution. The working solution was freshly prepared by mixing one volume of 20 mM FeCl₃, one volume of 10 mM TPTZ in 40 mM HCl, and ten volumes of 0.3 M acetate buffer, pH 3.6. After 30-min incubation at ambient temperature, absorbance was measured at 593 nm against a reagent blank.

For the CUPRAC assay, the procedure of Özyürek et al. [37] was used in a small modification. Briefly, 50 μ L of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, were mixed with 50 μ L of 10 mM CuSO₄, 50 μ L of 7.5 mM neocuproine solution in ethanol, and various amounts of a sample or a Trolox solution, plus PBS to complete the sample volume to 50 μ L in wells of

a 96-well plate. After thorough mixing, the plate was incubated at room temperature for 60 min, and the absorbance of the samples was measured at 450 nm against a reagent blank. Antioxidant activity was related to Trolox and expressed in Trolox equivalents (TE).

2.5. Generation and Scavenging of Hydrogen Peroxide

Generation of hydrogen peroxide by extract of plant materials compounds was studied at “zero time” (i.e., about 15 min after the contact of the material with boiling water) and after subsequent incubation for 1 h. Gallic acid and pyrogallol were dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) to stabilize the pH. The stock solution of quercetin (100 mM) was made in DMSO and diluted in PBS. Generation of H₂O₂ by individual polyphenols (gallic acid, pyrogallol, and quercetin, 0.5, 1, 2, and 5 mM) was studied at “zero time” (i.e., about 5–7 min after pouring the substances with water) and after incubations of their solutions for 1, 2, and 3 h at room temperature. The scavenging of hydrogen peroxide by phenolics was studied by incubating 5–50 μM hydrogen peroxide with these polyphenols at various concentrations and assaying the concentration of H₂O₂ in the samples.

Hydrogen peroxide concentration was determined by the Xylenol Orange peroxide assay [38] using catalase to provide specificity for hydrogen peroxide [11]. Briefly, the infusion (180 μL) was added to two wells of a 96-well plate. One well was added with 2 μL of water and another with 2 μL of a 1 mg/mL catalase solution. After 15 min incubation, 20.2 μL of the Xylenol Orange Reagent (2.5 mM Xylenol Orange and 2.5 mM Mohr salt in 1.1 M perchloric acid) was added to both wells, and after 30 min incubation, absorbance was read at 560 nm. The difference in absorbance between the sample not treated with catalase and the catalase-treated sample was used as a measure of the concentration of hydrogen peroxide. The amount of catalase used was found to be sufficient for the full decomposition of 1 mM hydrogen peroxide present in a 200-μL sample during 15 min. The concentration of hydrogen peroxide was calculated using a calibration curve.

Alternatively, when studying solutions of individual polyphenols, in which the initial absorbance of the solutions was not so variable, hydrogen peroxide was assayed using the reagent blank procedure. In this procedure, absorbance produced by a sample reacted with a blank reagent containing the Mohr salt and perchloric acid, but no Xylenol Orange, was subtracted from the value obtained for a sample studied to correct for the own absorbance of the examined material [11].

2.6. Statistical Analysis

The results are shown as mean values ± standard deviation from at least three independent experiments. The statistical significance of differences was evaluated using ANOVA with the post-hoc Fisher LSD test, assuming the borderline of statistical significance of 0.05. The statistical significance of correlation coefficients was estimated with the Student’s “*t*” test. Statistical analysis of the data was performed using the STATISTICA software package (version 13.1, StatSoft Inc., 2016, Tulsa, OK, USA).

3. Results

Teas, rooibos, yerba mate, coffees, cocoa, infusions of rosemary and thyme, and extracts of spices (allspice, chili, green and black pepper, caraway seeds, and coriander) were studied. The concentration of phenolics in the infusions showed a considerable variation, from 17.8 ± 1.3 μg GAE/mL (yerba mate) to 1019.3 ± 4.0 μg GAE/mL (Tchibo coffee). Similar variation was found for values of total antioxidant capacity (TAC) estimated by various methods. TAC estimated by ABTS• decolorization ranged from 0.3 (coriander) to 23.1 (white tea) μmol TE/mL. TAC assayed by DPPH• decolorization varied from 0.06 μmol TE/mL (coriander) to 3.6 μmol TE/mL (black tea), TAC assayed by FRAP from 0.1 μmol TE/mL (coriander) to 7.1 μmol TE/mL (Brazil coffee), and TAC estimated by the CUPRAC method from 0.4 μmol TE/mL (coriander) to 21.0 μmol TE/mL (green tea) (Figure 1).

The concentration of hydrogen peroxide in freshly prepared extracts (“zero time”) and after 1 h incubation at ambient temperature, as well as the difference between the H_2O_2 concentrations after 1 h incubation and at “zero time” are presented in Figure 2. Again, considerable differences were seen in the amount of hydrogen peroxide generated at “zero time”. The highest H_2O_2 concentrations ($74.3 \pm 2.7 \mu M$ and $66.7 \pm 4.4 \mu M$) were noted for black tea and yerba mate, respectively, and the lowest ($5.4 \pm 1.2 \mu M$ and $7.7 \pm 0.2 \mu M$) for the Tchibo coffee and the chili extract, respectively. After 1 h incubation, the increase in the concentration of hydrogen peroxide was the most prominent in the extract of green pepper but, surprisingly, in some extracts, especially in green tea, black tea, and red tea, the concentration of H_2O_2 decreased.

There were significant correlations between the content of phenolics in the extracts and TAC estimated by various assays, as well as between the results of various TAC assays. The highest values of correlation coefficients were found for the total phenolic content vs. TAC assayed by ABTS• decolorization ($r = 0.94$) and TAC assayed by the CUPRAC method ($r = 0.93$). The highest correlation between the results of various TAC assays was obtained for the FRAP and CUPRAC methods ($r = 0.95$), which is understandable as both assays are based on the same principle, i.e., reduction of metal ions (Fe^{3+} and Cu^{2+} , respectively).

However, the correlation between the polyphenol content and H_2O_2 concentration at “zero time” was not significant statistically, and the correlation between the polyphenol content and H_2O_2 concentration after 1 h incubation was even negative. The correlation between the polyphenol content of the extracts and the change in H_2O_2 concentration during 1 h incubation was significant but, surprisingly, also negative (Table 1).

This weak correlation between the content of phenolics and the production of hydrogen peroxide in various plant extracts and the lack of a consistent pattern of changes in the hydrogen peroxide concentrations in various extracts during 1 h incubation prompted us to examine the generation of hydrogen peroxide by exemplary individual polyphenols (pyrogallol, gallic acid, and quercetin) and the reactions of these polyphenols with hydrogen peroxide. The results shown in Figure 3 evidence that (i) all the polyphenols studied generated micromolar concentrations of hydrogen peroxide, (ii) the amount of hydrogen peroxide generated was not proportional to the incubation time, and (iii) the amount of generated hydrogen peroxide was not proportional to the phenolic concentration.

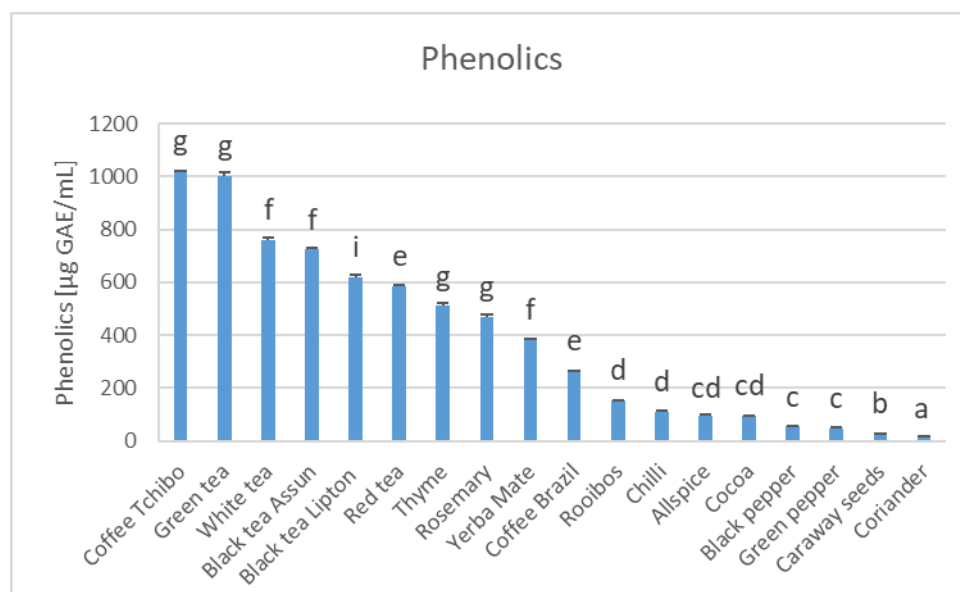


Figure 1. Cont.

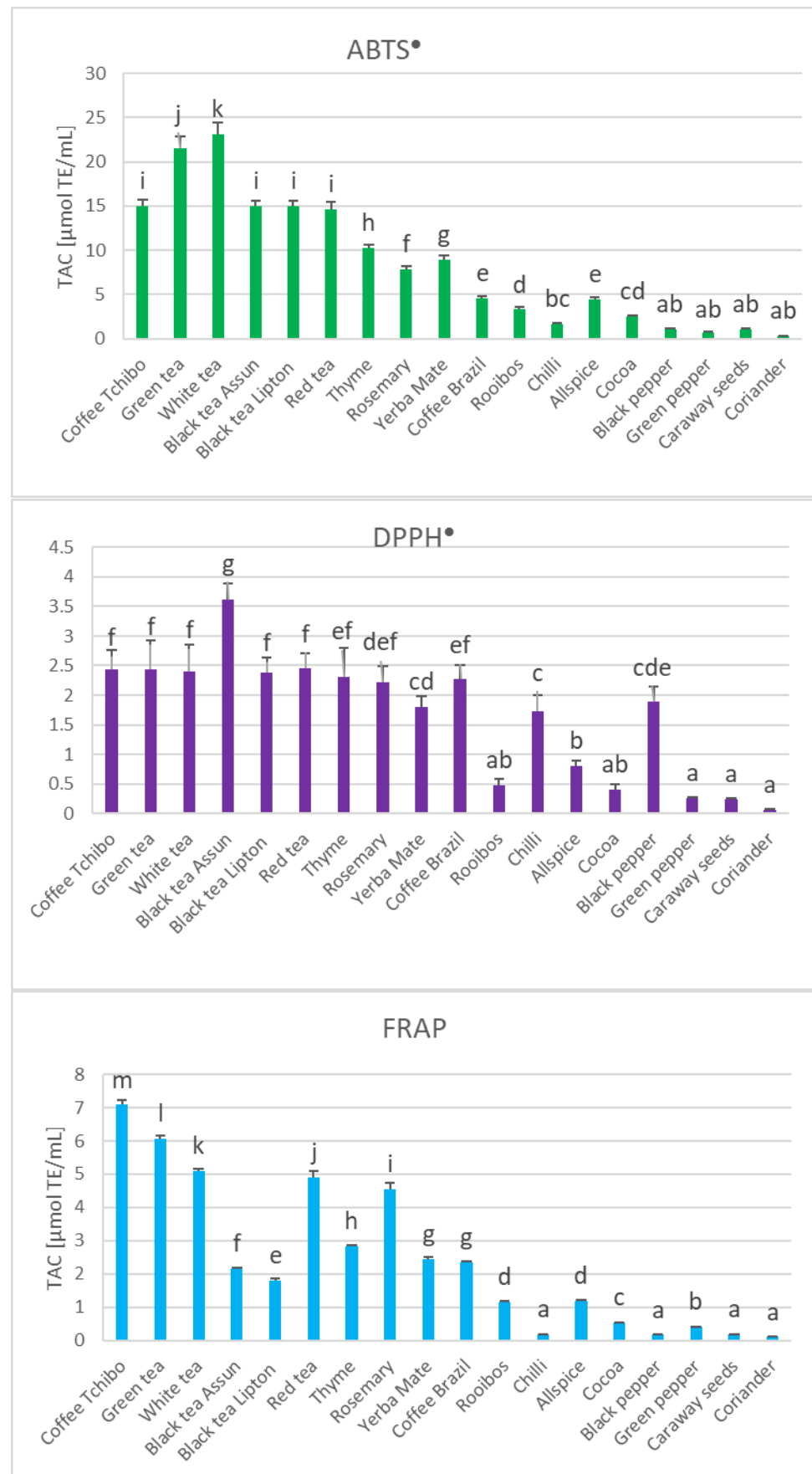


Figure 1. Cont.

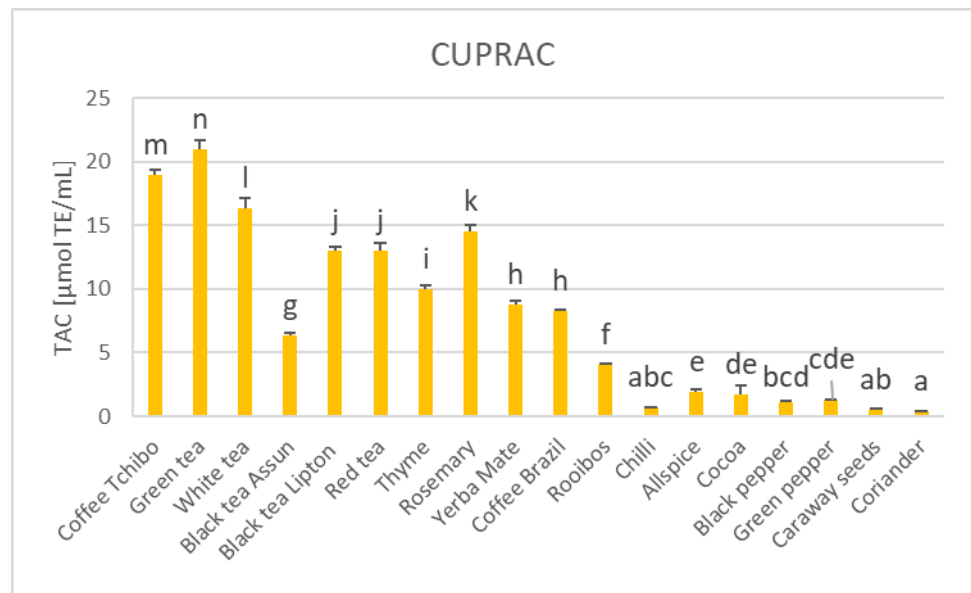


Figure 1. The content of phenolic compounds and TAC estimated by various methods of coffee, cocoa, tea, and extracts of medicinal herbs and spices. Values with different letter superscripts are significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA test).

Table 1. Pearson correlation coefficients between the parameters measured.

Parameter	Phenolics [μg GAE/mL]	TAC-ABTS [•] [$\mu\text{mol TE/mL}$]	TAC-FRAP [$\mu\text{mol TE/mL}$]	TAC-CUPRAC [$\mu\text{mol TE/mL}$]	TAC-DPPH [•] [$\mu\text{mol TE/mL}$]	H ₂ O ₂ Time “0” [μM]
TAC-ABTS [•]	0.94 ***					
TAC-FRAP	0.90 ***	0.83 ***				
TAC-CUPRAC	0.93 ***	0.88 ***	0.95 ***			
TAC-DPPH [•]	0.78 ***	0.74 ***	0.63 **	0.68 ***		
H ₂ O ₂ time “0”	0.25	0.40	0.13	0.21	0.31	
H ₂ O ₂ 1 h	−0.37	−0.37	−0.31	−0.30	−0.40	0.48 *
Delta H ₂ O ₂	−0.61 **	0.73 ***	0.45 *	0.49 *	0.69 ***	0.16

Delta H₂O₂, the difference between H₂O₂ concentration after 1 h incubation and time “0”; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

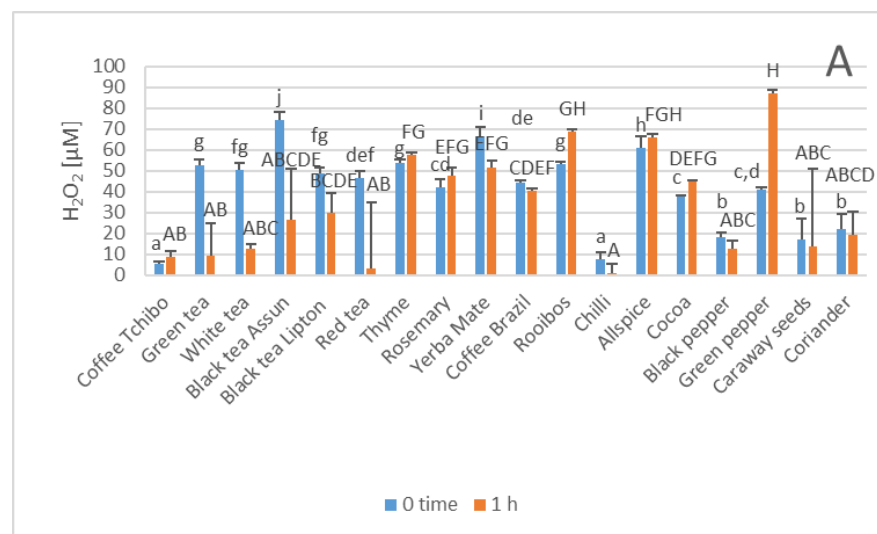


Figure 2. Cont.

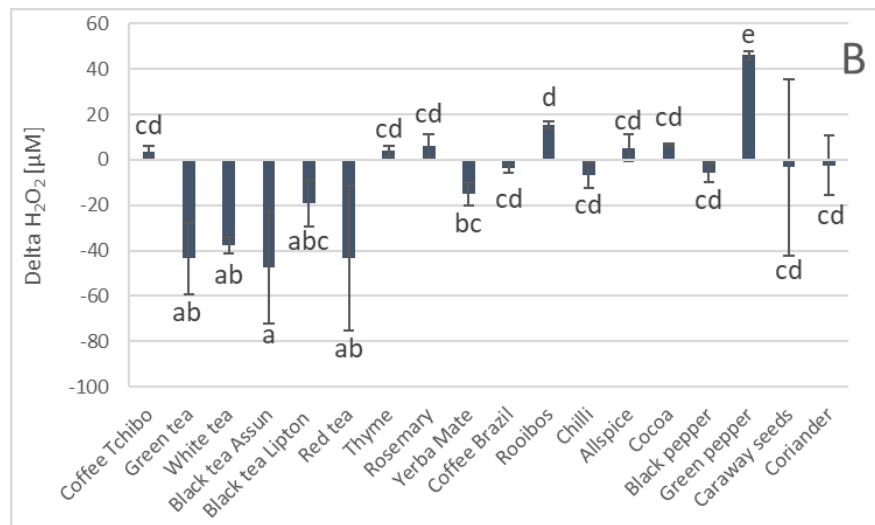


Figure 2. Concentration of hydrogen peroxide in the infusions at “zero time” and after 1 h (A) and the difference between the readings after 1 h and at “zero time” (B). Values with different letter superscripts are significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA test).

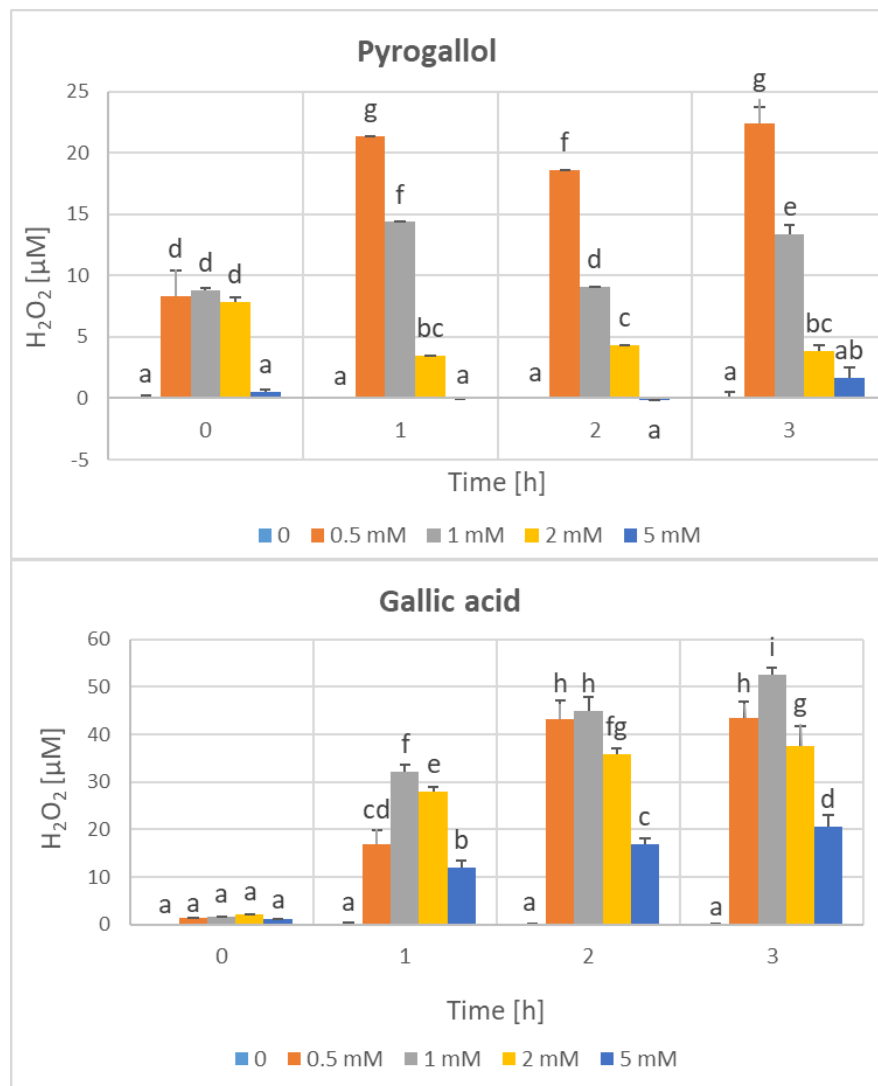


Figure 3. Cont.

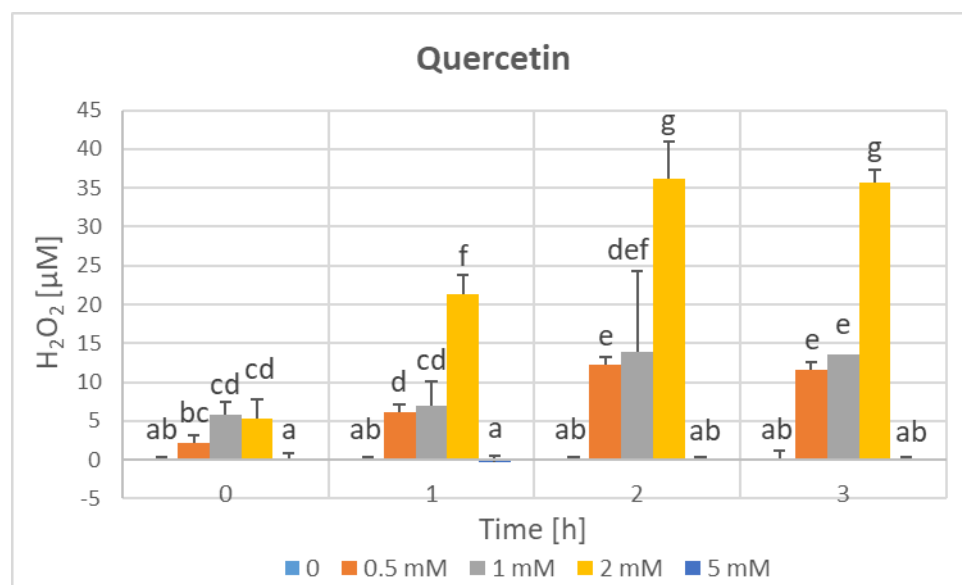


Figure 3. Generation of hydrogen peroxide as a function of concentration of three polyphenols (0.5–5 mM) and incubation time (0–3 h). Values with different letter superscripts are significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA test).

The significant generation of hydrogen peroxide at “zero time”, especially for pyrogallol, may be surprising; however, there was a technical several-minute delay between the initial contact of dry solid polyphenol with water and the addition of the FOX reagent to the solution, so the “zero time” denotes, in fact, about 5–7 min. For pyrogallol solutions, the hydrogen peroxide concentration increased during 1 h incubation but then remained fairly stable. For gallic acid, the generation of hydrogen peroxide at “zero time” was negligible, was maximal during the first hour of incubation, and then continued to increase though the magnitude of the increase diminished with time. A similar picture was obtained for quercetin, but the generation of hydrogen peroxide by intermediate quercetin concentrations at the “zero time” was higher than in the case of gallic acid.

The dependence of the concentration of hydrogen peroxide generated on the polyphenol concentration did not follow a uniform pattern as well. For pyrogallol, the highest hydrogen peroxide generation was found for the lowest polyphenol concentration applied (0.5 mM, except for the “zero time”). For gallic acid, the highest generation was revealed for intermediate concentrations, peaking at 1 mM. For quercetin, the highest generation of H₂O₂ was generated for 2 mM polyphenol, and almost no generation was detected for 5 mM quercetin. Such complex relationships may be explained by the assumption that phenolics not only generate H₂O₂ but they (or products of their oxidation/degradation) also react with the generated hydrogen peroxide.

To check the validity of this assumption, the reactions of polyphenols with exogenously added hydrogen peroxide were studied. As shown in Figure 4, exogenous hydrogen peroxide was partly consumed by polyphenols although hydrogen peroxide solutions were fairly stable in the absence of polyphenols; no spontaneous decomposition but even an apparent increase in H₂O₂ concentration in two cases was noted during incubation. The concentration of hydrogen peroxide measured was almost always lower than the sum of concentrations of hydrogen peroxide generated in the absence of exogenous hydrogen peroxide and that of hydrogen peroxide added.

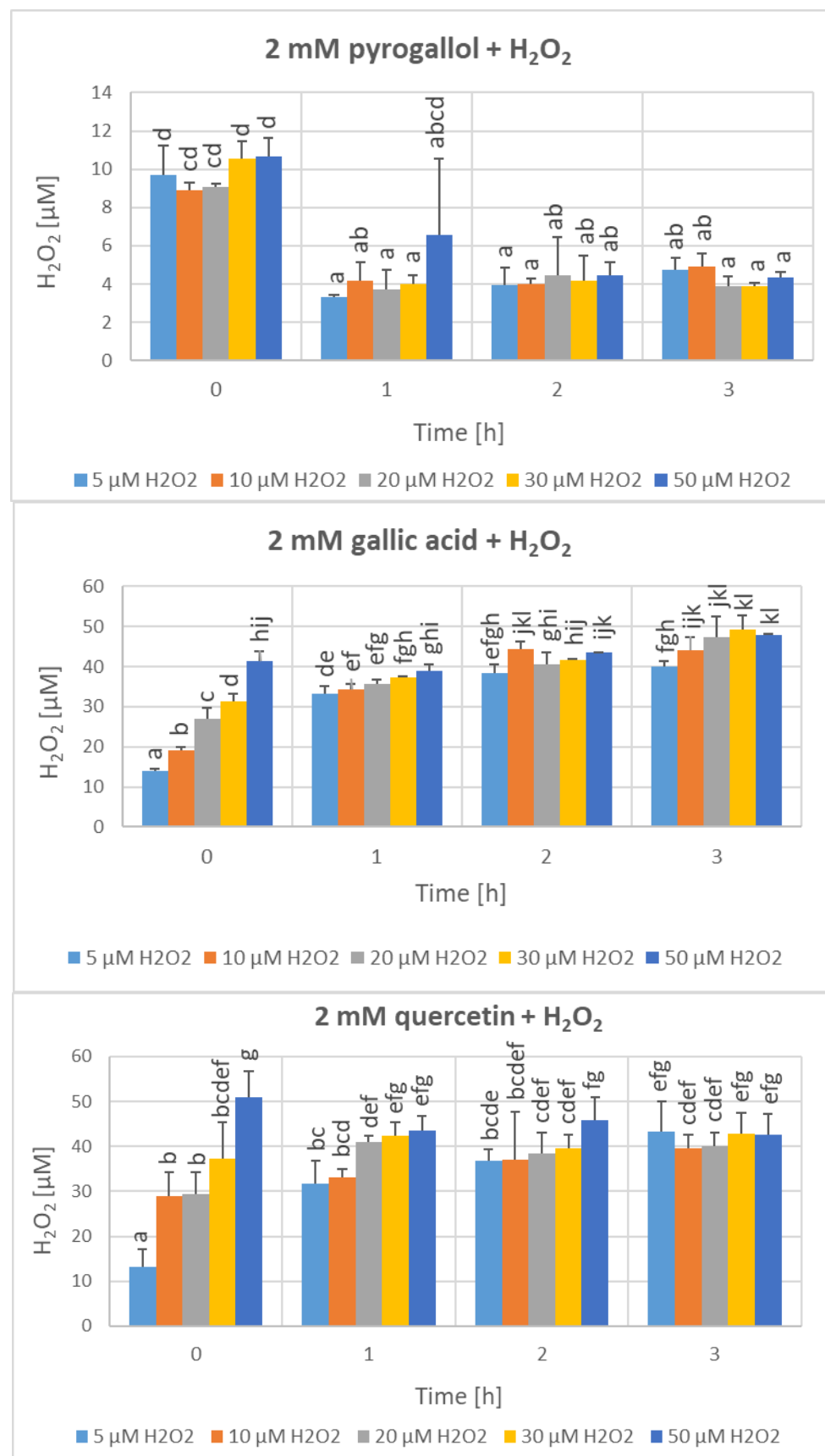


Figure 4. Cont.

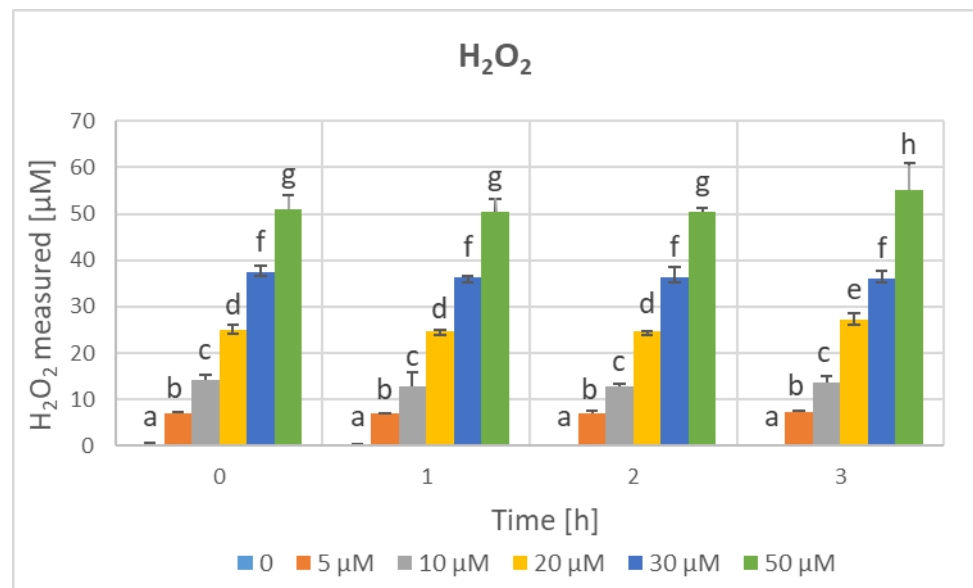


Figure 4. Hydrogen peroxide concentrations found in polyphenol solutions containing various concentrations (5–50 µM) of exogenous hydrogen peroxide. Values with different letter superscripts are significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA test).

The deficit of hydrogen peroxide, defined as the concentration of hydrogen peroxide generated by 2 mM polyphenols plus the concentration of hydrogen peroxide added minus the concentration of hydrogen peroxide measured, is shown in Figure 5. For pyrogallol, the H₂O₂ deficit was practically constant in time, indicating that consumption of hydrogen peroxide took place during the initial minutes of incubation. For gallic acid and quercetin, the deficit initially increased in time (in some cases, indicating the highest rate of hydrogen peroxide consumption during the first hour of incubation (the period during which the rate of endogenous H₂O₂ generation was also the highest)).

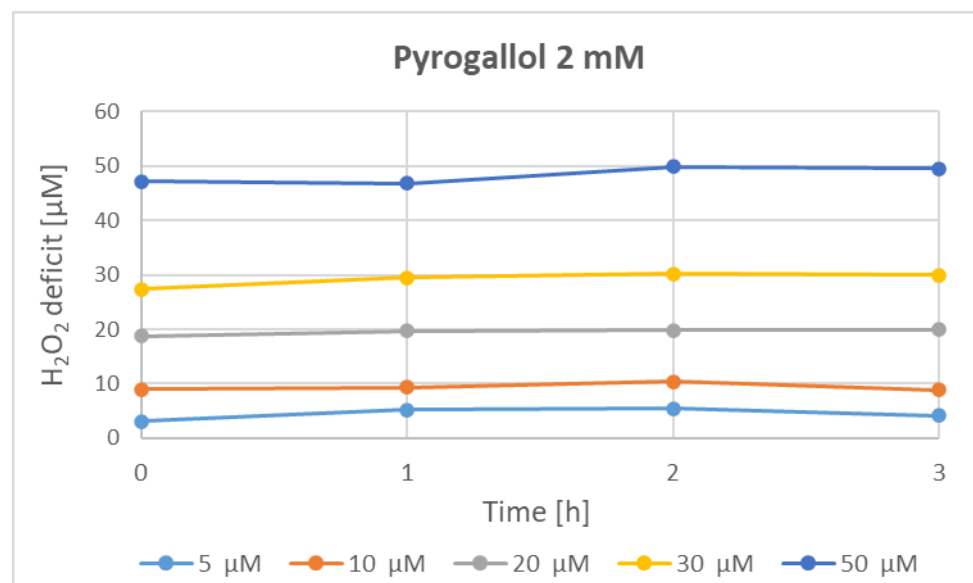


Figure 5. Cont.

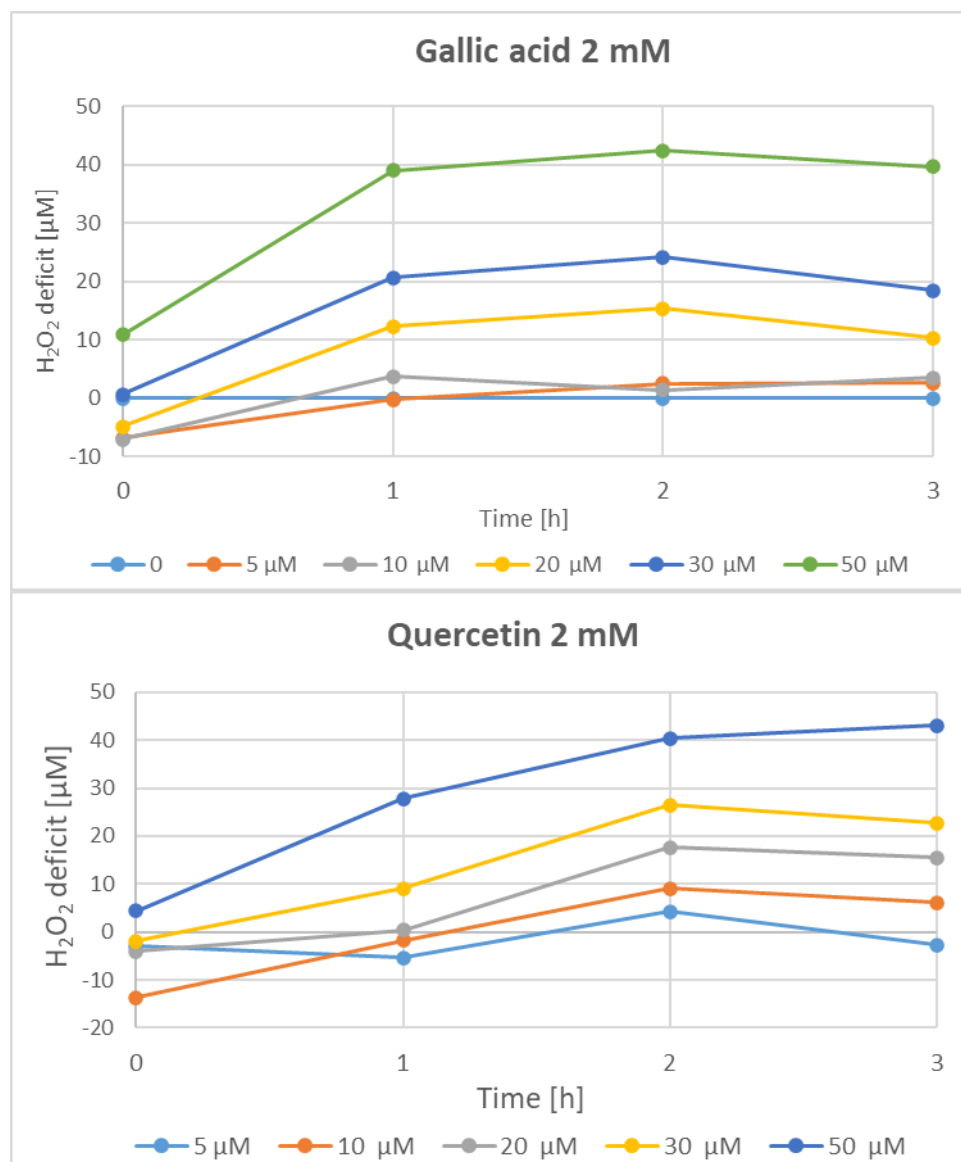


Figure 5. Deficit of hydrogen peroxide (sum of H_2O_2 concentrations generated in the absence of exogenous H_2O_2 and of added hydrogen peroxide minus H_2O_2 concentration detected) during incubation of 2 mM polyphenols with exogenous hydrogen peroxide (5–50 μM).

4. Discussion

Significant correlations between the total content of phenolics and TAC assayed by various methods have been reported by many authors (Table 2). In some cases, the correlation coefficients were lower than 0.8–0.99, indicating a greater contribution of other classes of compounds to the antioxidant capacity.

In this study of 18 diverse plant material extracts, the correlation coefficients between total phenolic content and TAC estimated by ABTS \bullet reduction, DPPH \bullet reduction, FRAP, and CUPRAC were 0.94, 0.78, 0.90, and 0.93, respectively (Table 1). These data confirm that phenolics are the main antioxidants in plant extracts; higher correlations are difficult to expect since plants contain also other antioxidant compounds.

Table 2. Reported correlation coefficients between various TAC assays of plant-derived products.

Correlation between Total Phenolic Content and:	Material	Correlation Coefficient r	Reference
TAC/DPPH• decolorization	Coffee	0.88	[39]
TAC/ABTS• decolorization	Coffee	0.82	[39]
TAC/Crocin bleaching	Sicilian wines	0.98	[40]
TAC/FRAP	<i>Millefiori</i> honeys	0.97	[41]
TAC/DPPH• decolorization	Slovenian honeys	0.93	[42]
TAC/FRAP	Slovenian honeys	0.97	[42]
TAC/DPPH• decolorization	European honeydew honeys	0.86	[43]
TAC/ABTS• decolorization	Extracts of 23 Bulgarian plants	0.92	[44]
TAC/ABTS• decolorization	Extracts of inflorescences and/or leaves of seven <i>Sorbus</i> species	0.80	[45]
TAC/DPPH• decolorization	Extracts of inflorescences and/or leaves of seven <i>Sorbus</i> species	0.74	[45]
TAC/FRAP	Extracts of inflorescences and/or leaves of seven <i>Sorbus</i> species	0.65	[45]
TAC/DPPH• decolorization	Extracts of grape seeds	0.99	[46]
TAC/FRAP	Extracts of various parts of four Amazonian plants	0.80	[47]
TAC/ABTS• decolorization	Extracts of oak wood used in wine aging	0.95	[48]
TAC/DPPH• decolorization	Extracts of oak wood used in wine aging	0.97	[48]
TAC/FRAP	Extracts of oak wood used in wine aging	0.96	[48]
TAC/DPPH• decolorization	Chosen Côte d'Ivoire plants	0.97	[49]
TAC/ABTS• decolorization,	Various persimmon genotypes	0.91	[50]
TAC/DPPH• decolorization	Various persimmon genotypes	0.96	[50]
TAC/FRAP	Various persimmon genotypes	0.97	[50]
TAC/ABTS• decolorization	Nine tomato varieties	0.42	[51]
TAC/DPPH• decolorization	Green peppers	0.84	[52]
TAC/DPPH• decolorization	Red peppers	0.59	[52]

Oxidation of phenolics in plant extracts, not counteracted by antioxidant enzymes, generates eventually hydrogen peroxide as a product of oxygen reduction. It could be expected that the production of hydrogen peroxide would reflect the phenolic content of the extracts and negatively mirror their antioxidant activity. This was not the case; the correlation between the phenolic content and H₂O₂ concentration estimated after 1 h incubation was even negative. A statistically significant but negative correlation existed between the content of phenolics and the difference between H₂O₂ concentration at 1 h and at “zero time” ($r = -0.61$). Not only phenolics, but also e.g., ascorbate, generate hydrogen peroxide upon autoxidation [3]; nevertheless, they also contribute to the antioxidant activity, which, despite it, well correlated with the phenolic content. Interestingly, for many extracts, a decrease in the hydrogen peroxide concentration during 1 h incubation was found (Figure 2).

These data, especially the decrease in H₂O₂ concentration during incubation of extracts of plant materials, can be explained by assuming that phenolics not only generate but also consume hydrogen peroxide. To shed light on this question, we studied hydrogen peroxide generation and scavenging by three chosen polyphenols. The polyphenols are present in at least some of the extracts studied. Gallic acid is present in coffee in amounts of 2.5 mg–80 mg/100 g [53] or even 306–360 mg/100 g [54]. Coffee beans also contain quercetin (0.6–0.7 mg/100 g) [45]. Pyrogallol is also present in coffee and is the main contributor to the xanthine-oxidase-inhibiting activity of coffee extracts [55]. It is also present in tea and various plant extracts [56]. Quercetin is present in tea, coffee, and various other plant extracts [57]. Plant extracts contain also other components apart from phenolics, but the latter seem to be the main compounds reacting with hydrogen peroxide. It can be concluded on the basis of the presented data that the increase in the concentration of phenolics does not always lead to increased generation of hydrogen peroxide and the concentration of hydrogen peroxide does not always increase with time.

Although the generation of hydrogen peroxide in extracts of plant material, especially tea and coffee, has been convincingly demonstrated [1–7], it should be concluded that the concentrations of hydrogen peroxide measured in these extracts is a net result of the rate of its production and consumption, mainly by phenolic compounds. It has been shown that phenolics [58–62] and phenolic-rich materials such as rosemary extract [63], tea, and wine [64] generate hydrogen peroxide in cell culture media, which contributes to the cytotoxicity of these compounds/fluids under standard cell culture conditions. Under in vivo conditions, the oxygen concentration in most tissues is much lower, so phenolics oxidize at a slower rate or not at all, and the generated hydrogen peroxide is disposed of mainly by catalases, peroxidases, peroxiredoxins, and small-molecular-weight antioxidants. Therefore, their hydrogen-scavenging activity may predominate, and the production of hydrogen peroxide by these compounds should be treated mainly as an artifact of in vitro conditions.

Author Contributions: Conceptualization, K.K., G.B. and I.S.-B.; methodology, K.K., G.B. and I.S.-B.; software, K.K., P.F. and I.S.-B.; validation, P.F. and I.S.-B.; investigation, K.K., A.T. and I.S.-B.; writing—original draft preparation, K.K., G.B. and I.S.-B.; writing—review and editing, I.S.-B. and G.B.; supervision, I.S.-B.; project administration, I.S.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Data are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We are indebted to Edyta Bieszczad-Bedrejczuk (Laboratory of Analytical Biochemistry, University of Rzeszów) for the excellent technical help.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Akagawa, M.; Shigemitsu, T.; Suyama, K. Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2632–2640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Arakawa, H.; Maeda, M.; Okubo, S.; Shimamura, T. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 277–281. [[CrossRef](#)]
3. Grzesik, M.; Bartosz, G.; Stefaniuk, I.; Pichla, M.; Namieśnik, J.; Sadowska-Bartos, I. Dietary antioxidants as a source of hydrogen peroxide. *Food Chem.* **2019**, *278*, 692–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Long, L.H.; Lan, A.N.B.; Hsuan, F.T.Y.; Halliwell, B. Generation of hydrogen peroxide by “antioxidant” beverages and the effect of milk addition. Is cocoa the best beverage? *Free Radic. Res.* **1999**, *31*, 67–71. [[CrossRef](#)]
5. Fujita, Y.; Wakabayashi, K.; Nagao, M.; Sugimura, T. Implication of hydrogen peroxide in the mutagenicity of coffee. *Mutat. Res. Lett.* **1985**, *144*, 227–230. [[CrossRef](#)]
6. Nagao, M.; Fujita, Y.; Wakabayashi, K.; Nukaya, H.; Kosuge, T.; Sugimura, T. Mutagens in coffee and other beverages. *Environ. Health Perspect.* **1986**, *67*, 89–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Tsiju, S.; Shibata, T.; Ohara, K.; Okada, N.; Ito, Y. Studies on the factors affecting the formation of hydrogen peroxide in coffee. *Food Hyg. Saf. Sci. (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)* **1991**, *32*, 504–512.
8. Tama, A.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartos, I. Is hydrogen peroxide generated in wine? *Food Biosci.* **2022**, *45*, 101487. [[CrossRef](#)]
9. Bartosz, G.; Rajzer, K.; Grzesik-Pietrasiewicz, M.; Sadowska-Bartos, I. Hydrogen peroxide is formed upon cooking of vegetables. *Acta Biochim. Pol.* **2022**, *69*, 471–474. [[CrossRef](#)]
10. Bartosz, G.; Baran, S.; Grzesik-Pietrasiewicz, M.; Sadowska-Bartos, I. The Antioxidant capacity and hydrogen peroxide formation by black and orange carrots: Black and orange carrots. *Agric. Food Sci.* **2022**, *31*, 71–77. [[CrossRef](#)]
11. Tama, A.; Pieńkowska, N.; Stefaniuk, I.; Bartosz, G.; Kapusta, I.; Sadowska-Bartos, I. Is hydrogen peroxide generated in infusions of medicinal herbs? *Processes* **2023**, *11*, 2855. [[CrossRef](#)]
12. Brudzynski, K. A current perspective on hydrogen peroxide production in honey. A review. *Food Chem.* **2020**, *332*, 127229. [[CrossRef](#)]
13. Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3396–3402. [[CrossRef](#)]
14. Bors, W.; Michel, C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *957*, 57–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Martins, N.; Barros, L.; Ferreira, I.C. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *48*, 1–12. [[CrossRef](#)]

16. Faller, A.; Fialho, E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *J. Food Compos. Anal.* **2010**, *23*, 561–568. [[CrossRef](#)]
17. Gündeşli, M.A.; Korkmaz, N.; Okatan, V. Polyphenol content and antioxidant capacity of berries: A review. *Int. J. Agric. For. Life Sci.* **2019**, *3*, 350–361.
18. Liu, H.; Qiu, N.; Ding, H.; Yao, R. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 363–370. [[CrossRef](#)]
19. Kirsch, M.; De Groot, H. NAD (P) H, a directly operating antioxidant? *FASEB J.* **2001**, *15*, 1569–1574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Zhou, B.; Wu, L.-M.; Yang, L.; Liu, Z.-L. Evidence for α -tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 78–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Mochizuki, M.; Yamazaki, S.-I.; Kano, K.; Ikeda, T. Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Sub.* **2002**, *1569*, 35–44. [[CrossRef](#)]
22. Geng, Y.; Liu, X.; Yu, Y.; Li, W.; Mou, Y.; Chen, F.; Hu, X.; Ji, J.; Ma, L. From polyphenol to o-quinone: Occurrence, significance, and intervention strategies in foods and health implications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2023**, *22*, 3254–3291. [[CrossRef](#)]
23. Sang, S.; Yang, I.; Buckley, B.; Ho, C.-T.; Yang, C.S. Autoxidative quinone formation in vitro and metabolite formation in vivo from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: Studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 362–371. [[CrossRef](#)]
24. Wagner, M.; Nicell, J.A. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.* **2002**, *36*, 4041–4052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yvonne, O.; Driss, F.; Dang, P.M.-C.; Elbim, C.; Gougerot-Pocidallo, M.-A.; Pasquier, C.; El-Benna, J. Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: Scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2003–2008.
26. Eskandari, M.; Rembiesa, J.; Startaitè, L.; Holfors, A.; Valančiūtė, A.; Faridbod, F.; Ganjali, M.R.; Engblom, J.; Ruzgas, T. Polyphenol-hydrogen peroxide reactions in skin: In vitro model relevant to study ROS reactions at inflammation. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1075*, 91–97. [[CrossRef](#)]
27. Sroka, Z.; Fecka, I.; Cisowski, W. Antiradical and anti-H₂O₂ properties of polyphenolic compounds from an aqueous peppermint extract. *Z. Nat. C* **2005**, *60*, 826–832. [[CrossRef](#)]
28. Sroka, Z.; Cisowski, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 753–758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Özyürek, M.; Bektaşoğlu, B.; Güçlü, K.; Güngör, N.; Apak, R. A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology. *J. Food Compos. Anal.* **2010**, *23*, 689–698. [[CrossRef](#)]
30. Mansouri, A.; Makris, D.P.; Kefalas, P. Determination of hydrogen peroxide scavenging activity of cinnamic and benzoic acids employing a highly sensitive peroxyoxalate chemiluminescence-based assay: Structure–activity relationships. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 22–26. [[CrossRef](#)]
31. Ma, X.; Li, H.; Dong, J.; Qian, W. Determination of hydrogen peroxide scavenging activity of phenolic acids by employing gold nanoshells precursor composites as nanoprobess. *Food Chem.* **2011**, *126*, 698–704. [[CrossRef](#)]
32. Kılıçgün, H.; Altın, D. Correlation between antioxidant effect mechanisms and polyphenol content of *Rosa canina*. *Pharmacogn. Mag.* **2010**, *6*, 238–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fu, L.; Xu, B.-T.; Gan, R.-Y.; Zhang, Y.; Xu, X.-R.; Xia, E.-Q.; Li, H.-B. Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2112–2124. [[CrossRef](#)]
34. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kut, K.; Cieniek, B.; Stefaniuk, I.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartos, I. A modification of the ABTS• decolorization method and an insight into its mechanism. *Processes* **2022**, *10*, 1288. [[CrossRef](#)]
36. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[CrossRef](#)]
37. Özyürek, M.; Güçlü, K.; Tütem, E.; Başkan, K.S.; Erçağ, E.; Çelik, S.E.; Baki, S.; Yıldız, L.; Karaman, Ş.; Apak, R. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal. Methods* **2011**, *3*, 2439–2453. [[CrossRef](#)]
38. Gay, C.A.; Gebicki, J.M. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric–xylenol orange method. *Anal. Biochem.* **2003**, *315*, 29–35. [[CrossRef](#)]
39. Vignoli, J.; Bassoli, D.; Benassi, M.D.T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chem.* **2011**, *124*, 863–868. [[CrossRef](#)]
40. Di Majo, D.; La Guardia, M.; Giammanco, S.; La Neve, L.; Giammanco, M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chem.* **2008**, *111*, 45–49. [[CrossRef](#)]
41. Blasa, M.; Candiracci, M.; Accorsi, A.; Piacentini, M.P.; Albertini, M.C.; Piatti, E. Raw *Millefiori* honey is packed full of antioxidants. *Food Chem.* **2006**, *97*, 217–222. [[CrossRef](#)]
42. Bertonecelj, J.; Doberšek, U.; Jamnik, M.; Golob, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* **2007**, *105*, 822–828. [[CrossRef](#)]

43. Vasić, V.; Gašić, U.; Stanković, D.; Lušić, D.; Vukić-Lušić, D.; Milojković-Opsenica, D.; Tešić, Ž.; Trifković, J. Towards better quality criteria of European honeydew honey: Phenolic profile and antioxidant capacity. *Food Chem.* **2019**, *274*, 629–641. [[CrossRef](#)]
44. Kiselova, Y.; Ivanova, D.; Chervenkov, T.; Gerova, D.; Galunska, B.; Yankova, T. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 961–965. [[CrossRef](#)]
45. Olszewska, M.A.; Presler, A.; Michel, P. Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of dry extracts from the selected *Sorbus* species. *Molecules* **2012**, *17*, 3093–3113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bucić-Kojić, A.; Planinić, M.; Tomas, S.; Jakobek, L.; Šeruga, M. Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44*, 2394–2401. [[CrossRef](#)]
47. Souza, J.N.; Silva, E.M.; Loir, A.; Rees, J.F.; Rogez, H.; Larondelle, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. *Food Chem.* **2008**, *106*, 331–339. [[CrossRef](#)]
48. Alañón, M.E.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M.C.; Gordon, M.H.; Pérez-Coello, M.S. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chem.* **2011**, *128*, 997–1002. [[CrossRef](#)]
49. Konan, Y.; Witabouna, K.M.; Bassirou, B.; Kagoyire, K. Antioxidant activity and total phenolic content of nine plants from Côte d'Ivoire (West Africa). *J. Appl. Pharm. Sci.* **2014**, *4*, 036–041.
50. Pu, F.; Ren, X.-L.; Zhang, X.-P. Phenolic compounds and antioxidant activity in fruits of six *Diospyros kaki* genotypes. *Eur. Food Res. Technol.* **2013**, *237*, 923–932. [[CrossRef](#)]
51. Martínez-Valverde, I.; Periago, M.J.; Provan, G.; Chesson, A. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 323–330. [[CrossRef](#)]
52. Materska, M.; Perucka, I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1750–1756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kreicbergs, V.; Dimins, F.; Mikelson, V.; Cinkmanis, I. Biologically active compounds in roasted coffee. In Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT, Jelgava, Latvia, 5–6 May 2011; pp. 110–115.
54. López-Barrera, D.M.; Vázquez-Sánchez, K.; Loarca-Piña, M.G.F.; Campos-Vega, R. Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. *Food Chem.* **2016**, *212*, 282–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Honda, S.; Masuda, T. Identification of pyrogallol in the ethyl acetate-soluble part of coffee as the main contributor to its xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 7743–7749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Gupta, A.; Jeyakumar, E.; Lawrence, R. Pyrogallol: A competent therapeutic agent of the future. *Biotechnol. Environ. Sci.* **2021**, *23*, 213–217.
57. Singh, P.; Arif, Y.; Bajguz, A.; Hayat, S. The role of quercetin in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2021**, *166*, 10–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Bellion, P.; Olk, M.; Will, F.; Dietrich, H.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Janzowski, C. Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1226–1236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Long, L.H.; Hoi, A.; Halliwell, B. Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *501*, 162–169. [[CrossRef](#)]
60. Mu, K.; Kitts, D.D. Hydrogen peroxide produced from selective phenolic acids in cell culture underlies Caco-2 changes in cell proliferation parameters. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71*, 3022–3032. [[CrossRef](#)]
61. Long, L.H.; Clement, M.V.; Halliwell, B. Artifacts in cell culture: Rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (–)-epigallocatechin, (–)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *273*, 50–53. [[CrossRef](#)]
62. Suh, K.S.; Chon, S.; Oh, S.; Kim, S.W.; Kim, J.-W.; Kim, Y.S.; Woo, J.-T. Prooxidative effects of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line. *Cell Biol. Toxicol.* **2010**, *26*, 189–199. [[CrossRef](#)]
63. Valdés, A.; García-Cañas, V.; Koçak, E.; Simó, C.; Cifuentes, A. Foodomics study on the effects of extracellular production of hydrogen peroxide by rosemary polyphenols on the anti-proliferative activity of rosemary polyphenols against HT-29 cells. *Electrophoresis* **2016**, *37*, 1795–1804. [[CrossRef](#)]
64. Chai, P.C.; Long, L.H.; Halliwell, B. Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 650–654. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Denaturation and Digestion Increase the Antioxidant Capacity of Proteins

Kacper Kut ¹, Grzegorz Bartosz ² and Izabela Sadowska-Bartosz ^{1,*}

¹ Laboratory of Analytical Biochemistry, Institute of Food Technology and Nutrition, College of Natural Sciences, University of Rzeszow, 4 Zelwerowicza St., 35-601 Rzeszow, Poland; kkut@ur.edu.pl

² Department of Bioenergetics, Food Analysis and Microbiology, Institute of Food Technology and Nutrition, College of Natural Sciences, University of Rzeszow, 4 Zelwerowicza St., 35-601 Rzeszow, Poland; gbartosz@ur.edu.pl

* Correspondence: isadowska@ur.edu.pl; Tel.: +48-17-7854408

Abstract: It has been estimated and demonstrated that the antioxidant capacity of proteins is increased as a result of digestion in the gastrointestinal tract, which can be contributed by denaturation and digestion. This study aimed to evaluate the effect of denaturation and proteolytic digestion on the antioxidant activity of bovine serum albumin (BSA) and chicken egg white proteins in model systems. Denaturation with an anionic detergent (sodium dodecyl sulfate) and digestion with papain and trypsin increased the antioxidant activity/capacity of the proteins, apparently due to the increased exposure of amino acid residues responsible for the antioxidant activity of proteins (tyrosine, tryptophan, cysteine, histidine, arginine, and cystine in the ABTS[•] decolorization assay; cysteine, tryptophan, tyrosine, and cystine in the FRAP assay). As the increase in the protein antioxidant activity/capacity was limited in extent, it does not invalidate the use of the antioxidant capacity of proteins to be consumed as a rough measure of their antioxidant capacity after modifications in the gastrointestinal tract.

Keywords: antioxidant capacity; bovine serum albumin; egg white proteins; denaturation; papain; protein; trypsin



Citation: Kut, K.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartosz, I. Denaturation and Digestion Increase the Antioxidant Capacity of Proteins. *Processes* **2023**, *11*, 1362. <https://doi.org/10.3390/pr11051362>

Academic Editors: Bonglee Kim and Chi-Fai Chau

Received: 31 March 2023

Revised: 26 April 2023

Accepted: 27 April 2023

Published: 29 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

There is a permanent interest in the antioxidant properties of food as the source of antioxidant vitamins and other exogenous antioxidants. Databases of the antioxidant capacities of various meals have been constructed to estimate the antioxidant intake [1–5]. One such database was made publicly available on the website of the United States Department of Agriculture but withdrawn since the reported values were misused by manufacturing companies when promoting their products, as well as by consumers misinterpreting them when choosing food and dietary supplements [6,7].

It is obvious, however, that the conditions of the assay of food antioxidant capacity may not fully correspond to the conditions in which antioxidant capacity is manifested in vivo. This statement refers especially to proteins, which are often subjected to denaturation during food preparation and denaturation as well as digestion in the gastrointestinal tract. Most studies have reported an increase in the antioxidant capacity of proteins as a result of simulated gastrointestinal digestion; however, the results are not always concordant. Various models of in vitro digestion are used to evaluate the effect of this process on the total antioxidant capacity (TAC) of food [8]. Release of antioxidant compounds from the food matrix may increase the TAC of plant food [9]. Simulated digestion was found to increase the availability and antioxidant capacity of Maillard reaction products of breakfast cereals [10]. In vitro digestion was found to increase the TAC of cooked mushrooms [11]. However, polyphenols are highly sensitive to mildly alkaline conditions in the

small intestine, where most dietary polyphenols are degraded or transformed into other compounds, and, generally, the polyphenol-dependent total antioxidant capacity (TAC) of plant-derived food may decrease after simulated digestion [12,13]. In vitro digestion of the 36 most popular Brazilian foods increased the antioxidant capacity of cereals, legumes, vegetables, tuberous vegetables, chocolates, and fruits but reduced the TAC of beverages (red wine, coffee, and yerba mate), in which the phenolic components were not protected by the matrix against enzymatic action and alteration in pH during digestion [14]. The content of bioavailable phenolics was decreased by simulated gastrointestinal digestion when compared with fresh leaves of *Centella asiatica* [15]. The cellular antioxidant activity of feijoada, a traditional Brazilian plant-rich meal, was decreased after simulated digestion [16]. On the contrary, simulated gastrointestinal digestion augmented the antioxidant capacity of bovine whey proteins [17]. The antioxidant capacity of amaranth peptides was increased by 20–25% after simulated gastrointestinal digestion [18]. Simulated gastrointestinal digestion augmented the antioxidant capacity of the loach peptide by 5–77% (depending on the assay) [19]. Protease action on salmon byproduct protein from the pectoral fin increased the antioxidant capacity and generated peptides of high antioxidant activity [20]. Simulated digestion was reported to significantly increase the TAC of dairy products, which contributed up to 60% of the daily antioxidant capacity intake. Nevertheless, it was reported that most of the TAC (90–98%) was released from dairy products by microbial fermentation, simulating that taking place in the intestine [21]. For plant-derived food, the fraction of TAC released by fermentation was estimated to range from 80 to 98% [22]. In other words, TAC measured in the food to be consumed contributed only several percent to the TAC, which would be exhibited in the colon. However, this result is difficult to interpret because of the contribution of microbes and products of their metabolism to the TAC measured after food fermentation.

To avoid the ambiguity of results, this study aimed to examine the effect of processes simulating those occurring in the digestive system (denaturation and proteolytic digestion) of bovine serum albumin as a model protein and egg white as a protein-rich food on their antioxidant capacity in model systems to avoid complications arising from the interference of other factors in physiologically relevant situations.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

L-Arginine (CAS no. 74-79-3; cat. no. 11009, purity \geq 99.5%), ferric chloride hexahydrate (CAS no. 10025-77-1; cat. no. 236489, purity \geq 97%), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) (CAS no. 53188-07-1; cat. no. 238813, purity \geq 97%), L-lysine monohydrochloride (CAS no. 657-27-2; cat. no. L5626, purity \geq 98%), neocuproine (CAS no. 484-11-7; cat. no. N1501, purity \geq 98%), papain from papaya latex (CAS no. 9001-73-4; cat. no. P3125, highly purified by chromatography), sodium dodecyl sulfate (SDS) (CAS no. 151-21-3; cat. no. L4509, purity \geq 98.5%), 2,4,6-tri-(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (CAS no. 3682-35-7; cat. no. 93285, purity \geq 99%), cysteine (CAS no. 52-90-4; cat. no. 168149, purity \geq 97%), as well as trypsin (CAS no. 9002-07-7; cat. no. T1326, purity 99%) were purchased from Merck (Poznań), and L-Cystine (CAS no. 56-89-3; cat. no. 2/03/75, purity 99.9%) was obtained from Biomed (Lublin, Poland).

DL-Dithiothreitol (DTT) (CAS- no. 3483-12-3; cat. no. DTT001.5, purity \geq 99.5%), L-histidine (CAS no. 71-00-1; cat. no. HIS100.25, purity \geq 98.5%), phosphate-buffered saline (PBS; cat. no. PBS404.200), sodium phosphate monobasic (CAS no. 10049-21-5; cat. no. SPM306.500, purity 98–103%), and sodium phosphate dibasic (CAS no. 7782-85-6; cat. no. SPD579.1, purity 98–102%) were from LAB EMPIRE (Rzeszów, Poland).

Tryptophan (CAS no. 73-22-3; cat. no. 4858, purity \geq 98.5%) and tyrosine (CAS no. 60-18-4; cat. no. T207, purity \geq 99%) were purchased from Roth (Zielona Góra, Poland), and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (CAS no. 504-14-6; cat. no. 10102946001, purity $>$ 98%) were from Roche (Warsaw, Poland).

Ethanol (CAS no. 64-17-5; cat. no. 396480111, purity $\geq 99.8\%$), copper (II) sulfate pentahydrate (CAS no. 7758-99-8; cat. no. 658310422, purity $\geq 98\%$), and sodium acetate anhydrous (CAS no. 127-09-3; cat. no. BN60/6191, purity $\geq 99\%$) were from Avantor Performance Materials Poland (Gliwice, Poland). Acetic acid (CAS no. 64-19-7; cat. No. 425687339, purity 80%), hydrochloric acid (CAS no. 7647-01-0; cat. no. 115752837, 35–38%), hydrogen peroxide (CAS no. 7722-84-1; cat. no. 118851934, 30%), sodium nitrite (CAS no. 7632-00-0; cat. no. 792690115, purity $\geq 97.5\%$), and Tris-HCl (CAS no. 77-86-1; cat. no. 118534707, purity $\geq 99\%$) were provided by Chempur (Piekary Śląskie, Poland).

Albumin Fraction V (BSA) (CAS no. 9038-46-8; cat. no. A1391,0025, purity $\geq 97\%$) was bought from AppliChem (Darmstadt, Germany). β -Mercaptoethanol (BME) (CAS no. 60-24-2; cat. no. Z523A, 48.7%) was provided by Promega (Madison, WI, USA), and NaOH (CAS no. 1310-73-2; cat. no. 056992, purity $\geq 98\%$) was from Warchem (Warsaw, Poland). All other reagents, if not mentioned otherwise, were purchased from Merck (Poznan, Poland) and were of analytical grade. Distilled water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA).

Stock solutions of BSA were made in PBS. The chicken egg white was diluted 10 times with PBS.

Transparent flat-bottom 96-well plates (Greiner, Kremsmünster, Austria) were used for the assays. Absorptometric measurements were conducted in a Spark multimode microplate reader (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland).

2.2. ABTS[•] Decolorization Assay

The assay was conducted as described previously [23]. Briefly, aliquots of the amino acids or protein solutions containing increasing amounts of the reactants were added to wells of a 96-well plate containing 200 μ L of ABTS[•] solution diluted with PBS so as to provide absorbance of 1.0 at 734 nm in a plate reader. The decrease in absorbance was read after 30 min of incubation at ambient temperature. Antioxidant activity/capacity was calculated using the formula:

$$\text{Antioxidant activity} = (\text{slope of dependence of absorbance change on the amount of tested compound}) / (\text{slope of dependence of absorbance change on the amount of Trolox}) \quad (1)$$

and expressed in moles of Trolox equivalents (TEs) per mole of amino acid or gram of BSA or mL of non-diluted egg white [23]. The term “antioxidant activity” is used consequently in this paper with respect to a defined compound and “antioxidant capacity” with respect to a complex material containing antioxidants [24], such as egg white.

2.3. FRAP Assay

The assay was performed according to a modified procedure of Benzie and Strain [25]. In brief, aliquots of the amino acids or protein solutions containing increasing amounts of the reactant were added to wells of a 96-well plate containing 200 μ L of the working solution, freshly prepared by mixing ten volumes of 0.3 M acetate buffer, pH 3.6, one volume of 10 mM TPTZ in 40 mM HCl, and one volume of 20 mM FeCl₃. After 30 min incubation at ambient temperature, absorbance was measured at 593 nm against a reagent blank. Antioxidant activity was calculated and expressed in TEs as above [23]. Protein-containing samples became slightly turbid after their addition to the working solution, so they were centrifuged before the measurements.

2.4. CUPRAC Assay

A modification of the procedure of Özyürek et al. [26] was used. Briefly, 50 μ L of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, were mixed with 50 μ L of 10 mM CuSO₄, 50 μ L of 7.5 mM neocuproin solution in ethanol and 50 μ L of PBS containing increasing amounts of amino acids. After 60 min incubation at ambient temperature, absorbance was measured at 450 nm against a reagent blank. Antioxidant activity was calculated and expressed in TEs

as above. It was not possible to use the CUPRAC assay to determine the protein antioxidant activity/capacity since significant protein precipitation was observed, apparently due to the high ethanol concentration in the samples.

2.5. Protein Denaturation

BSA (500 µg/mL) in PBS (9 volumes) was added with 1 volume of 5% SDS and compared with BSA solution added with deionized water in the same proportion. Egg white diluted 10× with PBS was treated in the same manner.

2.6. Protein Digestion

BSA solution in PBS (10 mg/mL) and egg white diluted 10× with PBS were added with papain (2 mg/mL) and incubated at 37 °C for 24 h. In parallel, control samples containing no papain and papain alone (2 mg/mL PBS) were incubated. Alternatively, 9 volumes of BSA solution in PBS (5 mg/mL) were added with 1 volume of 0.05% trypsin (or PBS for control preparations) and incubated at 37 °C for 3 h. Then, the protein antioxidant activity/capacity was measured. The antioxidant activity of papain or trypsin was subtracted from that of protein digested with papain or trypsin, respectively.

2.7. Statistics

All measurements were performed at least in triplicate and repeated at least three times on different preparations. As the dependencies of absorbance changes on the concentration of amino acids were linear, the slopes were calculated with the REGLINP function (Excel). For proteins, the linear portions of these dependencies were used for the calculation of antioxidant activity/capacity. The error of antioxidant activity/capacity was calculated from errors of the slopes of dependences of absorbance changes on the amount for amino acids/proteins and for Trolox using the total differential method: error of antioxidant activity = $[(\text{error of slope}_{\text{amino acid or protein}})^2 + (\text{error of slope}_{\text{Trolox}})^2]^{1/2}$. Statistical significance of differences was evaluated using the two-tailed Student's t-test (Excel).

3. Results

3.1. Amino Acids Contributing to the Antioxidant Activity/Capacity of Proteins

The antioxidant activity of a protein molecule and the antioxidant capacity of protein mixtures are conditioned by the reactivity of only some amino acid residues. Six amino acids showed reactivity in the ABTS• decolorization assay: Tyr > Trp > Cys > His > Arg > cystine. Other amino acids, including Met, did not exhibit any detectable reactivity. In the FRAP assay, three amino acids were reactive: Cys > Trp > Tyr; cystine showed very weak antioxidant activity. In the CUPRAC assay, these three amino acids were also reactive, but the sequence of reactivity was different: Cys > Tyr > Trp (Table 1).

Table 1. Reactivity of amino acids in three assays of antioxidant activity.

Amino Acid/Assay	ABTS• Decolorization [mol TE/mol]	FRAP [mol TE/mol]	CUPRAC [mol TE/mol]
Cysteine	2.07 ± 0.24	0.725 ± 0.065	1.775 ± 0.110
Tyrosine	4.07 ± 0.86	0.260 ± 0.022	1.656 ± 0.215
Tryptophan	3.32 ± 0.52	0.385 ± 0.007	0.401 ± 0.042
Cystine	0.15 ± 0.02	0.045 ± 0.003	No reaction
Histidine	0.50 ± 0.10	No reaction	No reaction
Arginine	0.40 ± 0.04	No reaction	No reaction

Other amino acids were not reactive.

Therefore, the antioxidant activity/capacity of proteins depends on the accessibility of these amino acid residues to ABTS• or Fe³⁺ and Cu²⁺, respectively. In order to check whether this accessibility can be altered by protein digestion and denaturation, we com-

pared the antioxidant activity of BSA and the antioxidant capacity of egg white subjected to denaturation with SDS and digestion by trypsin and papain.

3.2. Effect of Denaturation on Protein Antioxidant Activity/Capacity

Protein denaturation by SDS caused an increase in the total antioxidant activity of BSA and the total antioxidant capacity of egg white in the ABTS[•] decolorization assay. The dependence of the extent of ABTS[•] reduction was not linear, showing saturation for the higher amounts of BSA/egg white, approaching the limit of ABTS[•] available for reduction. For both BSA and egg white, the increase in antioxidant activity was apparent, especially in the non-linear part of the plot (Figure 1). SDS alone did not react with ABTS[•] or with the FRAP reagent.

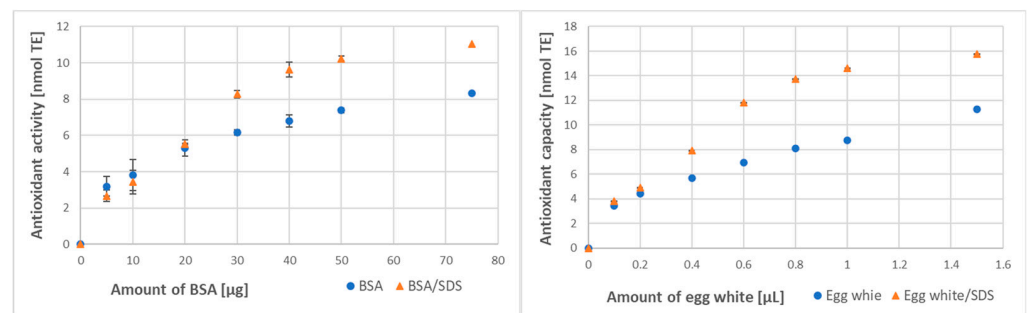


Figure 1. Effect of denaturation with SDS (0.5% final) on the antioxidant activity of bovine serum albumin (BSA) and antioxidant capacity of egg white assayed by ABTS[•] decolorization. In some cases, standard deviations were lower than the symbol size (also in other Figures).

The SDS-induced increase in the antioxidant activity of BSA and the antioxidant capacity of egg white was smaller in magnitude but still detectable for BSA and well visible for egg white in the FRAP assay (Figure 2).

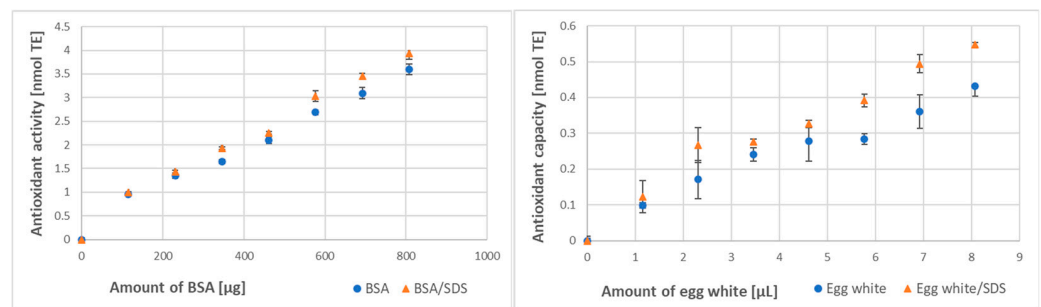


Figure 2. Effect of denaturation with SDS (0.5% final) on the antioxidant activity of BSA and antioxidant capacity of egg white assayed by the FRAP method.

3.3. Effect of Digestion on the Protein Antioxidant Activity/Capacity

Papain digestion brought about a significant increase in the antioxidant activity of BSA and, especially, in the antioxidant capacity of egg white (Figure 3).

The increases in the antioxidant activity of BSA and the antioxidant capacity of egg white treated with papain were also detectable in the FRAP assay. This effect was not visible only for the lowest concentration of BSA when subtraction of the antioxidant activity of papain brought the antioxidant activity of papain-treated BSA below the level of the control BSA (Figure 4). This result may be artefactual since self-digestion of papain may be more exhaustive and increase its own antioxidant activity more than in the presence of substrate excess.

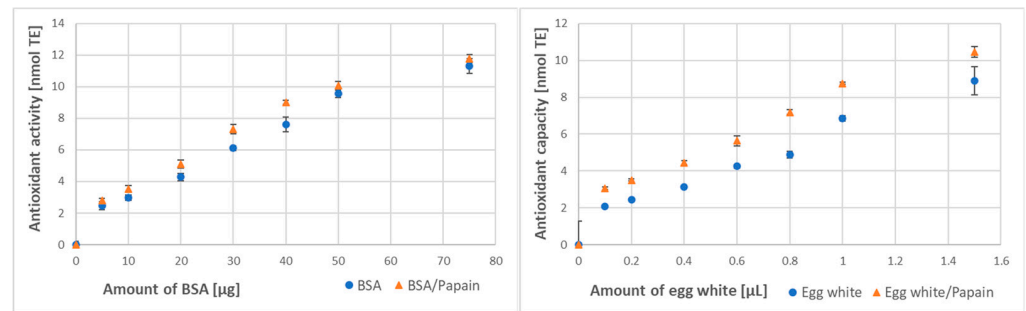


Figure 3. Effect of digestion with papain on the antioxidant activity of BSA and antioxidant capacity of egg white assayed by ABTS[•] decolorization.

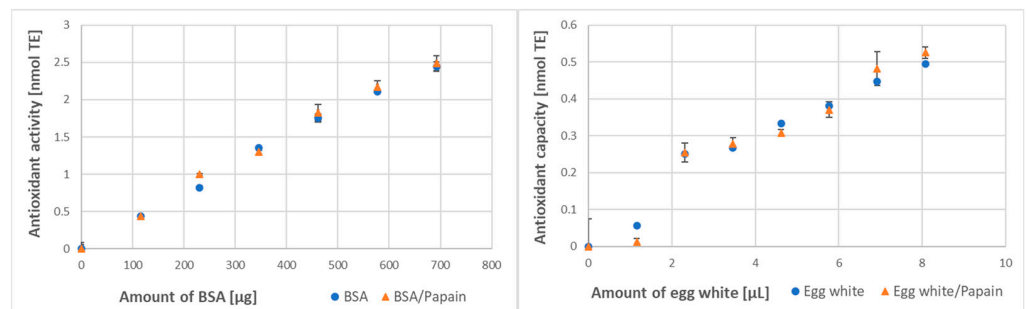


Figure 4. Effect of papain digestion on the antioxidant activity of BSA and antioxidant capacity of egg white assayed by the FRAP method.

Digestion with trypsin brought a similar effect, significantly increasing the antioxidant activity of BSA assayed by ABTS[•] decolorization. The augmentation of the antioxidant capacity of egg white proteins treated with trypsin was lower and detectable only for some amounts of egg white (Figure 5).

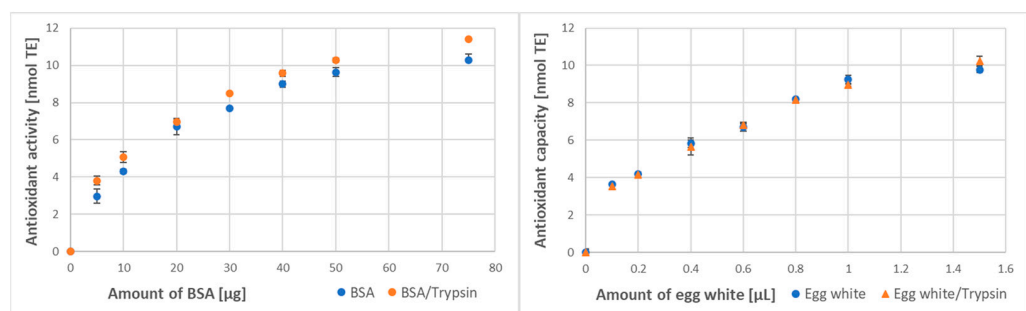


Figure 5. Effect of digestion with trypsin on the antioxidant activity of BSA and antioxidant capacity of egg white assayed by ABTS[•] decolorization.

The effect of detergent denaturation and proteolytic digestion on the antioxidant activity of BSA and the antioxidant capacity of chicken egg white is summarized in Table 2. The percent increase in the antioxidant activity/capacity was the highest in the case of SDS-induced denaturation, somewhat smaller for papain digestion, and the smallest for the case of trypsin digestion for both BSA and egg white. In the case of egg white, the increase induced by trypsin digestion did not reach the level of statistical significance.

Table 2. Effect of detergent denaturation and protease digestion on the antioxidant activity of BSA and antioxidant capacity of egg white.

Method of Assay	BSA Antioxidant Activity [μmol/g]		Egg White Antioxidant Capacity [μmol/mL]	
	Control	Treated	Control	Treated
ABTS• decolorization	174 ± 12	<i>SDS denaturation</i>	6.82 ± 0.09	11.39 ± 1.89 ***
		250 ± 23 ** (144%)		
FRAP	35.2 ± 2.6	40.8 ± 3.0 * (116%)	48.6 ± 4.5	63.1 ± 7.2 * (130%)
		<i>Papain digestion</i>		
ABTS• decolorization	173 ± 14	216 ± 10 * (125%)	6.91 ± 0.55	8.71 ± 0.86 * (126%)
		<i>Trypsin digestion</i>		
FRAP	36.7 ± 2.1	41.2 ± 1.8 * (112%)	46.3 ± 2.1	53.2 ± 1.5 * (115%)
		176 ± 11		

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ^{NS}, not significant

4. Discussion

One asset of this study is the indication of the contribution of individual amino acid residues to the antioxidant activity of proteins by analysis of the antioxidant activities of individual amino acids. These activities were different when estimated with different assays. The highest number of amino acids (tyrosine, tryptophan, cysteine, histidine, arginine, and cystine) showed reactivity in the ABTS• decolorization assay. Cysteine, tyrosine, and tryptophan were also reactive in two other assays; their activities were the highest in the ABTS decolorization assay and higher in the CUPRAC assay than in the FRAP assay. These differences in reactivity are apparently due to differences in the reaction mechanisms with various reagents and to pH differences (pH 3.6 in the FRAP assay, 7.0 in the CUPRAC assay, and 7.4 in the ABTS• assay). Interestingly, cystine showed some reactivity in the ABTS• decolorization assay and a trace reactivity in the FRAP assay, apparently due to ABTS•- and Fe³⁺-induced fission of the S-S bond and sulfur oxidation to sulfinic or sulfonic acids [27,28].

The antioxidant activities of reactive amino acids in the ABTS• decolorization and CUPRAC assays were higher than 1 with respect to Trolox. Trolox reacts with ABTS• in two one-electron steps, each Trolox molecule eventually consuming two ABTS• radicals [29,30]. Two consecutive one-electron reactions with ABTS• transform a reducing group in an antioxidant molecule into a stable oxidized form. If one such group in the antioxidant molecule reacts with ABTS• or Fe³⁺, the stoichiometry with respect to Trolox will be 1. Stoichiometry higher than 1 (with respect to Trolox) indicates more complex reactions and/or further reactivity of amino acid oxidation products with ABTS• or Cu²⁺. In the case of ABTS•, other reactions of the ABTS• radical, apart from reduction (addition, degradation, etc.), can also contribute to the increased stoichiometry of amino acids in the decolorization assay [30].

Results shown in Table 1 demonstrate that only some amino acid residues have antioxidant activity. Thus, only these amino acid residues determine the antioxidant activity of protein molecules. These residues may be not accessible for the reactions with ABTS• or Fe³⁺ if buried inside a native protein molecule. It is usually assumed that the thiol groups of cysteine are the main groups responsible for the antioxidant activity of proteins [31–33]. However, our results indicate that tyrosine and tryptophan residues (and, to a smaller extent, histidine, arginine, and cystine in the ABTS• decolorization assay) also contribute to the antioxidant activity of proteins. We employed 30 min incubation times in our assays (which are more relevant than shorter assay times for protein interactions in vivo). The relative contribution of various amino acid residues to protein antioxidant activity/capacity can be different for shorter assay times.

This study demonstrates the effects of defined treatments relevant to phenomena occurring during food digestion on the antioxidant activity of a model protein (BSA) and the antioxidant capacity of a protein-rich food (egg white).

The antioxidant activity of BSA estimated by our ABTS assay was about 170–180 $\mu\text{mol/g}$ (Table 2). Taking into account the amount of reactive amino acids in BSA (172 μmol Arg, 193 μmol His, 29 μmol Trp, 127 μmol Tyr [34], 15 μmol Cys, and 250 μmol cystine [35] per g BSA) and considering that only about 60% of the Cys residues are in the reduced state in BSA [36], and assuming antioxidant activities of amino acids shown in Table 1, the total antioxidant activity of BSA should be about 847 $\mu\text{mol/g}$. Thus, only a fraction of amino acid residues is available for ABTS $^{\bullet}$, and there is great room for an increase in the reactivity of BSA with ABTS $^{\bullet}$, as observed after denaturation with SDS and papain digestion. The total antioxidant activity of BSA calculated in the same way for the FRAP assay (about 66 $\mu\text{mol/g}$) is also higher than that determined experimentally. In this assay, the difference between the maximal and determined antioxidant activity is smaller; it may be due to the low pH of the assay, which causes BSA denaturation. A transition from the normal (N) form of the protein to the partly open, fast migrating (F) form occurs at a pH lower than 4.5 [37]. This transition can be expected to increase the accessibility of more reactive amino acid residues in the protein to Fe^{3+} . The denaturation of many proteins in the FRAP assay may account for lower effects of the procedures applied in this assay in comparison with the ABTS $^{\bullet}$ decolorization assay.

Protein denaturation can occur in the stomach due to low pH but also in the intestine due to the detergent action of bile acids [38]. SDS is a model anionic detergent binding not specifically to proteins and is used for the denaturation of proteins prior to polyacrylamide gel electrophoresis to enable their separation according to apparent molecular weight. Generally, proteins bind up to 1.4 g SDS/g; the binding is independent of ionic strength and primarily hydrophobic in nature [39]. The amounts of SDS used in this study corresponded to 1.0 g/g BSA and 0.51 g/g egg white protein, assuming the egg white protein content of 10.5% and density of 0.93 g/mL [40,41]. The onset of protein denaturation coincides with the critical micelle concentration (cmc) of SDS, which is in the range of several mM, depending on the concentration of SDS-binding proteins [42]. Below cmc, the detergent does not significantly modify the native protein conformation of BSA [43].

The binding of SDS in amounts close to saturating ones unfolds protein molecules due to electrostatic repulsion between negatively charged SDS molecules, eventually to rod-like structures exposing residues that may be not accessible in the native protein structure. Tyr and Trp residues, which contribute significantly to the antioxidant activity of proteins, are often buried inside the hydrophobic interior of protein globules, and unfolding of the molecules may make them accessible for ABTS $^{\bullet}$ or Fe^{3+} . Detergent-induced dissociation of protein complexes may expose reactive amino acid residues. However, extensive detergent binding can also limit the access of the reagents, decreasing the yield of the reaction, so the net effect of detergents on the antioxidant capacity of proteins is not easy to predict. Under the experimental conditions applied, SDS increased the antioxidant activity of BSA and the antioxidant capacity of egg white, apparently due to the unfolding of BSA and egg white proteins.

Similarly, the digestion of proteins may increase the accessibility of reactive amino acid residues if a protein molecule is fragmented. The increase in the antioxidant activity/capacity was more pronounced after the papain treatment than after the trypsin treatment. This is apparently due to the higher substrate specificity of trypsin than papain, enabling papain to hydrolyze more peptide bonds in protein molecules [43]. However, the fragments produced by proteolysis also adopt a conformation most favorable energetically, burying hydrophobic residues inside; therefore, the digestion-induced increase in antioxidant activity of proteins may be limited, as observed in the present study. Denaturation by low pH in the stomach or by heating may also decrease protein antioxidant capacity by the aggregate formation and decrease the protein solubility [44] and availability of redox-active amino acid residues. In agreement with this expectation, an increase in the egg white

antioxidant capacity after digestion with papain and papain+pancreatin, but not by boiling, was found by other authors [45].

5. Conclusions

This study points out that several amino acids are reactive in antioxidant activity assays: Tyr > Trp > Cys > His > Arg > cystine in the ABTS[•] decolorization assay and Cys > Trp > Tyr >> cystine in the FRAP assay; reactions of these amino acids determine the antioxidant activities of proteins. The results of this study demonstrate that both detergent-induced denaturation and proteolytic digestion increased the antioxidant activity of BSA and the antioxidant capacity of egg white, but the effects were limited in extent, being contained in the range of 5–67%.

Author Contributions: Conceptualization, I.S.-B. and G.B.; methodology K.K., G.B. and I.S.-B.; investigation, K.K. and I.S.-B.; validation, K.K., G.B. and I.S.-B.; writing—original draft preparation, K.K., G.B. and I.S.-B.; writing—review and editing, K.K., G.B. and I.S.-B.; supervision, I.S.-B.; project administration, I.S.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Data available on reasonable request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors are indebted to Edyta Bieszczad-Bedrejczuk, (Laboratory of Analytical Biochemistry, University of Rzeszów, Poland) for excellent technical help.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wu, X.; Gu, L.; Holden, J.; Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E.; Beecher, G.; Prior, R.L. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: A preliminary study. *J. Food Compos. Anal.* **2004**, *17*, 407–422. [[CrossRef](#)]
2. Carlsen, M.H.; Halvorsen, B.L.; Holte, K.; Bøhn, S.K.; Dragland, S.; Sampson, L.; Willey, C.; Senoo, H.; Umezono, Y.; Sanada, C.; et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr. J.* **2010**, *9*, 3. [[CrossRef](#)]
3. Pellegrini, N.; Vitaglione, P.; Granato, D.; Fogliano, V. Twenty-five years of total antioxidant capacity measurement of foods and biological fluids: Merits and limitations. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 5064–5078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Floegel, A.; Kim, D.O.; Chung, S.J.; Koo, S.I.; Chun, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 1043–1048. [[CrossRef](#)]
5. Floegel, A.; Kim, D.O.; Chung, S.J.; Song, W.O.; Fernandez, M.L.; Bruno, R.S.; Koo, S.I.; Chun, O.K. Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2010**, *61*, 600–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Pompella, A.; Sies, H.; Wacker, R.; Brouns, F.; Grune, T.; Biesalski, H.K.; Frank, J. The use of total antioxidant capacity as surrogate marker for food quality and its effect on health is to be discouraged. *Nutrition* **2014**, *30*, 791–793. [[CrossRef](#)]
7. Prior, R.L.; Wu, X. Diet Antioxidant Capacity: Relationships to Oxidative Stress and Health. *Am. J. Biomed. Sci.* **2013**, *5*, 126–139. [[CrossRef](#)]
8. Lucas-González, R.; Viuda-Martos, M.; Pérez-Alvarez, J.A.; Fernández-López, J. In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Res. Int.* **2018**, *107*, 423–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Rodríguez-Roque, M.J.; Rojas-Graü, M.A.; Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem.* **2013**, *136*, 206–212. [[CrossRef](#)]
10. Rufián-Henares, J.A.; Delgado-Andrade, C. Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 394–400. [[CrossRef](#)]
11. Ng, Z.X.; Rosman, N.F. In vitro digestion and domestic cooking improved the total antioxidant activity and carbohydrate-digestive enzymes inhibitory potential of selected edible mushrooms. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 865–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wojtunik-Kulesza, K.; Oniszczuk, A.; Oniszczuk, T.; Combrzyński, M.; Nowakowska, D.; Matwijczuk, A. Influence of In Vitro Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols-A Non-Systematic Review. *Nutrients* **2020**, *12*, 1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ketnawa, S.; Reginio, F.C., Jr.; Thuengtung, S.; Ogawa, Y. Changes in bioactive compounds and antioxidant activity of plant-based foods by gastrointestinal digestion: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 4684–4705. [[CrossRef](#)]
14. Koehnlein, E.A.; Koehnlein, É.M.; Corrêa, R.C.G.; Nishida, V.S.; Correa, V.G.; Bracht, A.; Peralta, R.M. Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity: Effects of a simulated gastrointestinal digestion. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2016**, *67*, 614–623. [[CrossRef](#)]

15. Gunathilake, K.D.P.P.; Ranaweera, K.K.D.S.; Rupasinghe, H.P.V. Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. *Food Chem.* **2018**, *245*, 371–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Faller, A.L.; Fialho, E.; Liu, R.H. Cellular antioxidant activity of feijoad whole meal coupled with an in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4826–4832. [[CrossRef](#)]
17. Corrochano, A.R.; Sariçay, Y.; Arranz, E.; Kelly, P.M.; Buckin, V.; Giblin, L. Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 54–67. [[CrossRef](#)]
18. Delgado, M.C.O.; Galleano, M.; Añón, M.C.; Tironi, V.A. Amaranth peptides from simulated gastrointestinal digestion: Antioxidant activity against reactive species. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2015**, *70*, 27–34. [[CrossRef](#)]
19. You, L.; Zhao, M.; Regenstein, J.M.; Ren, J. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem.* **2010**, *120*, 810–816. [[CrossRef](#)]
20. Ahn, C.B.; Kim, J.G.; Je, J.Y. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. *Food Chem.* **2014**, *147*, 78–83. [[CrossRef](#)]
21. Navajas-Porras, B.; Pérez-Burillo, S.; Valverde-Moya, Á.; Hinojosa-Nogueira, D.; Pastoriza, S.; Rufián-Henares, J.Á. Effect of Cooking Methods on the Antioxidant Capacity of Foods of Animal Origin Submitted to In Vitro Digestion-Fermentation. *Antioxidants* **2021**, *10*, 445. [[CrossRef](#)]
22. Navajas-Porras, B.; Pérez-Burillo, S.; Valverde-Moya, Á.J.; Hinojosa-Nogueira, D.; Pastoriza, S.; Rufián-Henares, J.Á. Effect of Cooking Methods on the Antioxidant Capacity of Plant Foods Submitted to In Vitro Digestion-Fermentation. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kut, K.; Cieniek, B.; Stefaniuk, I.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartosz, I. A Modification of the ABTS[•] Decolorization Method and an Insight into Its Mechanism. *Processes* **2022**, *10*, 1288. [[CrossRef](#)]
24. Bartosz, G. Total antioxidant capacity. *Adv. Clin. Chem.* **2003**, *37*, 219–292. [[PubMed](#)]
25. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[CrossRef](#)]
26. Özyürek, M.; Güçlü, K.; Tütem, E.; Başkan, K.S.; Erçağ, E.; Çelik, S.E.; Baki, S.; Leyla, Y.; Karaman, S.; Apak, R. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal. Meth.* **2011**, *3*, 2439–2453. [[CrossRef](#)]
27. Finley, J.W.; Wheeler, E.L.; Walker, H.G., Jr.; Finlayson, A.J. Effect of cystine oxidation on lysinoalanine formation in proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 818–820. [[CrossRef](#)]
28. Karimi, M.; Crossett, B.; Cordwell, S.J.; Pattison, D.I.; Davies, M.J. Characterization of disulfide (cystine) oxidation by HOCl in a model peptide: Evidence for oxygen addition, disulfide bond cleavage and adduct formation with thiols. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *154*, 62–74. [[CrossRef](#)]
29. Yi, H.; Cheng, Y.; Zhang, Y.; Xie, Q.; Yang, X. Potentiometric and UV-Vis spectrophotometric titrations for evaluation of the antioxidant capacity of chicoric acid. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 11876–11882. [[CrossRef](#)]
30. Ilyasov, I.R.; Beloborodov, V.L.; Selivanova, I.A.; Terekhov, R.P. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1131. [[CrossRef](#)]
31. Atanasiu, R.L.; Stea, D.; Mateescu, M.A.; Vergely, C.; Dalloz, F.; Briot, F.; Maupoil, V.; Nadeau, R.; Rochette, L. Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Mol. Cell. Biochem.* **1998**, *189*, 127–135. [[CrossRef](#)]
32. Roche, M.; Rondeau, P.; Singh, N.R.; Tarnus, E.; Bourdon, E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 1783–1787. [[CrossRef](#)]
33. Ghiselli, A.; Serafini, M.; Maiani, G.; Azzini, E.; Ferro-Luzzi, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 29–36. [[CrossRef](#)]
34. Cui, J.; Chong, B.; Rutherford, S.M.; Wilkinson, B.; Singh, H.; Moughan, P.J. Gross and true ileal digestible amino acid contents of several animal body proteins and their hydrolysates. *Meat Sci.* **2013**, *94*, 349–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Siriwardana, K.; Wang, A.; Gadogbe, M.; Collier, W.E.; Fitzkee, N.C.; Zhang, D. Studying the effects of cysteine residues on protein interactions with silver nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 2910–2916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Simpson, R.B.; Saroff, H.A. Decrease in Sulfhydryl Titer of Serum Albumin. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 2129–2131. [[CrossRef](#)]
37. Michnik, A.; Michalik, K.; Drzazga, Z. Stability of bovine serum albumin at different pH. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2005**, *80*, 399–406. [[CrossRef](#)]
38. Robic, S.; Linscott, K.B.; Aseem, M.; Humphreys, E.A.; McCartha, S.R. Bile acids as modulators of enzyme activity and stability. *Protein J.* **2011**, *30*, 539–545. [[CrossRef](#)]
39. Reynolds, J.A.; Tanford, C. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *66*, 1002–1007. [[CrossRef](#)]
40. Mann, K. The chicken egg white proteome. *Proteomics* **2007**, *7*, 3558–3568. [[CrossRef](#)]
41. Dong, X.; Zhang, Y.Q. An insight on egg white: From most common functional food to biomaterial application. *J. Biomed. Materials Res. B Appl. Biomater.* **2021**, *109*, 1045–1058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Nielsen, M.M.; Andersen, K.K.; Westh, P.; Otzen, D.E. Unfolding of beta-sheet proteins in SDS. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 674–685. [[CrossRef](#)]
43. van der Hoorn, R.A. Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 191–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Santos, S.F.; Zanette, D.; Fischer, H.; Itri, R. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *J. Coll. Interface Sci.* **2003**, *262*, 400–408. [[CrossRef](#)]
45. Rao, P.S.; Nolasco, E.; Handa, A.; Naldrett, M.J.; Alvarez, S.; Majumder, K. Effect of pH and Heat Treatment on the Antioxidant Activity of Egg White Protein-Derived Peptides after Simulated In-Vitro Gastrointestinal Digestion. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Article

Formation of a Purple Product upon the Reaction of ABTS Radicals with Proteins

Kacper Kut ¹, Ireneusz Stefaniuk ², Grzegorz Bartosz ³ and Izabela Sadowska-Bartosz ^{1,*}

¹ Laboratory of Analytical Biochemistry, Institute of Food Technology and Nutrition, College of Natural Sciences, University of Rzeszow, 4 Zelwerowicza Street, 35-601 Rzeszow, Poland; kkut@ur.edu.pl

² Institute of Materials Engineering, College of Natural Sciences, University of Rzeszow, 1 Pignonia Street, 35-310 Rzeszow, Poland; istefaniuk@ur.edu.pl

³ Department of Bioenergetics, Food Analysis and Microbiology, Institute of Food Technology and Nutrition, College of Natural Sciences, University of Rzeszow, 4 Zelwerowicza Street, 35-601 Rzeszow, Poland; gbartosz@ur.edu.pl

* Correspondence: isadowska@ur.edu.pl; Tel.: +48-17-7855408

Abstract: The reaction of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) free radical (ABTS[•]) with proteins (bovine serum albumin, blood plasma, egg white, erythrocyte membranes, and Bacto Peptone) leads not only to a reduction of ABTS[•] but also to the appearance of a purple color (absorption maximum at 550–560 nm). The aim of this study was to characterize the formation and explain the nature of the product responsible for the appearance of this color. The purple color co-precipitated with protein, and was diminished by reducing agents. A similar color was generated by tyrosine upon reaction with ABTS[•]. The most feasible explanation for the color formation is the addition of ABTS[•] to proteins' tyrosine residues. The product formation was decreased by nitration of the bovine serum albumin (BSA) tyrosine residues. The formation of the purple product of tyrosine was optimal at pH 6.5. A decrease in pH induced a bathochromic shift of the spectra of the product. The product was not a free radical, as demonstrated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Another byproduct of the reaction of ABTS[•] with tyrosine and proteins was dityrosine. These byproducts can contribute to the non-stoichiometry of the antioxidant assays with ABTS[•]. The formation of the purple ABTS adduct may be a useful index of radical addition reactions of protein tyrosine residues.

Keywords: BSA; tyrosyl radical; tyrosine adduct; ABTS; free radical; protein



Citation: Kut, K.; Stefaniuk, I.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartosz, I. Formation of a Purple Product upon the Reaction of ABTS Radicals with Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8912. <https://doi.org/10.3390/ijms24108912>

Academic Editor: Clemente Capasso

Received: 30 April 2023

Revised: 13 May 2023

Accepted: 15 May 2023

Published: 17 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The assay of decolorization of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radical (ABTS[•] decolorization assay) is one of the most popular methods of estimating the antioxidant capacity of food, plant extracts, and biological fluids, as well as the antioxidant activity of individual compounds [1–5]. This assay is based on one-electron reactions of reduction of the ABTS radical (ABTS[•]) by antioxidant compounds present in a sample. The assay is performed under conditions of ABTS[•] excess, so a fraction of ABTS[•] always remains after the measurement, enabling a precise measurement of the amount of ABTS[•] reduced by a known amount of the tested material. The tacit assumption of the assay is that the decolorization of ABTS[•] is entirely due to its reduction by antioxidants, and thus quantitatively reflects the amount of antioxidants present in a sample [1,2,6,7]. However, the reactions of the ABTS[•] radical may be more complex even in this simple assay, and various concurrent reaction pathways may complicate its stoichiometry [8].

Incidentally, when measuring the antioxidant capacity of protein samples, we noticed the appearance of a purple color in samples left after the assay. This color formation must be a reflection of a reaction of the ABTS[•] radical, normally escaping detection during the assay due to the presence of residual ABTS[•]. As the decolorization of ABTS[•] by proteins

proceeds for a long time (>1 h) [3], eventually all ABTS[•] may be reduced and the purple color becomes evident. The aim of this study was a description of this phenomenon and an explanation of the mechanism of color formation.

2. Results

The purple color of the samples containing BSA and ABTS[•] became evident when the protein content was equal to or higher than needed for the total reduction of the ABTS[•] present in the sample. The absorption spectrum of the purple product of the reaction was completely different from that of ABTS[•], and had a maximum of 550–560 nm (Figure 1).

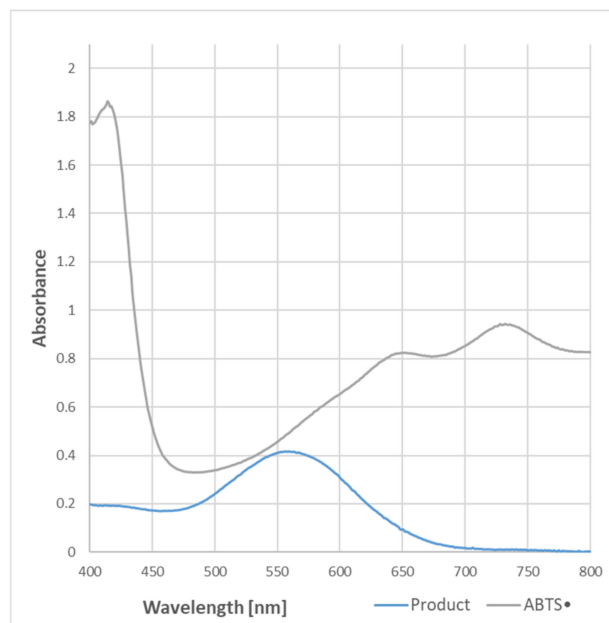


Figure 1. Spectra of ABTS[•] and the purple product of the reaction of ABTS[•] (107 μ M) with BSA (750 μ g/mL) in PBS. Reaction time: 2 h.

In order to check whether the formation of the purple product occurs in parallel to the ABTS[•] reduction, the dependence of the purple product formation on the amount of ABTS[•] was followed. As ABTS[•] also absorbs at 550 nm (the ratio of absorbance at 550 nm and 734 nm was 0.468), the contribution of ABTS[•] absorbance was subtracted. The dependence of the absorbance of ABTS[•] and the corrected absorbance of the purple product on the concentration of ABTS[•] in the sample is shown in Figure 2. These data evidence that the purple product is formed in parallel to the ABTS[•] reduction, although it does not significantly affect the readings of the assay since it weakly absorbs at the wavelength employed in the assay (734 nm) (Figure 1).

No purple product formation was observed upon the prolonged incubation of BSA with ABTS (non-radical form of the compound, the substrate for the preparation of ABTS[•]).

The formation of the purple product was also observed upon the reaction of ABTS[•] with protein-rich samples such as human blood plasma, egg white, Bacto Peptone, and erythrocyte membranes. The dependence of the amount of the product formed by 1.63 mM ABTS[•] on the protein concentration showed a saturation starting from about 0.2 mg/mL BSA and egg white protein, and about 0.4 mg/mL Bacto Peptone blood plasma protein (final concentrations) (Figure 3).

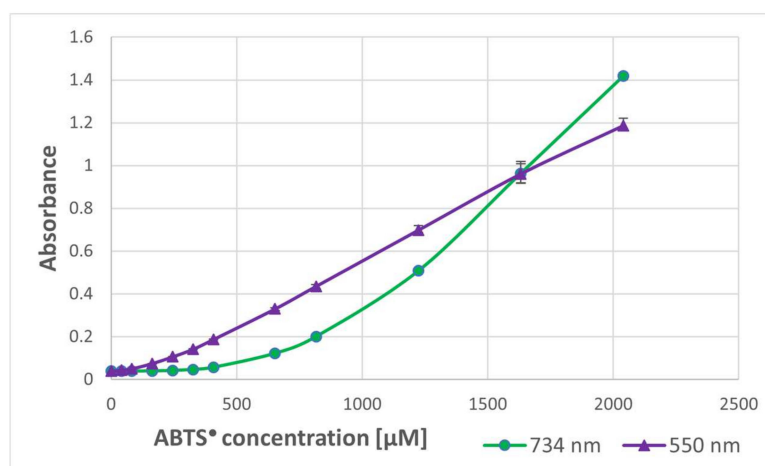


Figure 2. Dependence of the absorbance of the purple product (550 nm) of BSA and ABTS[•] on the (final) concentration of ABTS[•]. BSA: 10 mg/mL of PBS. Reaction time: 1 h.

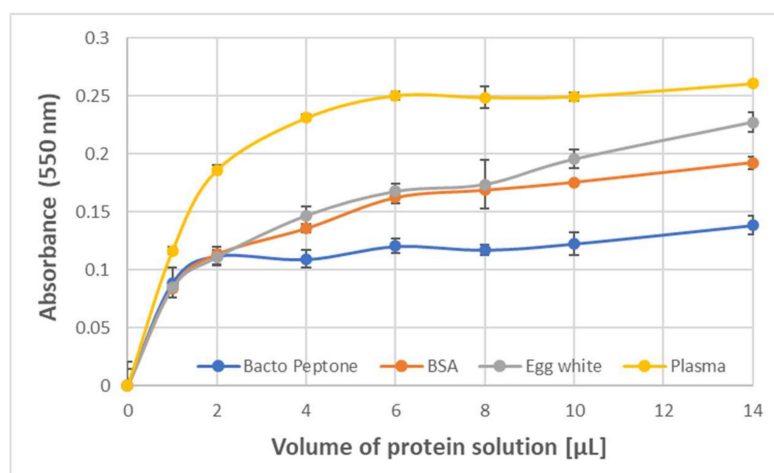


Figure 3. Dependence of the absorbance of the purple product (550 nm) of BSA and ABTS[•] on the volume of the solution of protein or protein-containing substrate. Bacto Peptone: 20 mg/mL; BSA: 10 mg/mL; egg white (10× diluted): 10.2 mg protein/mL; blood plasma (3× diluted): 20.5 mg protein/mL; ABTS[•]: 1.63 mM in PBS (200 μL). Reaction time: 1 h.

The product was firmly bound to BSA; it was co-precipitated with protein by trichloroacetic acid (TCA), ethanol, chloroform, and acetone, leaving a colorless, protein-free layer or supernatant, or lower layer in the case of precipitation with chloroform (Figure 4).

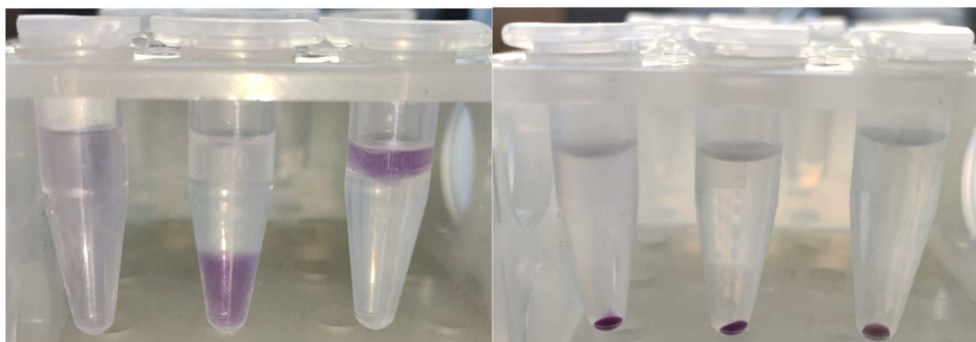


Figure 4. Co-precipitation of the purple product with BSA upon treatment with (from left to right): PBS (no precipitate), diethyl ether, chloroform, ethanol, acetone, and 10% TCA.

The absorption spectrum of the purple product was not affected by 2.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), but its intensity was diminished by reducing agents such as β -mercaptoethanol and dithiothreitol (Figure 5).

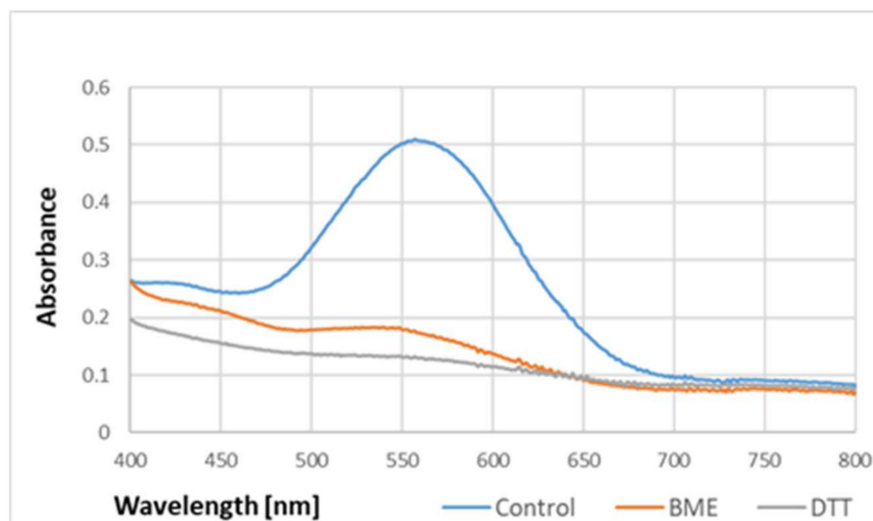


Figure 5. Effect of reducing agents on the absorption spectrum of the purple product of BSA reaction with ABTS^\bullet . BME, β -mercaptoethanol; DTT, dithiothreitol. The product formed by 10 mg/mL BSA in PBS was added with 5 mM BME or DTT. Reaction time: 1 h.

BSA is a protein containing no prosthetic groups, so the product had to be formed by some amino acid constituent(s) of the protein. No product formation was detected upon the reaction of ABTS^\bullet with cysteine, cystine, histidine, methionine, serine, leucine, alanine, arginine, and glycine. Glutathione, oxidized glutathione, and glycyl-glycine did not generate the product either, thus excluding the participation of the peptide bond in the product formation. However, tyrosine did react with ABTS^\bullet , producing a similar color (Figure 6), although the maximum absorption corresponded to slightly lower wavelengths (540–550 nm) (Figure 7).



Figure 6. Colors formed by the reaction of BSA (10 mg/mL) with ABTS^\bullet (107 μM , final concentrations), left, and by the reaction of tyrosine (2 mM) with ABTS^\bullet (107 μM , final concentrations), right. Reaction volume: 1 mL, reaction time: 1 h.

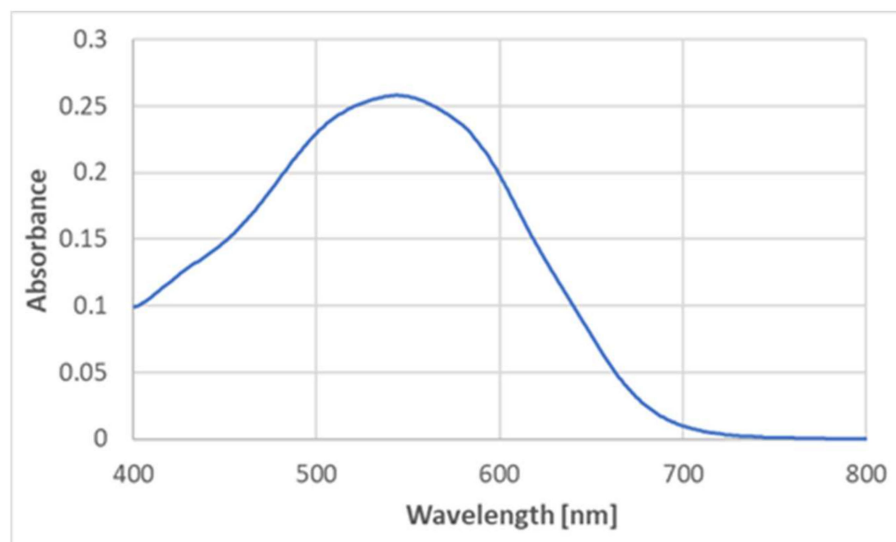


Figure 7. The absorption spectrum of the product of the reaction of ABTS[•] (125 μM) with tyrosine (2 mM; final concentrations) in PBS. Reaction time: 1 h.

These data indicate that the formation of the purple product of proteins upon reaction with ABTS[•] is due to the reaction of protein tyrosyl residues. This conclusion is supported by the inhibition of the purple product formation on the previous nitration of tyrosine residues in BSA (Figure 8).

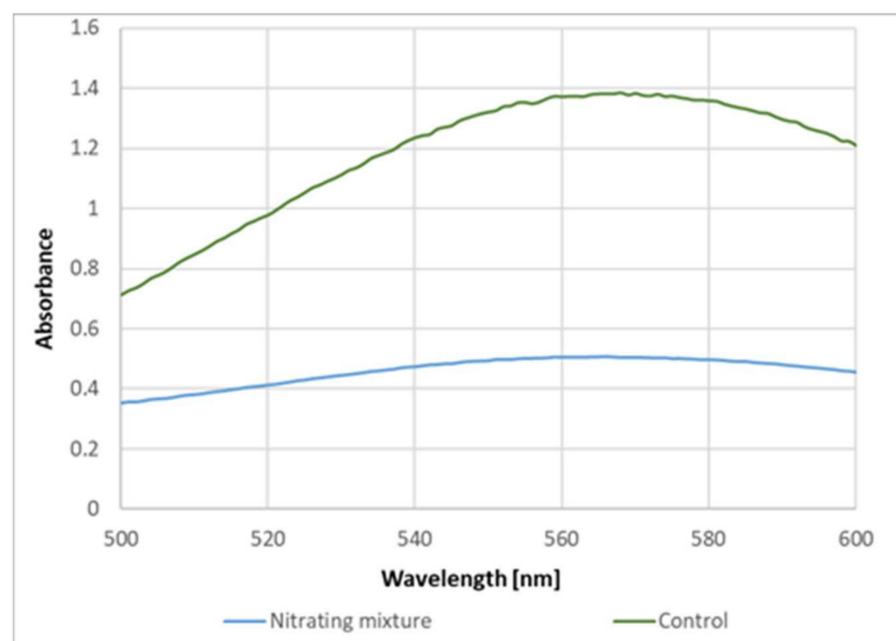


Figure 8. Effect of nitration on BSA on the yield of the purple product.

The amount of purple product for the reaction of tyrosine with ABTS[•] showed a linear dependence on the ABTS[•] concentration and a much weaker dependence on the tyrosine concentration, with a saturation tendency (Figure 9).

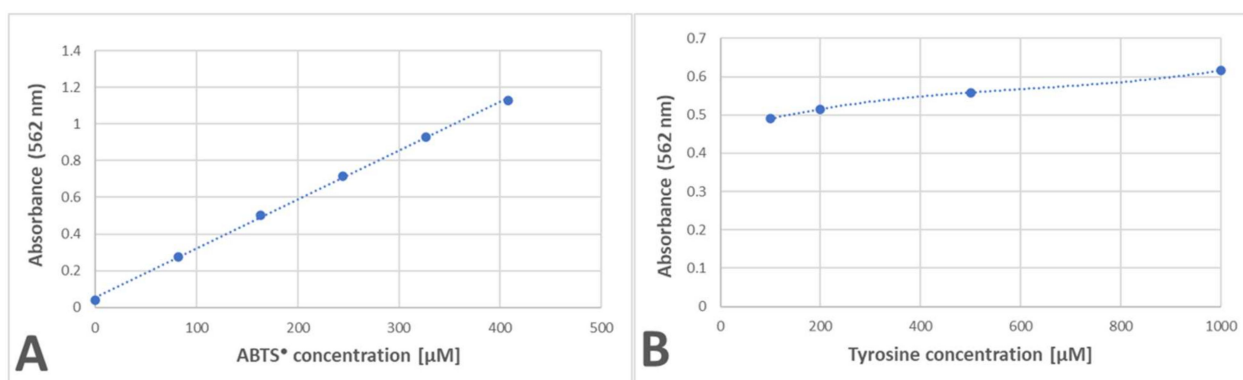


Figure 9. Dependence of the purple product formation of tyrosine on the amount of ABTS• (A) and tyrosine (B). (A): 2 mM tyrosine in 200 μ L of PBS added with ABTS• solution; (B): 125 μ M ABTS• in 200 μ L of PBS added with increasing amounts of tyrosine solution. Reaction time: 24 h.

pH affected the yield of the reaction and slightly affected the spectra of the purple product of the reaction of tyrosine with ABTS•. The optimal pH for the reaction was 6.5, and the yield of the product decreased with a pH decreasing below 6.5 and increasing above this value. The decrease in pH caused a bathochromic shift of the spectra, with the wavelength of maximal absorption increasing from 447 nm at pH 8.0 to 545 nm at pH 4.0 (Figure 10).

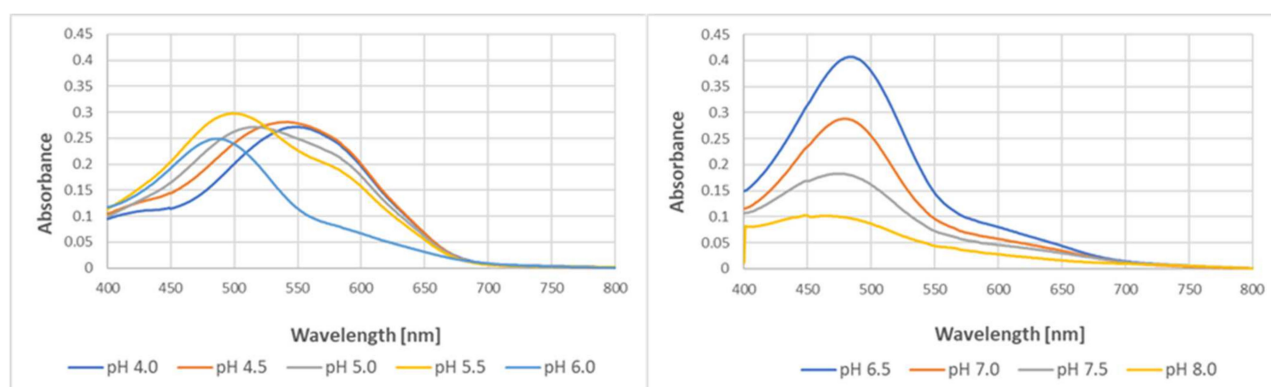


Figure 10. Effect of pH on the formation of the colored product in the reaction of tyrosine (2 mM) with ABTS• (2.5 mM) in 50 mM of acetate of phosphate buffers of various pH levels. Reaction time: 24 h.

Absorption spectra in the UV region demonstrated that the reaction with ABTS• led to the disappearance of the absorption of tyrosine at about 280 nm and the appearance of a band at about 340 nm, typical for ABTS (Figure 11).

The purple products of the ABTS• reaction with BSA and tyrosine were not free radicals and, in contrast to ABTS• (Figure 12A), showed no EPR signal (Figure 12B,C).

Monitoring the spectra of the BSA-ABTS• mixture in time showed that there were no isosbestic points between the spectra of ABTS• and of the adduct (Supplementary Video S1), which is obvious as the main product (ABTS) does not absorb in the visible range. Thus, the adduct cannot be the only product of the reaction of ABTS• with BSA, apart from the reduction product (ABTS). One of the other byproducts of the reaction is apparently dityrosine.

Indeed, the addition of ABTS• to the tyrosine solution also induced dityrosine formation, as demonstrated by the characteristic fluorescence of the product, with a maximum of about 400 nm when excited at 320 nm [4,9,10]. Dityrosine was formed immediately; subsequently, its content somewhat decreased in time (Figure 13).

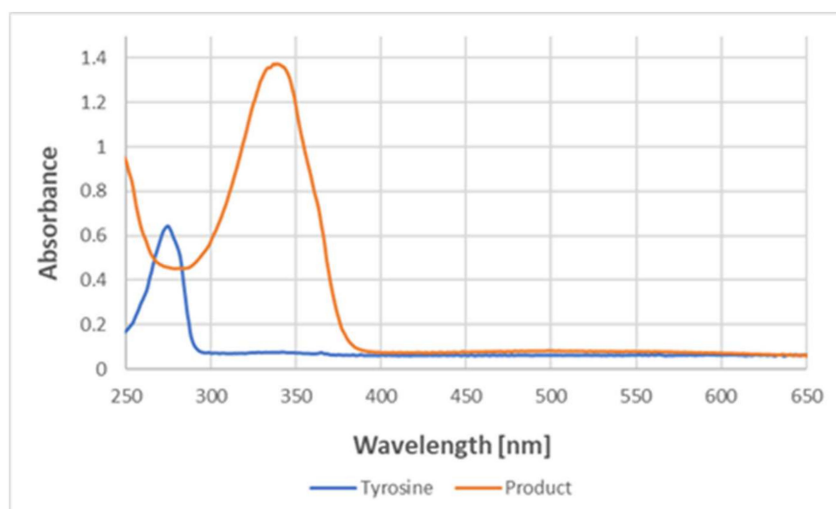


Figure 11. UV-visible spectra of tyrosine and the product of its reaction with ABTS^\bullet in PBS. The spectra correspond to the reaction product of $177 \mu\text{M}$ tyrosine and $147 \mu\text{M}$ (final concentrations) ABTS^\bullet .

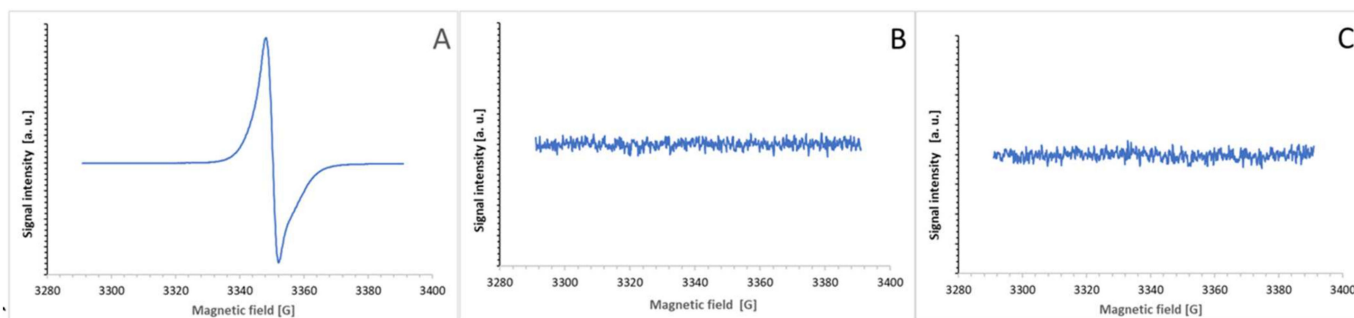


Figure 12. EPR spectra of ABTS^\bullet ($100 \mu\text{M}$, (A)) and its reaction products with BSA (20 mg/mL in PBS, (B)) and tyrosine (0.4 mg/mL PBS, (C)). The reaction products were measured after the total discoloration of ABTS^\bullet .

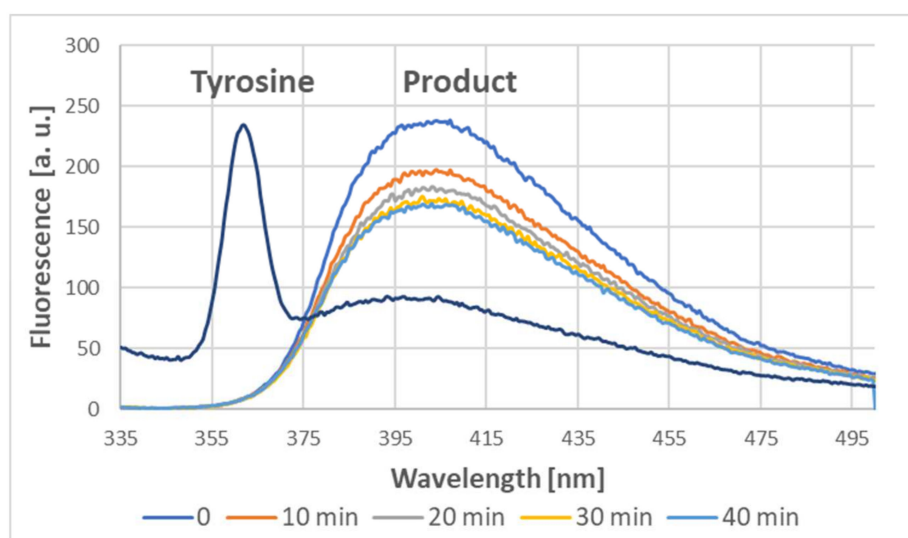


Figure 13. Emission spectra of tyrosine (1 mM) and the product of the reaction between tyrosine (1 mM) and ABTS^\bullet (1.63 mM ; final concentrations) at various times after the addition of ABTS^\bullet .

3. Discussion

This study is devoted to the description of the formation and properties of a byproduct of the reaction of proteins with ABTS[•]. To the best of our knowledge, this byproduct was not identified previously in the reaction of ABTS[•] decolorization. Our results show that the formation of this product is common for various samples containing proteins as components.

The presented results indicate that the reaction of ABTS[•] with BSA and other proteins, leading to the generation of a purple product, is due to the reaction of ABTS[•] with protein tyrosine residues. The premises for such conclusions are: (i) a product with a similar spectrum is formed upon the reaction of ABTS[•] with tyrosine, but not any other amino acid tested, (ii) protein nitration, affecting mainly tyrosine residues [11,12], attenuates the formation of the purple product of BSA. The product was stable on the time scale of hours to days. The purple product of the reaction of ABTS[•] with tyrosine had an absorption maximum at about 549 nm; the spectrum showed a bathochromic shift with decreasing pH. The spectral difference between the product of tyrosine and BSA reaction with ABTS[•] is apparently due to the effect of the amino acid environment on the absorption spectra of tyrosine residues in the protein.

The local environment of tyrosine residues in proteins may differ considerably, as demonstrated by differences in their pK_a values. The pK_a value of free tyrosine is 10.07 (www.peptideweb.com, accessed on 12 May 2023); the pK_a value of tyrosine residues in BSA was estimated to be 11.95 [13]. The pK_a values of tyrosyl residues of the photoactive yellow protein of *Halobacterium halobium* differ, depending on whether the phenolic side chain is solvent-exposed, buried, or hydrogen-bonded. Solvent-exposed Y76 and Y98 have pK_a values of 10.2–10.3. Y118, partly buried within the protein interior, but with the hydroxyl group is not involved in the hydrogen bonding, has pK_a values of 11.4–12.0. Hydrogen-bonded and partially buried Y42 and Y94 residues have pK_a > 13 [14]. The pK_a of tyrosine of human serum apoferritin is unusually low (7.57) but increases up to more than 9.0 upon the addition of sulfate [15]. Thus, there are reasons to expect differences in the reactivity between free tyrosine and tyrosine residues proteins, as well as between individual tyrosine residues in various proteins with ABTS[•], and differences in the spectral characteristics of the adducts.

The lack of an EPR signal of the product demonstrates that the product is not a free radical. It excludes the possibility of the purple color being due to the presence of the ABTS biradical, possessing a broad absorption spectrum centered at about 540 nm. Moreover, the absorption spectra of the product in the UV range showed a disappearance of the absorption band at about 280 nm, characteristic of tyrosine, and an appearance of the absorption band at about 340 nm, characteristic of ABTS but not ABTS[•] (the latter has an absorption band at about 420 nm) [8,16], which confirms the non-radical character of the bound ABTS residue. The co-precipitation of the reaction product with BSA indicates its covalent binding to the protein. The most feasible explanation is that the product is an adduct of ABTS to tyrosine.

The probable mechanism of the adduct formation is proposed below.

During the reaction of the ABTS[•] reduction by a protein or free tyrosine, one-electron oxidation of tyrosine by ABTS[•] forms the tyrosyl radical:



The main reaction of the so-formed tyrosyl radical is the reduction of another ABTS[•] radical:



where Tyr = O is the quinone product of two-electron tyrosine (Tyr-OH) oxidation.

However, a fraction of the tyrosyl radicals can be engaged in other reactions such as covalent adduct formation (3) and the formation of dityrosine (4) [17]:



as presented in Figure 14. Other reactions may also proceed in this system.

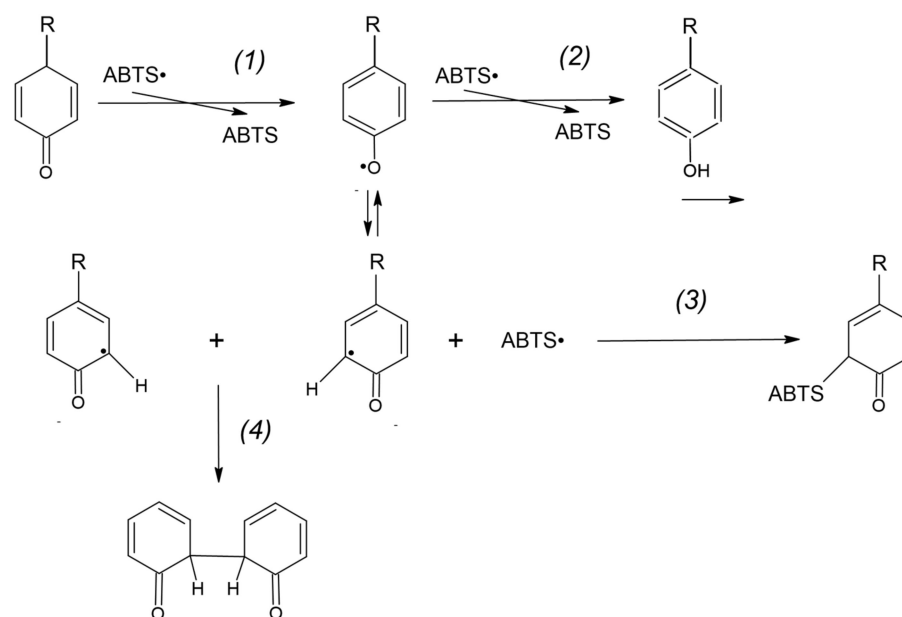


Figure 14. Reactions of tyrosine radicals. Tyrosine radical is formed in the reaction of ABTS• reduction (1) and mainly reacts with the next ABTS• radical (2). It can also form an adduct with an ABTS• radical (3) or dimerize to form dityrosine (4).

There are literature data pointing to the formation of stable tyrosine-ABTS• adducts due to reactions of the tyrosyl radical. The blue laccase of *Sclerotinia sclerotiorum* was rapidly converted to a deep purple form upon turning over ABTS or by the addition of chemically pre-formed ABTS•. The color disappeared gradually after ~10 min, presumably decomposed via redox cycling. Differences in the spectra of the laccase-ABTS• adduct ($\lambda_{\text{max}} = 575 \text{ nm}$) and for the tyrosine-ABTS adduct ($\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ nm}$) of ABTS• and free tyrosine formed in a reaction catalyzed by laccase were ascribed to the influence of the protein environment [18]. The reaction of ABTS with lipocalin α 1-microglobulin, also leading to the formation of a purple product, conditioned by the formation of ABTS-adducts to at least two tyrosine residues in the protein molecule, was also reported [19].

The formation of covalent adducts between ABTS• and the oxidation products of polyphenols such as phloroglucinol and catechin has been demonstrated. The primary adducts were unstable and formed secondary adducts, releasing part of the ABTS molecule [20], and were identified among the products of ABTS• reactions with polyphenols [21].

Analysis of the purple tyrosine-ABTS adduct led to the conclusion that the adduct was formed in the ortho position of tyrosine, via a bond between nitrogen in the fragment of the ABTS molecule and carbon in the ortho position with respect to the hydroxyl group of tyrosine [19].

The detection of the formation of the purple adduct of lipocalin α 1-microglobulin has been interpreted as an argument that this protein acts as a “radical sink” via its radical reductase and scavenging activities. The present results demonstrate that the formation of purple adducts is a general feature of proteins. Most proteins have tyrosine residues, and all proteins are able to reduce ABTS• due to the presence of cysteine, tyrosine, tryptophan, histidine, or cystine residues [22]. Tyrosine residues are one of the amino acid residues most

susceptible to oxidative modifications, including one-electron oxidations [23]. Tyrosine radicals, if formed in proteins, are able to form adducts with various radicals [18]. Tyrosine nitration proceeds via the formation of tyrosyl radicals and the subsequent reaction of these radicals with $\bullet\text{NO}_2$. Several oxidants, such as $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{NO}_2$, $\text{CO}_3^{\bullet-}$, peroxy ($\text{LOO}\bullet$) and alkoxy ($\text{LO}\bullet$) radicals, oxo-metal compounds such as $\text{O} = \text{Mn(IV)}$, and Compounds I and II of heme peroxidases, such as myeloperoxidase, can perform the one-electron oxidation of tyrosine in biological systems. When $\text{Tyr}\bullet$ radical is formed it can have different fates, one of which is the diffusion-controlled reaction with $\bullet\text{NO}_2$ to form nitrotyrosine [24,25].

The coupling of 3-hydroxyanthranilic acid with protein tyrosine residues, used by some moth species for the tanning of cocoons [26], proceeds through a radical addition of 3-hydroxyanthranilic acid to a tyrosyl radical [27]. Polyunsaturated lipid peroxy radicals may also give stable peroxide coupling products exclusively at the para position of the tyrosyl phenoxy radicals; the formation of such adducts may terminate lipid peroxidation reactions [28]. The reaction of protein tyrosyl radicals with superoxide produces hydroperoxide, which is reduced to monoxide, yielding a glutathionylated adduct via Michael addition [29]. The formation of adducts between protein tyrosyl radicals and the spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) is the basis of the ingenious immunochemical method of detection of the formation of these radicals using anti-DMPO antibodies [30,31]. As the adduct formed by tyrosyl radicals with $\text{ABTS}\bullet$ described in this study has a purple color and its formation can be easily followed spectrophotometrically, it may be a useful indicator of such addition reactions of tyrosine radicals in proteins and peptides.

The present results demonstrate that the adduct formation, as well as dityrosine formation, contribute to the complexity of the apparently simple reaction of $\text{ABTS}\bullet$ decolorization. van Overveld et al. found the antioxidant activity of tyrosine in the $\text{ABTS}\bullet$ decolorization assay to be 1.48 mol Trolox equivalents (TE)/mol tyrosine after a 5 min reaction [32]. Torkova et al. found a value of 3.38 mol TE/mol tyrosine after a 40.5 min reaction [33]. We obtained an antioxidant activity of 4.07 mol TE/mol tyrosine after a 30 min reaction [22]. In all cases, the antioxidant activity of tyrosine was higher than 1, a value which could be expected if only the phenol group participated in the reaction. Arts et al. demonstrated that the reaction product of the reaction of resorcinol with $\text{ABTS}\bullet$ participated in the reaction, causing additional $\text{ABTS}\bullet$ reduction [34]. A similar situation may take place in the reaction of tyrosine with $\text{ABTS}\bullet$. However, the formation of the tyrosine- $\text{ABTS}\bullet$ adduct and dityrosine may also contribute to the higher-than-expected antioxidant activity of tyrosine in the reaction of $\text{ABTS}\bullet$ decolorization.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents and Disposables

L-Arginine (CAS no. 74-79-3, cat. no. 11009, purity $\geq 99.5\%$), L-methionine (CAS no. 63-68-3, cat. no. M9625, purity $\geq 98\%$), L-serine (CAS no. 56-45-1, cat. no. S4500, purity $\geq 99\%$), L-leucine (CAS no. 61-90-5, cat. no. L8000, purity $\geq 98\%$), L-lysine monohydrochloride (CAS no. 657-27-2, cat. no. L5626, purity $\geq 98\%$), β -Alanine (CAS no. 107-95-9, cat. no. 146064, purity $\geq 99.5\%$), sodium dodecyl sulfate (SDS) (CAS no. 151-21-3, cat. no. L4509, purity $\geq 98.5\%$), glycine (CAS no. 56-40-6, cat. no. 410225, purity $\geq 98.5\%$), cysteine (CAS no. 52-90-4, cat. no. 168149, purity $\geq 97\%$), L-glutathione reduced (CAS no. 70-18-8, cat. no. G4251, purity $\geq 98\%$), L-glutathione oxidized (CAS no. 27025-41-8, cat. no. G4376, purity $\geq 98\%$), glycyl-glycine (Gly-Gly) (CAS no. 556-5-3, cat. no. G1002, purity $\geq 99\%$), sodium nitrite (CAS no. 7632-00-0, cat. no. 8222850100, purity $> 98\%$), and citric acid monohydrate (CAS no. 5949-29-1, cat. no. 1002441000, ACS reagent) were purchased from Merck (Poznań). L-Cystine (CAS no. 56-89-3; cat. no. 2/03/75 purity $\geq 98\%$) was obtained from Biomed (Lublin, Poland). DL-Dithiothreitol (DTT) (CAS no. 3483-12-3; cat. no. DTT001.5, purity $\geq 99.5\%$), L-histidine (CAS no. 71-00-1; cat. no. HIS100.25, purity $\geq 98.5\%$), phosphate-buffered saline (PBS; cat. no. PBS404.200), sodium phosphate monobasic (CAS no. 10049-21-5; cat. no. SPM306.500, purity 98–103%),

and sodium phosphate dibasic (CAS no. 7782-85-6; cat. no. SPD579.1, purity 98–102%) came from LAB EMPIRE (Rzeszow, Poland).

Tryptophan (CAS no. 73-22-3, cat. no. 4858, purity \geq 98.5%) and tyrosine (CAS no. 60-18-4, cat. no. T207, purity \geq 99%) were purchased from Roth (Zielona Góra, Poland). 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (CAS no. 504-14-6, cat. no. 10102946001, purity \geq 99%) came from Roche (Warsaw, Poland).

Ethanol (CAS no. 64-17-5, cat. no. 396480111, purity \geq 99.8%) and sodium acetate anhydrous (CAS no. 127-09-3, cat. no. BN60/6191, purity \geq 99%) were from Avantor Performance Materials Poland (Gliwice, Poland). Acetic acid (CAS no. 64-19-7, cat. no. 425687339, purity 80%), hydrochloric acid (CAS no. 7647-01-0, cat. no. 115752837, 35–38%), hydrogen peroxide (CAS no. 7722-84-1, cat. no. 118851934, 30%), sodium nitrite (CAS no. 7632-00-0, cat. no. 792690115, purity \geq 97.5%), chloroform (CAS no. 67-66-3, cat. no. 112344305, purity \geq 98.5%), acetone (CAS no. 67-64-1, cat. no. 111024800, purity \geq 99.5%), and diethyl ether (CAS no. 60-29-7, cat. No. 113842106, purity \geq 99.5%) were provided by Chempur (Piekary Śląskie, Poland).

Albumin Fraction V (BSA) (CAS no. 9038-46-8, cat. No. A1391,0025, purity \geq 97%) was bought from AppliChem (Darmstadt, Germany), β -mercaptoethanol (BME) (CAS no. 60-24-2, cat. No. Z523A, 48.7%) were from Promega (Madison, WI, USA), and sodium hydroxide (CAS no. 1310-73-2, cat. no. 056992, purity \geq 98%) came from Warchem (Warsaw, Poland). Bacto Peptone (cat. no. 211677) was from Becton and Dickinson Company (Le Pont de Claix, France). Distilled water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Transparent flat-bottom 96-well plates (cat. no. 655101) (Greiner, Kremsmünster, Austria) were used for the assays. Absorptiometric measurements were performed in a Spark multimode plate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

Stock solutions of BSA were made in PBS. Chicken egg white was diluted 10 times with PBS. Human erythrocyte membranes were prepared according to a modification [35] of the method of Dodge et al. [36].

4.2. ABTS• Decolorization Assay

The assay was carried out as described previously [3]. In a standard assay, aliquots of amino acid or protein solution containing increasing amounts of the protein causing a reduction of not more than 90% of the ABTS• present in the sample were added to wells of a 96-well plate containing 200 μ L of solution diluted so as to provide absorbance of 1.0 at 734 nm in a plate reader. The decrease in absorbance was read after 30 min at ambient temperature. In the experiments reported here, greater amounts of protein or higher concentrations were also used, and longer incubation times were employed as indicated in figure legends.

4.3. Nitration of Tyrosine Residues in BSA

BSA (20 mg/mL in 0.2 M sodium citrate buffer, pH 5, 100 μ L) was added with 20 μ L of 200 mM sodium nitrite and 20 μ L of 200 mM H₂O₂, mixed immediately, and incubated at room temperature for 2 h. The same amounts of sodium nitrite and hydrogen peroxide were added twice more in 2 h intervals.

4.4. Electron Spin Resonance Measurements

Electron paramagnetic resonance (EPR) measurements were performed on a Bruker multifrequency and multi-resonance FT-EPR ELEXSYS E580 spectrometer (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten, Germany) operating at the X-band (9.378989 GHz). The following settings were used: modulation amplitude, 0.4 G; modulation frequency, 100 kHz; microwave power, 94.64 mW; power attenuation, 2 dB; conversion time, 25 ms; sweep time, 102.4 s; powder sample: central field, 3501 G; scan range, 7000 G; liquid sample: central field, 3353.15 G; scan range, 100 G, accumulate, 10. The spectra were recorded and analyzed using Xepr 2.6b.74 software.

4.5. Fluorimetric Assessment of Dityrosine Formation

Tyrosine (2 mM) in 50 mM phosphate buffer, pH 8.0, was added with an equal amount of 1.63 mM ABTS[•] solution. Fluorescence spectra were measured immediately and at 10 min intervals in a Hitachi F-2500 spectrofluorimeter (Tokyo, Japan) at an excitation wavelength of 320 nm [9,10], using excitation and emission slits of 5 nm.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24108912/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, I.S.-B. and K.K.; methodology, I.S.-B., I.S. and K.K.; validation, I.S.-B.; investigation, K.K., I.S. and I.S.-B.; writing—original draft preparation, I.S.-B. and K.K.; writing—review and editing, I.S.-B. and G.B.; supervision, I.S.-B.; project administration, I.S.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by financial resources of the Ministry of Science and Higher Education of Poland for the maintenance of the research potential of the Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszow, Project PB/PB/2023.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available on reasonable request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors are indebted to Mirosław Soszyński (Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Poland) for the preparation of erythrocyte membranes and to Edyta Bieszczad-Bedrejczuk (Laboratory of Analytical Biochemistry, University of Rzeszow, Poland) for the excellent technical help.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
2. Sadowska-Bartosz, I.; Bartosz, G. Evaluation of The Antioxidant Capacity of Food Products: Methods, Applications and Limitations. *Processes* **2022**, *10*, 2031. [[CrossRef](#)]
3. Kut, K.; Cieniek, B.; Stefaniuk, I.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartosz, I. A Modification of the ABTS[•] Decolorization Method and an Insight into Its Mechanism. *Processes* **2022**, *10*, 1288. [[CrossRef](#)]
4. Fischer, M.A.; Gransier, T.J.; Beckers, L.M.; Bekers, O.; Bast, A.; Haenen, G.R. Determination of the antioxidant capacity in blood. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2005**, *43*, 735–740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sánchez-Moreno, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* **2002**, *8*, 121–137. [[CrossRef](#)]
6. Schaich, K.M.; Tian, X.; Xie, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J. Funct. Foods* **2015**, *14*, 111–125. [[CrossRef](#)]
7. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ilyasov, I.R.; Beloborodov, V.L.; Selivanova, I.A.; Terekhov, R.P. ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1131. [[CrossRef](#)]
9. Malencik, D.A.; Sprouse, J.F.; Swanson, C.A.; Anderson, S.R. Dityrosine: Preparation, isolation, and analysis. *Anal. Biochem.* **1996**, *242*, 202–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Malencik, D.A.; Anderson, S.R. Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. *Amino Acids* **2003**, *25*, 233–247. [[CrossRef](#)]
11. Ischiropoulos, H. Protein tyrosine nitration—An update. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *484*, 117–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Rubbo, H.; Radi, R. Protein and lipid nitration: Role in redox signaling and injury. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 1318–13124. [[CrossRef](#)]
13. Farruggia, B.; García, G.; D'Angelo, C.; Picó, G. Destabilization of human serum albumin by polyethylene glycols studied by thermodynamical equilibrium and kinetic approaches. *Int. J. Biol. Macromol.* **1997**, *20*, 43–51. [[CrossRef](#)]
14. Oktaviani, N.A.; Pool, T.J.; Kamikubo, H.; Slager, J.; Scheek, R.M.; Kataoka, M.; Mulder, F.A. Comprehensive determination of protein tyrosine pKa values for photoactive yellow protein using indirect ¹³C NMR spectroscopy. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 579–586. [[CrossRef](#)]

15. Clarkson, J.; Smith, D.A. UV Raman evidence of a tyrosine in apo-human serum transferrin with a low $pK_{(a)}$ that is elevated upon binding of sulphate. *FEBS Lett.* **2001**, *503*, 30–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Scott, S.L.; Chen, W.J.; Bakac, A.; Espenson, J.H. Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6710–6714. [[CrossRef](#)]
17. Giulivi, C.; Traaseth, N.J.; Davies, K.J. Tyrosine oxidation products: Analysis and biological relevance. *Amino Acids* **2003**, *25*, 227–232. [[CrossRef](#)]
18. Kut, K.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartosz, I. Denaturation and digestion increase the antioxidant capacity of proteins. *Processes* **2023**, *11*, 1362. [[CrossRef](#)]
19. Mot, A.C.; Coman, C.; Hadade, N.; Damian, G.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Heering, H. “Yellow” laccase from *Sclerotinia sclerotiorum* is a blue laccase that enhances its substrate affinity by forming a reversible tyrosyl-product adduct. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0225530. [[CrossRef](#)]
20. Akerström, B.; Maghzal, G.J.; Winterbourn, C.C.; Kettle, A.J. The lipocalin alpha1-microglobulin has radical scavenging activity. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 31493–31503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Osman, A.M.; Wong, K.K.; Fernyhough, A. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *346*, 321–329. [[CrossRef](#)]
22. Osman, A.M.; Wong, K.K.; Hill, S.J.; Fernyhough, A. Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *340*, 597–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Houée-Lévin, C.; Bobrowski, K.; Horakova, L.; Karademir, B.; Schöneich, C.; Davies, M.J.; Spickett, C.M. Exploring oxidative modifications of tyrosine: An update on mechanisms of formation, advances in analysis and biological consequences. *Free Radic. Res.* **2015**, *49*, 347–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Radi, R. Protein tyrosine nitration: Biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 550–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bartesaghi, S.; Radi, R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 618–625. [[CrossRef](#)]
26. Manthey, M.K.; Pyne, S.G.; Truscott, R.J. Involvement of tyrosine residues in the tanning of proteins by 3-hydroxyanthranilic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 1954–1957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Manthey, M.K.; Pyne, S.G.; Truscott, R.J. Structural elucidation and independent synthesis of the radical-radical coupling products of 3-hydroxyanthranilic acid with tyrosine and phenols. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4581–4585. [[CrossRef](#)]
28. Shchepin, R.; Möller, M.N.; Kim, H.Y.; Hatch, D.M.; Bartesaghi, S.; Kalyanaraman, B.; Radi, R.; Porter, N.A. Tyrosine-lipid peroxide adducts from radical termination: Para coupling and intramolecular Diels-Alder cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17490–17500. [[CrossRef](#)]
29. Das, A.B.; Nauser, T.; Koppenol, W.H.; Kettle, A.J.; Winterbourn, C.C.; Nagy, P. Rapid reaction of superoxide with insulin-tyrosyl radicals to generate a hydroperoxide with subsequent glutathione addition. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *70*, 86–95. [[CrossRef](#)]
30. Ramirez, D.C.; Chen, Y.R.; Mason, R.P. Immunochemical detection of hemoglobin-derived radicals formed by reaction with hydrogen peroxide: Involvement of a protein-tyrosyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *34*, 830–839. [[CrossRef](#)]
31. Mason, R.P. Imaging free radicals in organelles, cells, tissue, and in vivo with immuno-spin trapping. *Redox Biol.* **2016**, *8*, 422–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Van Overveld, F.W.; Haenen, G.R.; Rhemrev, J.; Vermeiden, J.P.; Bast, A. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *127*, 151–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Torkova, A.; Koroleva, O.; Khrameeva, E.; Fedorova, T.; Tsentalovich, M. Structure-Functional Study of Tyrosine and Methionine Dipeptides: An Approach to Antioxidant Activity Prediction. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 25353–25376. [[CrossRef](#)]
34. Arts, M.J.; Dallinga, J.S.; Voss, H.P.; Haenen, G.R.; Bast, A. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chem.* **2003**, *80*, 409–414. [[CrossRef](#)]
35. Zavodnik, I.B.; Lapshina, E.A.; Zavodnik, L.B.; Bartosz, G.; Soszynski, M.; Bryszewska, M. Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 363–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Dodge, J.T.; Mitchell, C.; Hanahan, D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1963**, *100*, 119–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Rzeszów, 13.05.2025r.

mgr inż. Kacper Roman Kut

Imię (imiona) i nazwisko

**Wydział Technologiczno-Przyrodniczy, Instytut Technologii Żywności i Żywienia Człowieka,
Pracownia Biochemii Analitycznej**

Nazwa jednostki

prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

Promotor

Technologia Żywności i Żywienia

nazwa dyscypliny

OŚWIADCZENIE

Zgodnie z § 7 ust. 6 Regulaminu przeprowadzania czynności w postępowaniach w sprawie nadania stopnia doktora prowadzonych w Uniwersytecie Rzeszowskim, w związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji: „**Kut K**, Tama A, Furdak P, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. *Generation of Hydrogen Peroxide and Phenolic Content in Plant-Material-Based Beverages and Spices*. 2024; 12(1):166. <https://doi.org/10.3390/pr12010166>” jest **wiodący** i obejmował:

- udział w stworzeniu koncepcji badań naukowych;
- udział w doborze metod przeprowadzonych badań;
- oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktów roślinnych kaw, herbat, przypraw, ziół i kakao przy użyciu metod oznaczania zdolności redukcji jonów miedzi CUPRAC i jonów żelaza FRAP oraz metod redukcji rodnika DPPH• i rodnika ABTS•;
- oznaczenie generacji nadtlenku wodoru przez polifenole (kwas galusowy, pyrogallol, kwercytryna) w czasie zero po 1,2,3 godzinach inkubacji;
- przeprowadzenie oznaczeń całkowitej zawartości polifenoli w ekstraktach roślinnych metodą Folina-Ciocalteu;
- analiza uzyskanych wyników;
- współudział w pisaniu oryginalnej wersji artykułu naukowego, który później poddano dalszym poprawkom i edycjom;
- uczestniczenie w opracowaniu graficznym wyników oraz analizie statystycznej.

Kacper Kut

(podpis)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

1. mgr inż. Anna Tama

(Imię i nazwisko współautora)

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Kacpra Romana Kut udział w przygotowaniu publikacji naukowej: **Kut K, Tama A, Furdak P, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Generation of Hydrogen Peroxide and Phenolic Content in Plant-Material-Based Beverages and Spices. Processes. 2024; 12(1):166**, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- Udział w przygotowaniu ekstraktów roślinnych kaw, herbat, przypraw, ziół i kakao;
- Udział w oznaczaniu generacji nadtlenu wodoru w ekstraktach roślinnych w czasie zerowym i po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej;
- Przeprowadzenie części oznaczeń całkowitej zawartości polifenoli w ekstraktach roślinnych metodą Folina-Ciocalteu.

Anna Tama

(podpis)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

2. mgr inż. Paulina Furdak

(Imię i nazwisko współautora)

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Kacpra Romana Kut udział w przygotowaniu publikacji naukowej: **Kut K**, Tama A, Furdak P, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. *Generation of Hydrogen Peroxide and Phenolic Content in Plant-Material-Based Beverages and Spices. Processes*. 2024; 12(1):166, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- Uczestniczenie w opracowaniu graficznym wyników oraz analizie statystycznej przy użyciu pakietu oprogramowania Statistica.

Paulina Furdak

(podpis)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

3. prof. dr hab. Grzegorz Bartosz

(Imię i nazwisko współautora)

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Kacpra Romana Kut udział w przygotowaniu publikacji naukowej: **Kut K**, Tama A, Furdak P, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. *Generation of Hydrogen Peroxide and Phenolic Content in Plant-Material-Based Beverages and Spices. Processes*. 2024; 12(1):166, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- Udział w stworzeniu koncepcji badań;
- Udział w doborze metod przeprowadzonych badań;
- Udział w pisaniu oryginalnej wersji artykułu naukowego, który później poddano dalszym poprawkom i edycjom;
- Udział w poprawianiu ostatecznej wersji artykułu naukowego.



(podpis)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

4. prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

(Imię i nazwisko współautora)

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Kacpra Romana Kut udział w przygotowaniu publikacji naukowej: **Kut K**, Tama A, Furdak P, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. *Generation of Hydrogen Peroxide and Phenolic Content in Plant-Material-Based Beverages and Spices. Processes.* 2024; 12(1):166, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- Udział w stworzeniu koncepcji badań naukowych;
- Udział w doborze i opracowaniu metod przeprowadzonych badań;
- Nadzór nad prowadzonymi eksperymentami;
- Analiza uzyskanych wyników;
- Zarządzanie projektem, w tym organizowanie i koordynowanie prowadzonych badań naukowych;
- Udział w pisaniu pierwszej wersji artykułu, który później poddano dalszym poprawkom i edycjom;
- Uczestniczenie w opracowaniu graficznym wyników oraz analizie statystycznej przy użyciu pakietu oprogramowania Statistica;
- Udział w poprawianiu ostatecznej wersji artykułu naukowego;
- Pozyskanie finansowania niezbędnego do opublikowania przygotowanego artykułu;
- Pełnienie obowiązków autora korespondencyjnego.

Uniwersytet Rzeszowski
Wydział Technologiczno-Przyrodniczy
Kierownik Pracowni Biochemii Analitycznej
Izabela Sadowska - Bartosz
prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

.....
(podpis)

mgr inż. Kacper Roman Kut

Imię (imiona) i nazwisko

**Wydział Technologiczno-Przyrodniczy, Instytut Technologii Żywności i Żywienia Człowieka,
Pracownia Biochemii Analitycznej**

Nazwa jednostki

prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

Promotor

Technologia Żywności i Żywienia

nazwa dyscypliny

OŚWIADCZENIE

Zgodnie z § 7 ust. 6 Regulaminu przeprowadzania czynności w postępowaniach w sprawie nadania stopnia doktora prowadzonych w Uniwersytecie Rzeszowskim, w związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji: „**Kut K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. “Denaturation and Digestion Increase the Antioxidant Capacity of Proteins.” Processes. 2023; 11(5):1362. <https://doi.org/10.3390/pr11051362>” jest **wiodący** i obejmował:**

- udział w doborze metod przeprowadzonych badań;
- wykonanie oznaczeń całkowitego potencjału antyoksydacyjnego aminokwasów poprzez określenie zdolności redukowania jonów miedzi CUPRAC i jonów żelaza (metoda FRAP) oraz metody redukcji rodnika ABTS*;
- oznaczenie wpływu denaturacji przy użyciu soli sodowej kwasu dodecylosiarkowego (SDS), trypsyny, papainy, na aktywność przeciwutleniającą albuminy surowicy bydłowej (BSA) i zdolność przeciwutleniającą białka jaja kurzego przy użyciu metod oznaczania zdolności redukowania jonów miedzi CUPRAC i jonów żelaza FRAP oraz metody redukcji rodnika ABTS*;
- analiza uzyskanych wyników;
- współudział w pisaniu oryginalnej wersji artykułu naukowego, który później poddano dalszym poprawkom i edycjom;
- uczestniczenie w opracowaniu graficznym wyników oraz analizie statystycznej;
- uczestniczenie w poprawianiu i udoskonalaniu ostatecznej treści przedłożonego manuskryptu.

Kacper Kut
.....

(podpis)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

1. prof. dr hab. Grzegorz Bartosz

(Imię i nazwisko współautora)

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Kacpra Romana Kut udział w przygotowaniu publikacji naukowej: **Kut K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I.** “*Denaturation and Digestion Increase the Antioxidant Capacity of Proteins.*” *Processes.* 2023; 11(5):1362, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- Udział w stworzeniu koncepcji badań naukowych;
- Udział w doborze metod przeprowadzonych badań eksperymentalnych;
- Analiza uzyskanych wyników;
- Udział w pisaniu pierwszej wersji artykułu, który później poddano dalszym poprawkom i edycjom;
- Udział w poprawianiu ostatecznej wersji przedłożonego manuskryptu.



(podpis)

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

1. prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

(Imię i nazwisko współautora)

Jako współautorka akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Kacpra Romana Kut udział w przygotowaniu publikacji naukowej: Kut K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. "Denaturation and Digestion Increase the Antioxidant Capacity of Proteins." Processes. 2023; 11(5):1362, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- Udział w stworzeniu koncepcji badań naukowych;
- Udział w doborze i opracowaniu metod przeprowadzonych badań naukowych;
- Nadzór nad prowadzonymi eksperymentami;
- Analiza uzyskanych wyników;
- Zarządzanie projektem, w tym organizowanie i koordynowanie prowadzonych badań naukowych;
- Udział w pisaniu pierwszej wersji artykułu, który później poddano dalszym poprawkom i edycjom;
- Udział w poprawianiu ostatecznej wersji przedłożonego manuskryptu;
- Pozyskanie finansowania niezbędnego do opublikowania przygotowanego artykułu;
- Pełnienie obowiązków autora korespondencyjnego.

Uniwersytet Rzeszowski
Wydział Technologiczno-Przyrodniczy
Kierownik Pracowni Biochemii Analitycznej
I. Sadowska-Bartosz
prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

.....
(podpis)

Rzeszów, 13.05.2025r.

mgr inż. Kacper Roman Kut

Imię (imiona) i nazwisko

**Wydział Technologiczno-Przyrodniczy, Instytut Technologii Żywności i Żywnienia Człowieka,
Pracownia Biochemii Analitycznej**

Nazwa jednostki

prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

Promotor

Technologia Żywności i Żywnienia

nazwa dyscypliny

OŚWIADCZENIE

Zgodnie z § 7 ust. 6 Regulaminu przeprowadzania czynności w postępowaniach w sprawie nadania stopnia doktora prowadzonych w Uniwersytecie Rzeszowskim, w związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji: „**Kut K, Stefaniuk I, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Formation of a Purple Product upon the Reaction of ABTS Radicals with Proteins. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(10):8912. <https://doi.org/10.3390/ijms24108912>**” jest **wiodący** i obejmował:

- udział w stworzeniu koncepcji badań;
- udział w doborze metod przeprowadzonych badań;
- oznaczenie widm pochłaniania powstałych fioletowych produktów albuminy surowicy wołowej (BSA) i tyrozyny i zależności absorbancji od stężenia rodnika ABTS[•];
- sprawdzenie czy fioletowy produkt reakcji można zaobserwować również po reakcji ABTS[•] z próbkami bogatymi w białko, takich jak białka ludzkiego osocza krwi, białko jaja kurzego, bacto-pepton i białka błon erytrocytów;
- oznaczenie wpływu reduktorów na widmo absorbcji fioletowego produktu BSA-ABTS[•];
- oznaczenie wpływu pH na widmo absorbcji fioletowego produktu reakcji tyrozyny z ABTS[•];
- oznaczenie widma emisji tyrozyny i produktów reakcji pomiędzy tyrozyną i rodnikiem ABTS[•];
- analiza uzyskanych wyników;
- współudział w pisaniu oryginalnej wersji artykułu naukowego, który później poddano dalszym poprawkom i edycjom;
- uczestniczenie w opracowaniu graficznym wyników oraz analizie statystycznej.

Kacper Kut
.....

(podpis)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

1. dr hab. Ireneusz Stefaniuk, prof. UR

(Imię i nazwisko współautora)

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Kacpra Romana Kut udział w przygotowaniu publikacji naukowej: **Kut K**, Stefaniuk I, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. *Formation of a Purple Product upon the Reaction of ABTS Radicals with Proteins. International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(10):8912, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- Udział w opracowaniu metodologii prowadzonych badań w zakresie pomiarów za pomocą sond spinowych metodą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR);
- Oznaczenie widm EPR powstałych produktów BSA-ABTS* oraz określenie czy produkty reakcji są rodnikami;
- Analiza uzyskanych wyników pomiarów EPR;

Ireneusz Stefaniuk

(podpis)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

2. prof. dr hab. Grzegorz Bartosz

(Imię i nazwisko współautora)

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Kacpra Romana Kut udział w przygotowaniu publikacji naukowej: Kut K, Stefaniuk I, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Formation of a Purple Product upon the Reaction of ABTS Radicals with Proteins. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(10):8912, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- Udział w poprawianiu ostatecznej wersji artykułu naukowego.



(podpis)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

3. prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

(Imię i nazwisko współautora)

Jako współautorka akceptuję przedstawiony przez Pana mgr inż. Kacpra Romana Kut udział w przygotowaniu publikacji naukowej: Kut K, Stefaniuk I, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Formation of a Purple Product upon the Reaction of ABTS Radicals with Proteins. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(10):8912, która stanowić będzie część Jego dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- Udział w koncepcji pracy naukowej;
- Udział w doborze i opracowaniu metod przeprowadzonych badań;
- Nadzór nad prowadzonymi eksperymentami;
- Analiza uzyskanych wyników;
- Zarządzanie projektem, w tym organizowanie i koordynowanie prowadzonych badań naukowych;
- Udział w pisaniu pierwszej wersji artykułu, który później poddano dalszym poprawkom i edycjom;
- Udział w poprawianiu ostatecznej wersji artykułu naukowego.
- Pozyskanie finansowania niezbędnego do opublikowania przygotowanego artykułu;
- Pełnienie obowiązków autora korespondencyjnego.

Uniwersytet Rzeszowski
Wydział Technologiczno-Przyrodniczy
Kierownik Pracowni Biochemii Analitycznej
I. Sadowska - Bartosz
prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

.....
(podpis)