

MICHAŁ WOLNIAK, STANISŁAW KALISZ

WPLYW PEKTYN NISKOMETYLOWANYCH NA ZAWARTOŚĆ ANTOCYJANÓW I POLIFENOLI OGÓŁEM ORAZ ICH AKTYWNOŚĆ PRZECIWRODNIKOWĄ OZNACZONĄ EPR W SOKACH TRUSKAWKOWYCH

Streszczenie

Celem pracy było określenie zmian zawartości antocyjanów i polifenoli ogółem oraz aktywności przeciwutleniającej soków truskawkowych bez dodatków oraz wzbogacanych preparatem pektyn niskometylowanych, przechowywanych w temp. 4°C. Zawartość antocyjanów w sokach bezpośrednio po wytworzeniu wynosiła 14,5 mg/100 ml w soku bez pektyny i 12,1 mg/100 ml w soku z pektyną. Dominującym monomerem był pelargonidyno-3-glukozyd, który stanowił 89% składu antocyjanowego. Po 3 miesiącach przechowywania soki bez pektyny zawierały o 57% mniej antocyjanów niż próbki wyjściowe, natomiast w sokach z pektyną wartość ta zmalała o 34%. W trakcie przechowywania stwierdzono także zmniejszenie zawartości polifenoli ogółem, co skutkowało zmniejszeniem się pojemności przeciwutleniającej. W przypadku soków bez dodatku pektyny zmniejszenie zawartości polifenoli ogółem było o wiele większe niż w próbkach z dodatkiem pektyn i wynosiło odpowiednio 17 oraz 9%. Pomiar pojemności przeciwutleniającej metodą EPR udowodnił, że dodatek pektyn stabilizuje właściwości przeciwrodnikowe. W próbkach bez pektyn pojemność zmalała o 28% pierwotnej wartości natomiast ze stabilizatorem obniżyła się tylko o 7%.

Słowa kluczowe: truskawki, soki, antocyjany, aktywność przeciwutleniająca, EPR, wolne rodniki

Wprowadzenie

Wzrost świadomości żywieniowej konsumentów przejawia się w coraz większym przywiązywaniu wagi do składu chemicznego nabywanych produktów i ich właściwości prozdrowotnych. Oprócz właściwego dla danego przetworu wyglądu, zachowanie pierwotnych cech surowca staje się ważnym wyróżnikiem danego artykułu

Mgr M. Wolniak, Zakład Chemii Fizycznej, Wydz. Farmaceutyczny, Akademia Medyczna, ul. Banacha 10, 02-097 Warszawa, dr inż. S. Kalisz, Zakład Technologii Owoców i Warzyw, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159C, 02-776 Warszawa

spożywczego [1]. Niestety proces technologiczny oraz przechowywanie przyczyniają się do niekorzystnych przemian poszczególnych składników, obniżając ich wartość żywieniową.

Badania epidemiologiczne wykazały, że dieta ma znaczący wpływ na częstotliwość występowania chorób cywilizacyjnych. Większość tych chorób ma etiologię wolnorodnikową, dlatego ocena zdolności przeciwutleniających jest ważnym etapem w ocenie jakości produktu [2]. Zawartość związków odpowiadających za właściwości przeciwutleniające może być znacznie zróżnicowana zależnie od gatunku, jak też warunków agrotechnicznych. Złożoność naturalnych układów biologicznych, jakimi są np. soki owocowe, powoduje wzajemne interakcje między składnikami, które zależnie od rodzaju i stężenia mogą działać korzystnie bądź przyczyniać się do degradacji składników [3, 4]. Precyzyjne określenie właściwości przeciwutleniających i dokładne określenie wpływu poszczególnych frakcji na aktywność antyrodnikową staje się więc złożonym problemem. Mętne lub barwne próbki (na przykład soki truskawkowe) wymagałyby w pomiarach spektrofotometrycznych korekty tła, co nie jest łatwe i proste do zastosowania w praktyce. Dlatego mierząc pojemność przeciwutleniającą za pomocą metod spektrofotometrycznych, przygotowuje się próbkę tak, aby była ona klarowna i najlepiej bezbarwna. Niestety wiąże się to z filtrowaniem i klarowaniem badanego materiału, co powoduje utlenianie i utratę wielu cennych (zwłaszcza spolimeryzowanych) składników. W rezultacie otrzymywany wynik jest znacznie zaniżony, bowiem aktywność wielu cennych związków nie jest uwzględniana w całkowitej pojemności przeciwutleniającej. Z kolei metodę EPR można stosować bezpośrednio do próbek mętnych i barwnych, co czyni ją bardzo przydatną w badaniach soków z owoców.

Celem pracy było określenie zmian zawartości antocyjanów i polifenoli ogółem oraz aktywności przeciwutleniającej soków truskawkowych bez dodatków oraz wzbogacanych preparatem pektyn niskometylowanych, przechowywanych w temp. 4°C.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły, przygotowane w skali laboratoryjnej, soki truskawkowe z owoców odmiany Marmolada z okolic Rawy Mazowieckiej. Owoce depektynizowano przez 1,5 godz. w temp. 50°C z dodatkiem enzymy Rohapect 10L firmy AB Enzymes Poland w dawce 100 mg/kg owoców. Następnie całość doprowadzano do wrzenia celem inaktywacji enzymów, szybko schładzano do temp 20°C i tłoczono w laboratoryjnej prasie warstwowej. Otrzymany sok filtrowano z dodatkiem ziemi okrzemkowej Becogur 100 w dawce 5 g/kg. Z soku przygotowywano próbki w wariantach: bez dodatków i z dodatkiem 0,1% preparatu pektyny niskometylowanej NECJ A3, po czym rozlewano do 200 ml słoików i pasteryzowano 20 min w temp. 90°C. Po obróbce termicznej produkt chłodzono i przechowywano

przez 3 miesiące w warunkach chłodniczych bez dostępu światła. Soki pobierano do badań co 30 dni, a analizy wykonywano każdorazowo z 3 prób i w 3 powtórzeniach z tej samej partii.

Badania obejmowały pomiar zawartości polifenoli, w tym antocyjanów [5] wraz z wyznaczeniem półokresu ich rozpadu, oraz określenie aktywności przeciwutleniającej z użyciem techniki EPR. Zawartość antocyjanów oznaczano metodą HPLC w zestawie firmy Shimadzu, składającym się z detektora UV-VIS SPD-10A VP, pompy LC-10AT VP, pieca CTO-10AS VP, degazera DEGASEX™ model DG-400 (Phenomenex), współpracującego z programem do zbierania danych Chromax 2003. Rozdział prowadzono w kolumnie Luna 5 μm C18(2) 250 x 4,6 mm (Phenomenex) przy przepływie 1 ml/min w temp. 25°C. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina woda : acetonitryl : kwas mrówkowy (810:90:100; v/v/v). Rejestrację antocyjanów prowadzono przy $\lambda = 520$ nm. Związki identyfikowano na podstawie widm oraz czasów retencji porównywanych z wzorcami. Zawartość antocyjanów podano w przeliczeniu na cyjanidyno-3-glukozyd. Przed nastrzykiem próbki oczyszczano w minikolumnach Sep-Pak C18 firmy Waters. Część analityczna obejmowała także oznaczenie witaminy C metodą HPLC w identycznym zestawie w tych samych warunkach detekcji przy $\lambda = 254$ nm, a jako eluent stosowano 0,1% H_3PO_4 . Z kolei zawartość polifenoli ogółem oznaczano metodą Folina-Ciocalteu'a. Wynik końcowy oznaczania polifenoli wyrażano w przeliczeniu na kwas galusowy.

Właściwości przeciwutleniające soków badano metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR z użyciem trwałego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH). Pomiary wykonywano w spektrometrze firmy Bruker ELEXSYS E 500 pracującym metodą fali ciągłej. Do badań użyto komory rezonansowej SHQE - Super High Q cavity. Rejestracji widm dokonywano przy następujących parametrach: Q (stosunek v_{rez} do Δv) = 7000, częstotliwość rezonansowa – 9,41 GHz, moc – 20 mW, indukcja magnetyczna B – 3368 G, szerokość przemiatania – 200 G, czas przemiatania – 41,17 s, częstotliwość modulacji – 100 kHz, amplituda modulacji – 3 G, czułość odbiornika – 62 dB. Sygnał wzorca DPPH[•] stanowił roztwór DPPH[•] w metanolu o stężeniu 1,824 mmol/dm³. Do 5 ml wzorca dodawano po 50 μl soku, intensywnie wytrząsano i szczelnie zamknięte próbki pozostawiano w zaciemnionym miejscu. Roztwory nie wymagały odtleniania, gdyż DPPH[•] nie ulega działaniu tlenu z powietrza, a antocyjany w środowisku, w którym były przeprowadzane badania, nie ulegają utlenianiu. Potwierdziły to przeprowadzone wcześniej próby. Po zakończeniu reakcji mierzono intensywność integralną sygnału DPPH[•], która jest wprost proporcjonalna do stężenia rodnika w próbce. Ponieważ w przypadku wszystkich badanych próbek czas reakcji z rodnikiem DPPH[•] nie przekraczał 50 min, rejestrację widma rodnika w celu ustalenia zmian jego stężenia wykonano po 60 min. Intensywność integralną sygnału obliczano korzystając z programów do obróbki widm

EPR firmy Bruker dostarczonych ze spektrometrem. Na podstawie uzyskanych wyników, stosując metodę najmniejszych kwadratów, przeliczono ilość zneutralizowanego DPPH[•] na równoważniki Troloxu [Mm/100 ml].

Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania laboratoryjne pozwoliły na określenie w sokach poziomu zawartości polifenoli, w tym antocyjanów oraz witaminy C (tab. 1). Szczególnie interesujące było określenie ilości tych związków, jak również ich zmian w trakcie przechowywania.

Tabela 1

Zawartość polifenoli ogółem i antocyjanów w sokach truskawkowych w trakcie ich przechowywania.

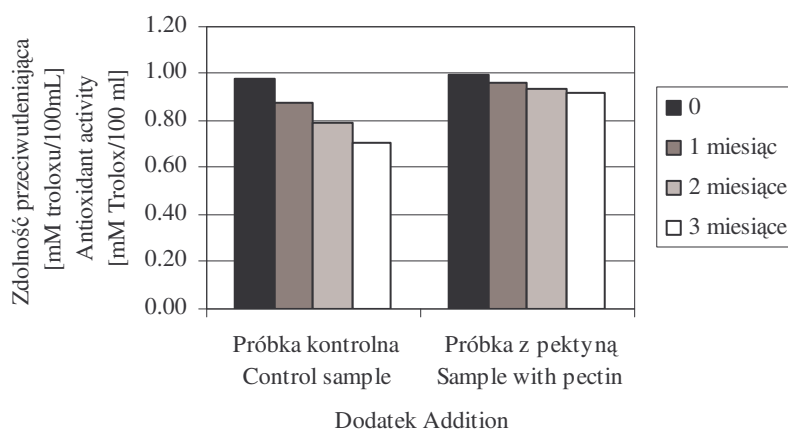
The total polyphenols and anthocyanins content in strawberry juices during storage.

Czas składowania [miesiące] Time of storage [months]	Sok z truskawek bez dodatków Strawberry juice without additives			Sok z truskawek z dodatkiem pektyny Strawberry juice with pectin addition		
	Polifenole [mg/100 ml]	Antocyjany [mg/100 ml]	Witamina C [mg/100 ml]	Polifenole [mg/100 ml]	Antocyjany [mg/100 ml]	Witamina C [mg/100 ml]
	Polyphenols [mg/100 ml]	Anthocyanins [mg/100 ml]	Ascorbic acid [mg/100 ml]	Polyphenols [mg/100 ml]	Anthocyanins [mg/100 ml]	Ascorbic acid [mg/100 ml]
0	143,0	14,5	16,1	140,8	12,1	16,5
1	141,5	10,0	13,2	146,7	9,5	13,5
2	131,0	7,6	11,0	137,6	8,2	11,5
3	120,8	6,9	8,0	129,5	7,3	8,6

Po trzymiesięcznym składowaniu soków w warunkach chłodniczych w próbkach kontrolnych pozostało 48% pierwotnej zawartości antocyjanów. W próbkach wzbogacanych preparatem pektyny niskometylowanej po przechowywaniu pozostało 60% antocyjanów, a półokres ich rozpadu był 1,4 razy mniejszy w porównaniu z próbkami kontrolnymi. W przypadku polifenoli, w próbkach z pektyną po miesiącu składowania zaobserwowano nieznaczny wzrost poziomu badanych związków, co było już wynikiem wcześniejszych badań własnych, jak i innych eksperymentatorów [1, 6]. Przepuszczalnie wiąże się to z małą selektywnością stosowanej metody i częściowego uwzględniania powstających związków, tym bardziej, że po 3 miesiącach składowania w próbkach z pektyną oznaczono 91% wyjściowej zawartości polifenoli, a w kontrolnych 83%, co uwidacznia małe zmiany ilościowe. W związku z powyższym kontynuacja tego problemu badawczego wymaga wyjaśnienia zmian jakościowych poszczególnych składowych polifenoli. Pod względem zawartości witaminy C próbki

różniły się w małym stopniu. W próbkach po 3-miesięcznym przechowywaniu stwierdzono średnio 51% pierwotnej zawartości witaminy C.

Oszacowano także wpływ poszczególnych dodatków na całkowitą pojemność przeciwutleniającą. Dodatek 0,1% preparatów pektyny niskometylowanej do soków spowodował ograniczenie obniżania zdolności neutralizacji wolnych rodników w stosunku do próbki kontrolnej (rys. 1). Spowodowało to stabilizację pojemności przeciwutleniającej, która w trakcie trzymiesięcznego przechowywania zmniejszyła się nieznacznie (93% pierwotnej wartości), podczas gdy w próbkach bez pektyny wartość ta osiągnęła 72% pierwotnej wartości. Potwierdza to hipotezę, że właściwości przeciwutleniające powinny być kontrolowane na każdym etapie obróbki i przetwarzania surowców roślinnych.

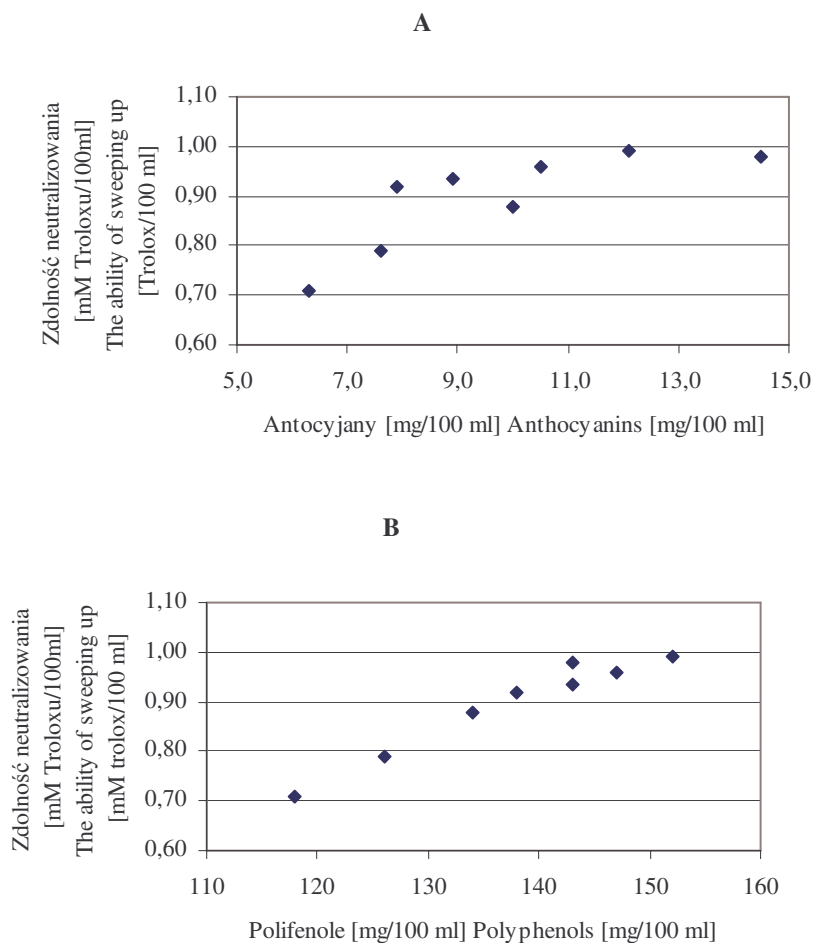


Rys. 1. Zmiany pojemności przeciwutleniającej soków truskawkowych podczas przechowywania.

Fig. 1. Changes of the antioxidant capacity of strawberry juices during different time of storage.

Przeanalizowano także korelację pomiędzy zawartością związków polifenolowych a pojemnością przeciwutleniającą. Na rys. 2. przedstawiono zależność całkowitej pojemności przeciwutleniającej od składu antocyjanowego (A) i zawartości polifenoli (B). O wiele silniejszą korelację stwierdzono w przypadku polifenoli ogółem ($R = 0,97$) niż samej frakcji antocyjanowej ($R = 0,79$). Sugeruje to znacznie mniejszy udział frakcji antocyjanowej w całkowitej pojemności przeciwutleniającej. Prawdopodobnie najbardziej aktywne (często jeszcze nieoznaczone związki) nie należą do frakcji antocyjanowej, tym niemniej udział antocyjanów w neutralizowaniu wolnych rodników jest znaczący. Na podstawie analizy regresji stwierdzono, że największy wpływ na pojemność przeciwutleniającą miała frakcja oznaczana jako polifenole ogółem. Analizując dane dotyczące składu chemicznego owoców [7, 8], można przypuszczać, że frakcja ta powinna zawierać hydroksykwas, procyanidyny

oraz wiele innych związków. Bardzo dobra korelacja frakcji polifenolowej z całkowitą pojemnością przeciwutleniającą pozwala przypuszczać, że zawiera ona wiele silnych przeciwutleniaczy i potwierdza to zasadność prowadzenia dalszych badań nad dokładniejszym poznaniem jej składu.



Rys. 2. Zależność pojemności przeciwutleniającej od zawartości antocyjanów (A) oraz polifenoli (B).

Fig. 2. The dependence of the antioxidant capacity from the content of anthocyanins (A) and polyphenols (B).

Większa aktywność przeciwrodnikowa frakcji zawierającej różnorodne związki najprawdopodobniej spowodowana jest synergistycznym oddziaływaniem składników. Porównanie danych literaturowych odnoszących się do poszczególnych czystych związków [9] pozwala przypuszczać, że suma pojemności przeciwutleniających

poszczególnych polifenoli jest zwykle mniejsza od zdolności neutralizowania wolnych rodników przez mieszaniny [10]. Efekty te wymagają z pewnością dalszych badań, a wyniki mogą być bardzo cenną wskazówką dla producentów soków i badaczy jakości żywności. Znajomość zmian pojemności przeciwutleniającej w zależności od składu produktu jest ważnym problemem przy właściwym konstruowaniu preparatów przeciwutleniających, tym bardziej, że nie jest to zależność prostoliniowa.

Wnioski

1. Stosowanie 0,1% dodatku pektyn niskometylowanych do soków pozwala na zmniejszenie strat antocyjanów i polifenoli w czasie ich przechowywania.
2. Pektyna wpływa stabilizująco na antocyjany, zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym. Jej dodatek powoduje także zahamowanie obniżania się pojemności przeciwutleniającej soków podczas przechowywania.
3. Korelacja zawartości polifenoli oraz antocyjanów z ilością zneutralizowanego DPPH pozwala przypuszczać, że znacznie większy udział w aktywności przeciwutleniającej wnosi frakcja polifenolowa. W jej skład wchodzi wiele nieznanych dotąd związków, co stwarza konieczność dalszych badań składu chemicznego.

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

Literatura

- [1] Ayala-Zavala J.F., Wang S.Y., Wang C.Y., Gonzalez-Aguilar G.A.: Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebens.-Wiss. u.-Technol.*, 2004, **37**, 687-695.
- [2] Ishige K., Schubert D., Saraga Y.: Flavonoids protect neuronal cells from oxydative stress by free distinct mechanisms. *Free Radical Biol. Med.*, 2004, **36**, 838-849.
- [3] Heins A., Stöckmann H., Schwarz K.: Designing „anthocyanin-tailored” food composition. In: *Biologically-active phytochemicals in food: Analysis, bioavailabillity and function*. Royal Soc. Chem., 2001, pp. 281-377.
- [4] Kalt W.: Effect of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *J. Food Sci.*, 2005, **70**, 1, R11-R19.
- [5] Fuleki T., Francis F.J.: Quantitative methods for anthocyanins. *J. Food Sci.*, 1968, **33**, 72.
- [6] Kalisz S., Kurowska M.: Zmiany zawartości związków fenolowych i witaminy C w sokach i półkoncentratkach truskawkowych podczas ich przechowywania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **2 (43) Supl.**, 62-71.
- [7] Vinson J. A., Su X., Zubik L., Bose P.: Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 4076-4082.
- [8] Oszmiański J., Kucharska A.: Taniny aronii. *Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu, Technologia Żywności VIII*, 1995, **273**, 55-64.

- [9] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 1996, **20**, 933.
- [10] Soleas G. J., Tomlinson G., Diamandis E.P., Goldberg D.M. Relative contributions of polyphenolic constituents to the antioxidant status of wines: development of a predictive model. *J. Agr. Food Chem.*, 1997, **45**, 3995.

THE INFLUENCE OF PECTINS ON ANTHOCYANINS AND TOTAL POLIPHENOL CONTENT AND ITS ANTIRADICAL SCAVENGING ACTIVITY DESIGNATED IN STRAWBERRY JUICES

S u m m a r y

The aim of this study was to assess the content of total polyphenols and anthocyanins together with antioxidant activity in strawberry juices. Also the addition of pectin was done in order to check its influence on radical scavenging activity during storage in 4°C. The amount of anthocyanins right after production reached 14.5 mg/100 ml and 12.1 mg/100 ml in control and pectin enriched samples respectively. The major anthocyanin monomer was pelargonidin-3-glucoside (89% of all anthocyanins). After three months of storage samples without pectin lost 57% of anthocyanins, whereas those with addition of pectin only 34%. During storage the decrease of total polyphenols was also found and as a result the antioxidant activity was smaller. The amount of total polyphenols that were lost reached 17% and 9% in control and pectin samples respectively. The measurement of antioxidant capacity using EPR method proved, that pectin prevents the loss of polyphenols, thus keeping radical scavenging activity of strawberry juices at high level. The activity in samples with pectin was only 7% lower, while in control samples it dropped down 28%.

Key words: strawberries, juices, anthocyanins, antioxidant activity, EPR, free radicals ☒