

STANISŁAW KALISZ, MICHAŁ WOLNIAK

ZMIANY ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH PODCZAS PRZECHOWYWANIA SOKÓW MALINOWYCH

Streszczenie

Celem pracy było określenie zmian zawartości antocyjanów i polifenoli ogółem oraz aktywności przeciwutleniającej soków malinowych bez dodatków i z dodatkiem preparatu pektyn niskometylowanych, przechowywanych w temp. 4°C.

Zawartość antocyjanów w sokach bezpośrednio po wytworzeniu wynosiła 97,34 mg/100 ml w soku bez pektyny i 93,5 mg/100 ml w soku z dodatkiem pektyny. Dominującym monomerem był pelargonidyno-3-soforozyd, który stanowił 72% składu antocyjanowego. Po 3 miesiącach przechowywania soki bez dodatku pektyny zawierały o 23% mniej antocyjanów niż próbki wyjściowe, natomiast w sokach z pektyną wartość ta zmalała o 16%. W trakcie przechowywania stwierdzono także zmniejszenie zawartości polifenoli ogółem, co skutkowało obniżeniem pojemności przeciwutleniającej. W sokach bez dodatku pektyny pojemność przeciwutleniająca zmalała o 18%, a w próbkach z dodatkiem pektyny o 6%.

Słowa kluczowe: maliny, sok, polifenole, antocyjany, rodniki, pojemność przeciwutleniająca, EPR

Wprowadzenie

Zmiany w wyglądzie produktów przetworzonych wpływają na akceptację konsumencką, ale przede wszystkim są wskaźnikiem przemian chemicznych, które prowadzą do obniżenia wartości sensorycznej i odżywczej. Dodatkowo poszczególne związki mogą wykazywać zróżnicowaną dostępność biologiczną, co wiąże się z różnym ich metabolizmem [3]. Jednak niekorzystne zmiany w żywności mogą być ograniczone przez prawidłowe prowadzenie procesów przetwórczych, a szczególnie właściwy dobór warunków przechowywania i obrotu [9].

Podczas obróbki technologicznej mogą być wprowadzane odpowiednie dodatki, które z jednej strony ograniczą degradację substancji labilnych, a z drugiej wzbogacą produkt w nowe pożądane składniki. Pomiędzy poszczególnymi składnikami może dochodzić do wzajemnych interakcji, co np. przy obecności antocyjanów może prowadzić do powstawania stabilniejszych i trwalszych kopigmentów. Poszukuje się więc sposobów, które pozwoliłyby na stabilizację pożądanych składników bez

zmniejszania ich dostępności biologicznej. Stałość prozdrowotnych składników żywności uważa się bowiem za jeden z warunków rozwoju żywności funkcjonalnej [2, 6].

Ze względów technologicznych wiele substancji (np. pektyny) jest usuwanych na wczesnych etapach przetwarzania, chociaż ze względów żywieniowych niosą one konkretne korzyści. Celowe zatem jest sprawdzenie ich wpływu na wybrane właściwości produktu (po ponownym ich wprowadzaniu), gdy nie będą już obniżać efektywności procesu przetwórczego. Poszczególne składniki żywności wchodzi bowiem ze sobą w interakcje, co dopiero ostatecznie kształtuje ich właściwości przeciwtleniające [6, 8]. Należy pamiętać, że zależnie od rodzaju surowca poszczególne grupy związków mogą w różnym stopniu odpowiadać za aktywność przeciwtleniającą. Na przykład, szacuje się, że witamina C w malinach wpływa w 15% na tę cechę, w truskawkach w 40%, zaś w czarnej porzeczce w ponad 50% [15]. W przypadku malin rozpatrywane w tym kontekście biologiczne właściwości w dużej mierze przypisuje się innym związkom, do których zalicza się m.in. kwas elagowy i jego pochodne. Właściwości przeciwtleniające owoców i wytwarzanych z nich przetworów wiążą się bowiem ściśle z ich składem i reaktywnością chemiczną [3, 9, 16].

Celem pracy było określenie wpływu wzbogacania soków malinowych preparatem pektynowym na zachowalność polifenoli w tym antocyjanów oraz właściwości przeciwtleniające w trakcie 3-miesięcznego przechowywania w temp. 4°C.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły, przygotowane w skali laboratoryjnej, soki z malin mrożonych, przechowywanych 6 miesięcy w temp. -18°C. Owoce depektynizowano przez 2 godz. w temp. 50°C z dodatkiem enzymu Rohapect 10L (AB Enzymes Poland) w dawce 100 mg/kg owoców. Enzymy inaktywowano, doprowadzając całość do wrzenia i szybko schładzano do temp 20°C. Miazgę tłoczono w laboratoryjnej prasie warstwowej, a otrzymany sok filtrowano z dodatkiem ziemi okrzemkowej Becogur 100 w dawce 5 g/kg. Z soku przygotowano próbki w wariantach: bez dodatku oraz z dodatkiem preparatu pektyny niskometylowanej NECJ A3 w dawce 0,1%. Sok rozlewano do słoiczków o poj. 80 ml i pasteryzowano 10 min w temp. 95°C. Po obróbce termicznej produkt schładzano, a następnie przechowywano 3 miesiące w temp. 4°C. Soki pobierano do badań co 30 dni, a analizy przeprowadzano w 3 powtórzeniach.

Zawartość antocyjanów oznaczano metodą HPLC z użyciem zestawu firmy Shimadzu, złożonego 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 z użyciem kolumny Luna 5 µm C18(2) 250 x 4,6 mm (Phenomenex) w 25°C. Jako eluent używano 4,5% kwas mrówkowy (odczynnik A) i 80% roztwór acetonitrylu w 4,5% kwasie mrówkowym (odczynnik B), przy przepływie 1 ml/min.

Analizę prowadzono w układzie gradientowym, rozpoczynając od 100% stężenia odczynnika A, zmniejszając jego udział do 85% w 8 min, do 60% w 16 min i 0% w 17 min, w 19 min osiągnano ponownie 100% eluentu A, utrzymując ten stan do 25 min. Rejestrację antocyjanów prowadzono przy $\lambda=520$ nm. Związki identyfikowano na podstawie widm i czasów retencji porównywanych z wzorcami. Zawartość antocyjanów wyrażano w przeliczeniu na cyjanidyno-3-glukozyd. Przed nastrzykiem próbki oczyszczano na minikolumnach Sep-Pak C18 firmy Waters. W tym celu 2 g próbki soku przenoszono do kolbki o poj. 10 ml i uzupełniano 0,1% H_3PO_4 , a następnie наносzono na Sep-Pak. Po odrzuceniu pierwszych 5 ml resztę zbierano do oznaczania witaminy C. Następnie wprowadzano 5 ml 0,1% H_3PO_4 , celem wymycia związków nieabsorbujących się na złożu. Pozostałą na minikolumnie frakcję wymywano 75% metanolem zakwaszonym przy użyciu HCl w ilości 1 ml/l i zbierano ją do oznaczenia antocyjanów. Zawartość witaminy C oznaczano metodą HPLC na identycznym zestawie w tych samych warunkach detekcji przy 254 nm, a jako eluent stosowano 0,1% H_3PO_4 . Polifenole ogółem oznaczano metodą Folina-Ciocalteu'a. Wynik końcowy wyrażano w przeliczeniu na kwas galusowy.

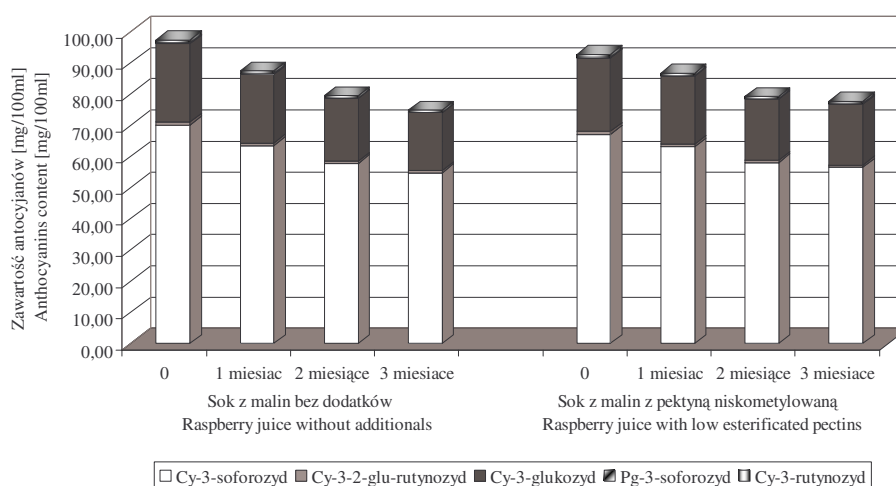
Właściwości przeciwutleniające soków badano metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), z użyciem trwałego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH). Pomiary wykonywano spektrometrem firmy Bruker ELEXSYS E 500 pracującym metodą fali ciągłej. Do badań używano komory rezonansowej SHQE - 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 stanowił roztwór DPPH w metanolu o stężeniu 1,824 mmol/l. Do 5 ml wzorca dodawano po 50 μ l soku, intensywnie wytrząsano i szczelnie zamknięte próbki pozostawiano w zaciemnionym miejscu. Po zakończeniu reakcji mierzono intensywność integralną sygnału DPPH, która jest wprost proporcjonalna do stężenia rodnika w próbce. Czas reakcji badanych próbek z rodnikiem DPPH nie przekraczał 50 min, dlatego rejestrację widma rodnika w celu ustalenia zmian jego stężenia wykonano po 60 min. Intensywność integralną sygnału obliczano, korzystając z programów do obróbki widm EPR (Bruker) dostarczonych ze spektrometrem. Na podstawie uzyskanych wyników, stosując metodę najmniejszych kwadratów, ilość zmiecionego DPPH przeliczano na równoważniki Troloxu [mmole/100 ml].

Współczynniki korelacji pomiędzy zawartością antocyjanów oraz polifenoli a pojemnością przeciwutleniającą wyznaczano metodą najmniejszych kwadratów, korzystając z narzędzi zaimplementowanych w programie Microsoft Excel.

Wyniki i dyskusja

Analiza, otrzymanych soków malinowych, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC pozwoliła na ilościowe i jakościowe określenie składu

antocyjanów. Bezpośrednio po otrzymaniu soków zawartość antocyjanów wynosiła 97,34 mg/100 ml w badanych próbkach kontrolnych oraz 93,50 mg/100 ml w soku z dodatkiem preparatu pektyny niskometylowanej [rys. 1]. Po 3-miesięcznym przechowywaniu soków w warunkach chłodniczych w temp. 4°C większą zachowalnością barwników antocyjanowych odznaczały się próbki z dodatkiem preparatu pektynowego. W próbkach tych pozostało blisko 84% początkowej zawartości antocyjanów, zaś w próbkach kontrolnych około 77%. Tempo tych zmian odzwierciedla półokres rozpadu antocyjanów, który w próbkach z pektyną wyniósł 381 dni, natomiast w kontrolnych 266 dni. Na podstawie dotychczasowych danych można przepuszczać, że stabilizujący wpływ pektyny niskometylowanej na antocyjany wiąże się między innymi z międzycząsteczkowymi interakcjami pomiędzy tymi związkami, jak również z łączeniem cząsteczek antocyjanów z powstałą strukturą. Mechanizm ten nie został dotychczas wyjaśniony i wymaga dalszych badań [4, 6].



Rys. 1. Zmiany zawartości antocyjanów w sokach malinowych w trakcie ich przechowywania.

Fig. 1. Changes of anthocyanins contents in raspberry juices during storage.

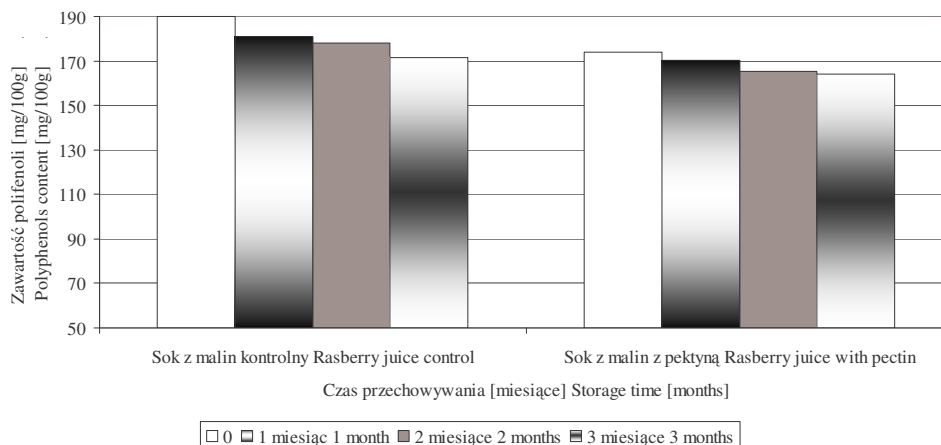
W składzie antocyjanowym analizowanych soków malinowych dominował cyjanidyno-3-soforozyd, który stanowił 72% ogólnej ilości tych związków. Cyjanidyno-3-glukozyd stanowił 25% wszystkich monomerów, cyjanidyno-3-(2-glukozylo)-rutynozyd i cyjanidyno-3-rutynozyd stanowiły po około 1%, a pelargonidyno-3-soforozyd, 0,2%. Po 3-miesięcznym przechowywaniu w warunkach chłodniczych najwyższą stabilność wykazały cyjanidyno-3-soforozyd i cyjanidyno-3-rutynozyd. Cyjanidyno-3-rutynozyd występował co prawda w stosunkowo małym stężeniu, jednak jego wysoka stabilność została wykazana w badaniach Iversena i Rubinskiego [7, 12]. Należy podkreślić, że utrzymanie wysokiej zachowalności barwników antocyjanowych w przetworach z owoców kolorowych jest istotne zarówno z uwagi na atrakcyjność sensoryczną, jak i właściwości prozdrowotne antocyjanów oraz ich aktywność przeciwutleniającą. Jak podaje Stewart [15] w

przypadku malin antocyjany odpowiadają za około 20% ich właściwości przeciwutleniających.

Zarówno stabilność antocyjanów, jak i właściwości przeciwutleniające wiążą się z obecnością i stężeniem innych aktywnych związków, co było powodem oznaczenia w soku także zawartości witaminy C. Niestety w analizowanych sokach witamina C zachowała się na stosunkowo niskim poziomie. Świadczy to o dużej degradacji witaminy C na etapie przygotowania soków. Próbkki kontrolne zawierały witaminę C jedynie w ilości 5,1 mg/100 ml, a z dodatkiem pektyny 3,9 mg/100 ml. Należy także uwzględnić fakt, że soki wyprodukowano z maliny składowanej 6 miesięcy w warunkach zamrażalniczych. Powszechnie wiadomo, że witamina C jest wrażliwa na warunki przechowywania oraz przetwarzania i jest najbardziej labilna spośród wszystkich przeciwutleniaczy. Jej degradację mogą przyspieszać enzymy własne surowca, temperatura oraz natlenienie, co może zachodzić podczas maceracji miazgi [1, 9]. Po miesiącu przechowywania w próbkach kontrolnych i wzbogacanych pektyną pozostało odpowiednio 32% oraz 31% zawartości początkowej tego składnika. Po kolejnym miesiącu składowania w badanych próbkach stwierdzono jedynie śladowe ilości witaminy C. Należy wspomnieć, że przy niższych stężeniach witamina C może wykazywać nawet pewne działanie ochronne na te barwniki, zaś przy wysokich działa prooksydacyjnie na antocyjany [6, 13, 14].

Badania soków na zawartość polifenoli ogółem w próbkach kontrolnych (rys. 2) wykazały 189,9 mg/100ml tych związków, a w próbkach z pektyną 173,8 mg/100 ml. Zmienność wyjściowej zawartości związków polifenolowych wynika między innymi z różnicy ich ilości w obrębie surowca, ponieważ każdą partię soku otrzymywano odrębnie. Należy dodać, że różnice zawartości związków polifenolowych zależą także od stopnia dojrzałości, odmiany oraz warunków przechowywania surowca [1, 9].

W trakcie przechowywania obserwowano tendencję spadkową zawartości polifenoli. Po 3 miesiącach przechowywania w próbkach kontrolnych pozostało 90% początkowej ilości badanych związków, zaś we wzbogacanych pektyną 95%. Stosunkowo małe zmiany ilości związków polifenolowych przy jednoczesnych dużych różnicach pojemności przeciwutleniającej wymagają zastosowania bardziej selektywnych metod oznaczania polifenoli. Stosowany odczynnik Folina-Ciocalteu'a może wykazywać reaktywność także w stosunku do innych substancji występujących w badanym układzie. Powoduje to, że równocześnie mogą być oznaczane zarówno polifenole spolimeryzowane, jak i inne niefenolowe metabolity, co w następstwie nie daje dokładnego obrazu zmian [3, 10]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku układów zawierających barwniki antocyjanowe, które w czasie przechowywania mogą polimeryzować i tworzyć wysokocząsteczkowe układy wytrącające się z roztworu [2].



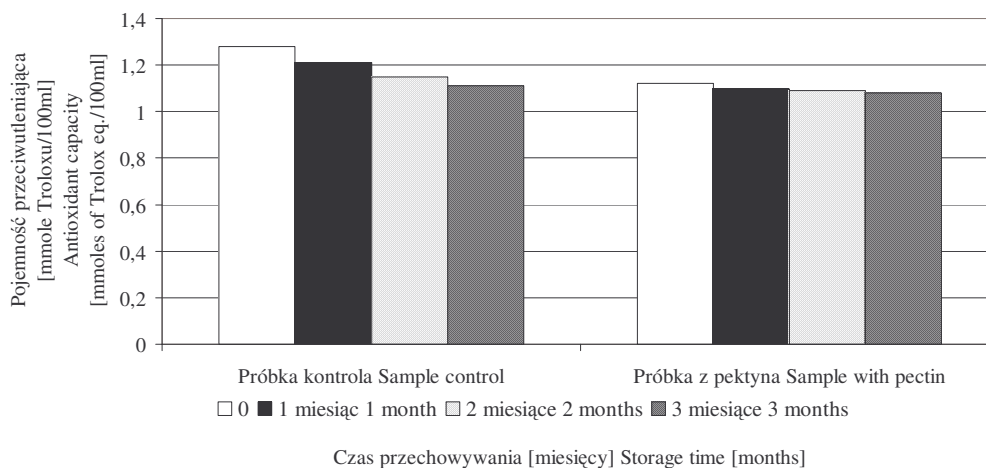
Rys. 2. Zmiany zawartości polifenoli ogółem w sokach malinowych w trakcie przechowywania.

Fig. 2. Changes in contents of polyphenols in raspberry juices during storage.

Polimeryzacja może w znacznym stopniu zafałszować pomiary zdolności przeciwutleniającej, co, w połączeniu z absorbancją antocyjanów w podobnym zakresie jak DPPH, może być źródłem poważnych błędów [11]. Właściwości prozdrowotne soków determinowane są zawartością polifenoli, których aktywność określa się poprzez pomiar ilości zmieczonego DPPH. Dlatego każda próbka analizowana była pod względem zdolności zmiatania wolnych rodników (rys. 3).

Największe procentowe zmiany pojemności przeciwutleniającej występowały w próbce kontrolnej bez dodatków, a po 3 miesiącach przechowywania pozostało 82% pierwotnej jej wartości. W próbkach z dodatkiem pektyny pojemność przeciwutleniająca zmieniała się w mniejszym stopniu. Po trzech miesiącach przechowywania stanowiła ona 94% wartości próbki kontrolnej, co świadczy o potencjalnej zasadności dodawania tych substancji do przetwarzanych produktów spożywczych.

Istotne wydawało się także skorelowanie zawartości antocyjanów oraz polifenoli z pojemnością przeciwutleniającą. Współczynniki korelacji wyniosły odpowiednio $r = 0,5936$ i $r = 0,9014$, co potwierdza wcześniejsze spostrzeżenia, że antocyjany odpowiadają w znacznie mniejszym stopniu za pojemność przeciwutleniającą przetworów z malin niż pozostałe (często jeszcze nie oznaczone) polifenole. Dlatego konieczne są dalsze badania celem oszacowania oddziaływań pomiędzy składnikami soków oraz wpływu tych efektów na całkowitą pojemność przeciwutleniającą.



Rys. 3. Zmiany pojemności przeciwutleniającej w przechowywanych sokach malinowych.
Fig. 3. Changes in antioxidant capacity in stored raspberry juices.

Wnioski

1. Wykazano, że 0,1% dodatek preparatów pektyn niskometylowanych do soków malinowych spowalnia tempo rozkładu barwników antocyjanowych.
2. Dodatek pektyn niskometylowanych do soków malinowych powoduje spowolnienie przemian związków polifenolowych, a tym samym wpływa na mniejsze zmiany całkowitej pojemności przeciwutleniającej.
3. Pomiędzy zawartością frakcji antocyjanowej oraz polifenolowej a pojemnością przeciwutleniającą soków malinowych zachodzi dodatnia korelacja o współczynnikach korelacji, odpowiednio, $r = 0,5936$ i $r = 0,9014$.

Literatura

- [1] Ancos B., Gonzalez E., Cano M. P.: Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. *Z. Lebensm. Unters Forsch. A*, 1999, **208**, 33 - 38.
- [2] Baranac J. M., Petranović N. A., Dimitrić-Marković J. M.: Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 1333 -1336.
- [3] Bermúdez-Soto M. J., Tomás-Barberán F. A.: Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices *Eur. Food Res Technol*, 2004, **219**, 133 - 141.
- [4] Dervisi P., Lamb J., Zabetakis I.: High pressure processing in jam manufacture: effects on textural and colour properties. *Food Chem.*, 2001, **73**, 85 - 91.
- [5] Fuleki T., Francis F.J.: Quantitative methods for anthocyanins. *J. Food Sci.*, 1968, **33**, 72.
- [6] Heins A., Stöckmann H., Schwarz K.: Designing „anthocyanin-tailored” food composition. In: *Biologically-active phytochemicals in food: Analysis, bioavailability and function*. Royal Soc. Chem., 2001, pp. 281 - 377.
- [7] Iversen C. K.: Black currant nectars: Effect on processing and storage on anthocyanins and ascorbic acid content. *J. Food Sci.*, 1999, **64**, 1, 37 - 41.
- [8] Murakami M., Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T.: Effects of ascorbic acid and α -tocopherol on antioxidant activity of polyphenolic compounds. *Food Chem. Toxicol.*, 2003, **68**, 5, 1622 - 1625.

- [9] Kalt W.: Effect of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *J. Food Sci.*, 2005, **70**, 1, R11 - R19.
- [10] Kähkönen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J., Pihlaja K., Kujala T. S., Heinonen M.: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds., *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 10, 3954 -3962.
- [11] Oszmiański J., Wolniak M., Wojdyło A., Wawer I.: Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices. *J. Sci. Food Agric.* (przyjęto do druku).
- [12] Rubinskiene M., Viskelis P., Jasutiene I., Viskeliene B., Bobinas C.: Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Res. Int.*, 2005, **38**, 867 - 871.
- [13] Sarma A. D., Sreelakshimi Y., Sharma R. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. *Phytochemistry*, 1997, **45**, 671 - 674.
- [14] Stasiak A., Pawlak M., Sosnowska D., Wilska-Jeszka J.: Szybkość degradacji barwników antocyjanowych i kwasu askorbinowego w roztworach o różnym stężeniu sacharozy. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1991, **12**, 21 - 24.
- [15] Stewart D., Deighton N., Davies H. V.: Antioxidants in soft fruit. <http://www.scri.sari.ac.uk/Document/AnnReps/01Indiv/15Antiox.pdf>. *Plant Biochem. Cell Biol.*, 94 - 98.
- [16] Wilska-Jeszka J., Podśędek A.: Bioflawonoidy jako naturalne antyoksydanty. *Wiad. Chem.*, 2001, **55**, 11-12, 987 - 1003.

CHANGES OF PHENOLICS COMPOUNDS DURING THE STORAGE OF RASPBERRY JUICES

S u m m a r y

The objective of this study was to present changes in the level of anthocyanins, polyphenols and antioxidant activity in raspberry juices without and with pectin during their storage at 4°C. The anthocyanin content in fresh juices without and with pectin was 97,34 mg/100 ml and 93,5 mg/100 ml respectively. The pelargonidyno-3-soforozyd was the main monomer (72% of all anthocyanin composition). After 3 months storage at 4°C anthocyanin content in juices without and with pectin decrease to 23% and 16%, respectively. It was shown that content of polyphenols and antioxidant activity was reduced during storage. However unprofitable changes were smaller in juices with pectin.

During storage the decrease in polyphenol content was observed, what resulted in lowering the antioxidant capacity. In case of juice without pectin the decrease reached 18% of initial value, while with the addition of pectin it was only 6%.

Key words: raspberries, juice, anthocyanins, polyphenols, antioxidant activity, EPR, free radicals ☒