

URSZULA SAMOTYJA, MARIA MAŁECKA, INGA KLIMCZAK

SKŁAD I WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWRODNIKOWE FENOLOKWASÓW SŁODU

Streszczenie

Kwasy fenolowe należą do istotnych składników roślinnych surowców żywnościowych ze względu na ich przeciwutleniające właściwości. W pracy oznaczono ogólną zawartość związków fenolowych oraz zidentyfikowano i dokonano ilościowej analizy następujących fenolokwasów: ferulowego, kawowego, sinapinowego i p-kumarowego w słodzie wyprodukowanym z dwóch odmian jęczmienia. W największych ilościach występował kwas ferulowy. Ponad 90% kwasów fenolowych występowało w postaci związanej. Dokonano również oceny właściwości przeciwrodnikowych kwasów fenolowych zidentyfikowanych w słodzie. Największą aktywność przeciwrodnikową w teście z DPPH[•] wykazał kwas sinapinowy.

Wstęp

Związki fenolowe występują powszechnie w surowcach roślinnych i obejmują grupę flawonoidów oraz kwasów fenylokarboksylowych i fenylopropenowych. W ostatnich latach poświęcono wiele uwagi przeciwutleniającym właściwościom tych związków [10] oraz wyjaśnieniu ich roli w mechanizmie obronnym organizmu przeciw stresowi oksydacyjnemu, związanemu z obecnością nadmiernej ilości wolnych rodników [4]. Efekty korzystnego oddziaływania związków fenolowych wynikają głównie ze zdolności do dezaktywacji wolnych rodników, kompleksowania metali oraz obniżania aktywności enzymów katalizujących utlenianie [5, 9].

Związki fenolowe występują w wielu surowcach pochodzenia roślinnego – owocach, warzywach, ziarnach zbóż, roślinach przyprawowych [16], a także przetworzonej żywności, np. w wyrobach przemysłu fermentacyjnego, m.in. w piwie [7].

Słód jęczmienny, stosowany w procesie produkcji piwa, dostarcza 80% ogółu związków fenolowych. Pozostała ilość polifenoli zawartych w piwie pochodzi z

chmielu oraz, w niewielkiej części, jest produktem przemian metabolicznych drożdży [14]. Należy podkreślić znaczną rolę związków fenolowych w technologii browarnictwa, a zwłaszcza ich wpływ na kształtowanie jakości piwa [17]. Podczas procesu słodowania zachodzi degradacja lipidów [3]. W wyniku utleniania kwasu linolowego, który stanowi 50–60% kwasów tłuszczowych zawartych w tłuszczu jęczmienia, tworzy się m.in. trans 2–nonenal. W dużej mierze przyczynia się on do powstania niepożądanego smaku piwa, określanego jako „kartonowy” [8]. Podobnie jak i inne substancje o działaniu przeciwutleniającym występujące w słodzie, związki fenolowe zapobiegają pogarszaniu cech sensorycznych, głównie w początkowym etapie procesu piwowarskiego [6]. Jednakże zbyt wysoka zawartość niektórych kwasów, głównie ferulowego, może wpływać na obniżanie się stabilności cech smakowo–zapachowych piwa. W wyniku dekarboksylacji kwasu ferulowego powstaje 4-winyloguajakol, związek o niekorzystnym wpływie na cechy sensoryczne napoju [2].

Celem pracy było oznaczenie ogólnej ilości związków fenolowych oraz jakościowo – ilościowa analiza fenolokwasów w słodzie otrzymanym z dwóch odmian jęczmienia, a także ocena właściwości przeciwrodnikowych kwasów fenolowych obecnych w słodzie.

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowiły próby słodu jęczmiennego, otrzymanego z dwóch odmian jęczmienia: Brenda i Rudzik¹.

Kwasy fenolowe: kawowy, ferulowy, sinapinowy oraz p–kumarowy pochodziły z firmy Sigma – Aldrich (Niemcy). 2,2–difenylo–1–pikrylhydrazyl (DPPH') został wyprodukowany przez firmę Sigma – Aldrich (Szwajcaria).

Oznaczenie ogólnej zawartości związków fenolowych w słodzie

Ekstrakcję wolnych związków fenolowych oraz hydrolizę związanych związków fenolowych przeprowadzano według metodyki opracowanej przez Maillard [6]. Rozdrobnione próbki słodu ekstrahowano metanolem, stosując trzy etapy wytrząsania. Po każdym etapie zlewano płyn z nad osadu i uzupełniano nową objętością rozpuszczalnika. Połączone ekstrakty odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem i rozpuszczano w etanolu.

Pozostałą, po ekstrakcji wolnych związków fenolowych, śrutę hydrolizowano przez 4 godziny w temperaturze otoczenia i atmosferze azotu, przy użyciu 2N NaOH, po czym ekstrahowano uwolnione związki fenolowe i sporządzano ekstrakty etanolewe.

¹ W tekście w celu uproszczenia stosowano skróty „słód Brenda” i „słód Rudzik” jako określenia sładów otrzymanych z odmian jęczmienia Brenda i Rudzik.

Zawartość związków fenolowych w ekstraktach ze słodu oznaczano metodą Folina-Ciocalteu [15] i wyrażano w przeliczeniu na kwas kawowy.

Identyfikacja i ilościowe oznaczanie fenolokwasów w ekstraktach słodowych techniką HPLC

Analizę jakościową i ilościową wolnych kwasów fenolowych przeprowadzano za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczowego firmy Waters. Do rozdzielania wykorzystano kolumnę NovaPak C₁₈ (3,9x150 mm, 5 μm) firmy Waters. Zastosowano elucję gradientową. Fazę ruchomą stanowiły rozpuszczalniki: acetonitryl oraz woda z 2% (v/v) dodatkiem kwasu octowego. Prędkość przepływu wynosiła 0,6 cm³/min. Detekcji badanych związków dokonywano za pomocą detektora fotodiodowego UV-VIS przy długości fali λ=280 nm w przypadku kwasu kawowego, a w odniesieniu do kwasów: p-kumarowego, ferulowego i sinapinowego przy λ=310 nm. Kwasy fenolowe identyfikowano i oznaczano ilościowo przez porównanie czasów retencji i powierzchni pików badanych związków z czasami i powierzchnią pików ich wzorców.

Badanie aktywności przeciwrodnikowej fenolokwasów występujących w słodzie

Badanie aktywności przeciwrodnikowej kwasów fenolowych przeprowadzano w oparciu o metodykę opracowaną przez Sanchez-Moreno i wsp. [13], z modyfikacją polegającą na ustaleniu częstotliwości pomiarów i zakresu stężeń fenolokwasów w badanym układzie oraz użyciu etanolowego roztworu DPPH'. Oceniano zdolność poszczególnych fenolokwasów do wygaszania rodnika DPPH'. Etanolowy roztwór DPPH' wykazuje silną absorbancję przy λ=515 nm. Oznaczenie polega na pomiarze spadku absorbancji, który zachodzi podczas inkubacji etanolowego roztworu DPPH' z fenolokwasem. Pomiarów dokonywano przy użyciu spektrofotometru Genesys 2 firmy Milton Roy.

Stężenie DPPH' w układzie reakcyjnym obliczano na podstawie sporządzonej krzywej wzorcowej. Zawartość niewygaszonego (pozostałego w układzie) rodnika DPPH' obliczano na podstawie początkowej ilości rodnika DPPH' w układzie reakcyjnym oraz jego stężenia po czasie t.

Wyznaczano trzy parametry:

- EC₅₀ – definiowany jako stężenie przeciwutleniacza potrzebne do obniżenia początkowej zawartości DPPH' o połowę;
- T_{EC50} – określający czas potrzebny do osiągnięcia stałego stężenia DPPH' przy stężeniu przeciwutleniacza odpowiadającym EC₅₀;
- AE – będący miarą aktywności przeciwrodnikowej. Parametr ten wyznaczano z równania:

$$AE = 1 / EC_{50} \cdot T_{EC 50}$$

Wyniki i dyskusja

Ogólną zawartość związków fenolowych w próbkach słodów przedstawiono w tab. 1. Wyraźne jest zróżnicowanie badanych próbek słodów pod względem zawartości związków fenolowych oznaczonych przed i po hydrolizie, a także ich sumarycznej ilości. Słód z jęczmienia odmiany Rudzik zawierał o ponad 25% więcej związków fenolowych niż słód otrzymany z jęczmienia Brenda. Prezentowane wyniki stanowią średnią z trzech równoległych oznaczeń.

Tabela 1

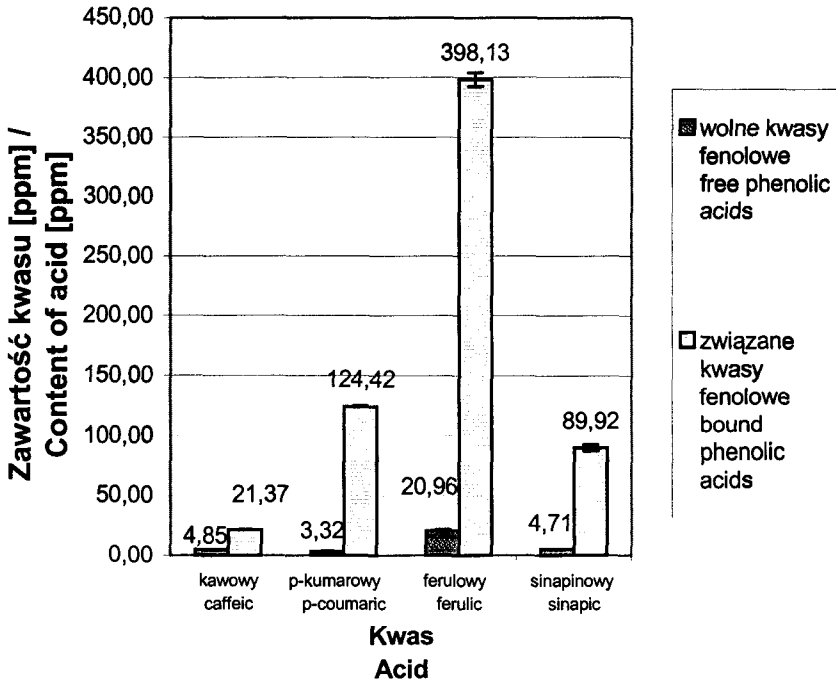
Zawartość związków fenolowych ogółem i zawartość fenolokwasów w próbach siodu.
Total phenolic compounds and phenolic acids content in barley.

| Odmiana jęczmienia Barley's variety | Zawartość związków fenolowych ogółem [ppm] Total phenolic compounds content [ppm] | | | Zawartość kwasów fenolowych oznaczonych techniką HPLC [ppm] Phenolic acids content measured by HPLC [ppm] | | |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| | przed hydrolizą before hydrolysis | po hydrolizie hydrolyzed | ogółem total | przed hydrolizą before hydrolysis | po hydrolizie hydrolyzed | ogółem total |
| Brenda | 1220 | 1850 | 3070 | 33,85 | 633,84 | 667,69 |
| Rudzik | 1430 | 2460 | 3890 | 40,05 | 543,78 | 583,83 |

Badane próby zawierały od 583,8 ppm s.m. (Rudzik) do 667,7 ppm s.m. (Brenda) kwasów fenolowych, przy czym ponad 90% fenolokwasów występowało w formie związanej ze śrutą i nie uległo bezpośredniej ekstrakcji przy użyciu metanolu. Udział kwasów fenolowych w ogólnej ilości związków fenolowych w słodzie z jęczmienia odmiany Brenda był większy niż w przypadku siodu z odmiany Rudzik i stanowił odpowiednio 22% i 15% (tab. 1).

Badane próbki słodów charakteryzowały się zbliżoną zawartością fenolokwasów w porównaniu z odmianami wykorzystywanymi w browarnictwie we Francji. Maillard i Berset [6] stwierdziły od 300 do 700 ppm (s.m.) fenolokwasów w próbach różnych słodów.

Profil fenolokwasów siodu Brenda oraz Rudzik przedstawiono na rys. 1. i 2. W obu próbach słodów zidentyfikowano i oznaczono ilościowo następujące fenolokwasy: kawowy, p-kumarowy, ferulowy i sinapinowy. Przedstawione wartości stanowią średnią z trzech oznaczeń.



Rys. 1. Kwasy fenolowe słodu Brenda.

Fig. 1. Phenolic acids profile of malt from barley variety Brenda.

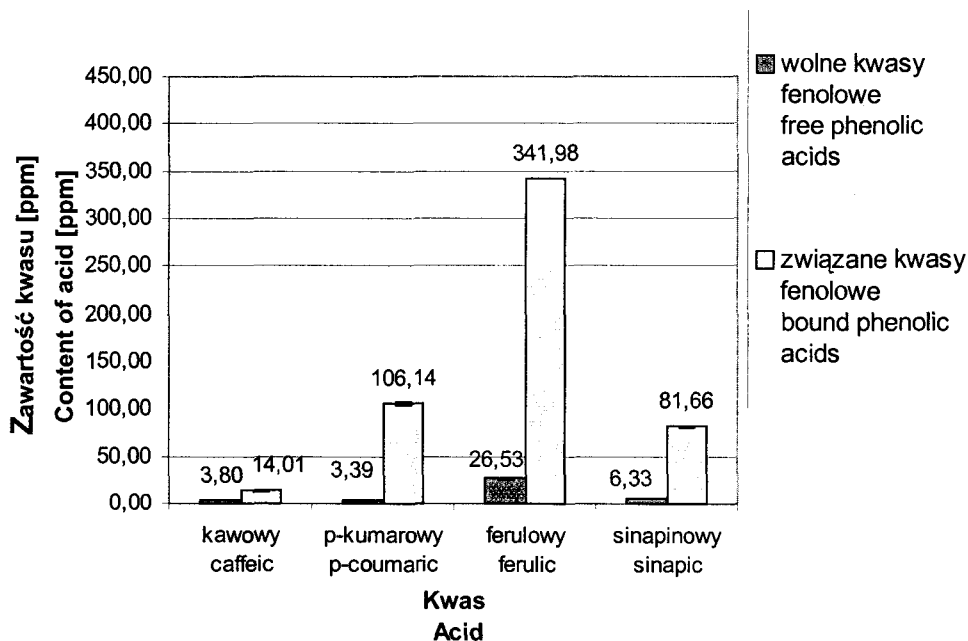
Głównym wolnym fenolokwasem występującym w słodzie z odmiany Brenda był kwas ferulowy. Stanowił on prawie 62% całkowitej zawartości zidentyfikowanych wolnych fenolokwasów. Pozostałe kwasy fenolowe występowały w mniejszej ilości: kwas kawowy – ponad 14%, sinapinowy – 13,9%, p-kumarowy – 10% ogólnej ilości wolnych kwasów fenolowych.

Znacznie większe ilości kwasów fenolowych występowały w słodach w postaci związanej z frakcją błon komórkowych. Kwas ferulowy stanowił większość związanych fenolokwasów słodu z odmiany jęczmienia Brenda (około 63%). Związany kwas p-kumarowy występował w ilości około 20%, a sinapinowy stanowił ponad 14% sumy związanych fenolokwasów. Najmniej było kwasu kawowego.

W przypadku słodu z jęczmienia Rudzik, również kwas ferulowy stanowił większość wolnych fenolokwasów (66% ogólnej ilości zidentyfikowanych wolnych kwasów fenolowych). Prawie 16% stanowił kwas sinapinowy. Kwasy: kawowy i p-kumarowy występowały w mniejszych ilościach.

Blisko 2/3 związanych kwasów fenolowych słodu Rudzik stanowił kwas ferulowy. 20% ogólnej ilości nierozpuszczalnych fenolokwasów stanowił kwas p-kumarowy, a 15% – kwas sinapinowy. Związany kwas kawowy występował w niewielkiej ilości.

Badania przeprowadzone przez Ahluvalia i Fry [1] również wykazały, że dominującym fenolokwasem słodu jest kwas ferulowy.

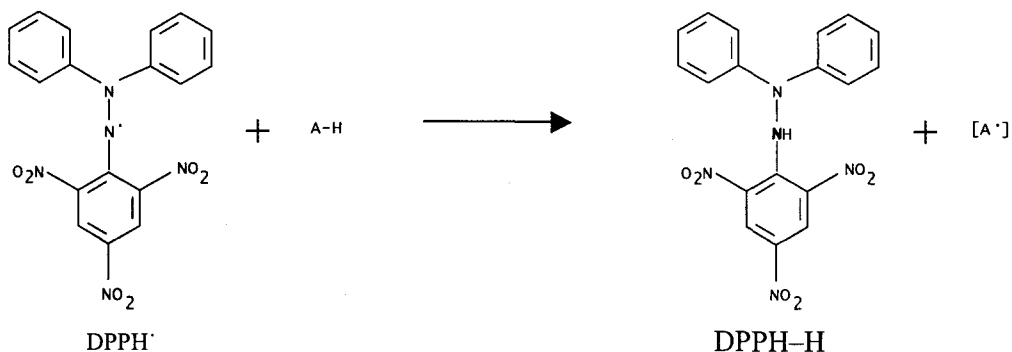


Rys. 2. Kwasy fenolowe słodu Rudzik.

Fig. 2. Phenolic acids profile of malt from barley variety Rudzik.

Po porównaniu zawartości kwasów fenolowych w badanych próbkach słodu stwierdzono, że sól z odmiany jęczmienia Rudzik zawierał większą ilość wolnych fenolokwasów niż sól z odmiany Brenda. Natomiast w przypadku związanych kwasów fenolowych, sól Brenda charakteryzował się większą ich zawartością. Zróżnicowanie słodów otrzymanych z różnych odmian jęczmienia może mieć istotny wpływ na profil związków fenolowych wyprodukowanego piwa, co wiąże się również z jakością sensoryczną i trwałością gotowego napoju. Stwierdzono znaczne różnice w ilościowo-jakościowym składzie fenolokwasów w różnych polskich piwach [12].

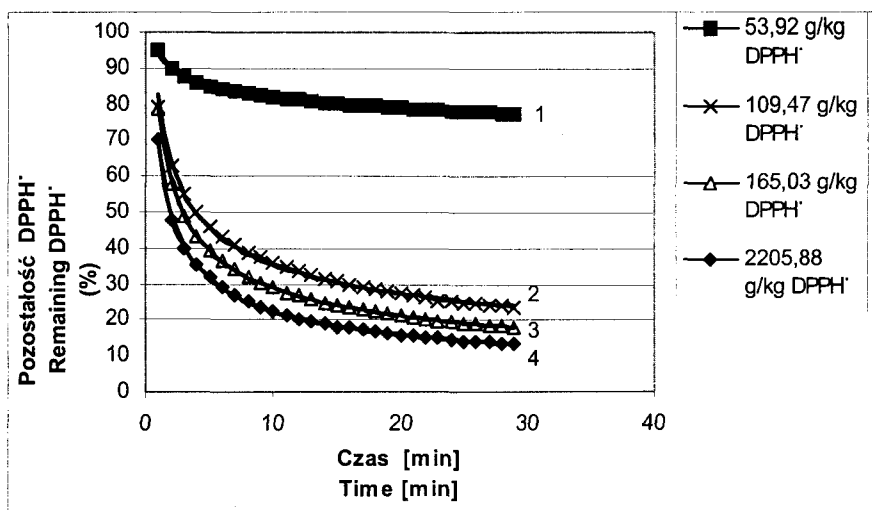
Jednym z mechanizmów przeciwutleniającego działania związków fenolowych jest zdolność do wygaszania wolnych rodników. Przeciwnodnikowe właściwości fenolokwasów zidentyfikowanych w badanych próbkach słodu oceniono w teście z DPPH' (2,2-difenylo-1-pikrylhydrazyl), w którym bada się spadek absorbancji etanolewego roztworu DPPH', mierzony przy $\lambda = 515$ nm, zachodzący w wyniku wygaszania rodnika DPPH' przez dany fenolokwas. Reakcja wolnorodnikowa może zachodzić w poniżej przedstawiony sposób:



gdzie:

DPPH-H – zredukowana forma rodnika DPPH•

A-H – przeciwutleniacz fenolowy.



$$1 - y = 93,597 x^{-0,0565}; R^2 = 0,9949$$

$$2 - y = 82,330 x^{-0,3668}; R^2 = 0,9981$$

$$3 - y = 79,741 x^{-0,4415}; R^2 = 0,9997$$

$$4 - y = 69,452 x^{-0,4912}; R^2 = 0,9993,$$

gdzie: x – czas/time, y – pozostałość niewygaszonego rodnika DPPH• w układzie/remaining DPPH•

Rys. 3. Wygaszanie rodnika DPPH• przez kwas ferulowy.

Fig. 3. Kinetic behaviour of ferulic acid during incubation with DPPH•.

Reakcję wygaszania rodnika DPPH• przez badane fenolokwasy można opisać za pomocą równania potęgowego. Przykładowe krzywe ilustrujące wygaszanie DPPH• podczas inkubacji z kwasem ferulowym przedstawiono na rys. 3.

W miarę wzrostu stężenia fenolokwasu zwiększało się nachylenie krzywej i zmniejszała ilość niewygaszonego DPPH•. W przypadku stosowania takich samych

stężeń różnych związków, wartość nachylenia umożliwiłaby porównanie ich właściwości przeciwrodnikowych.

Wartości parametrów EC_{50} i $T_{EC_{50}}$ przedstawiono w tab. 2. Spośród fenolokwasów słodu, kwas ferulowy charakteryzował się najmniejszą wartością EC_{50} , co oznacza, iż do wygaszenia 50% rodników DPPH[·] potrzebne jest mniejsze jego stężenie niż w przypadku innych kwasów fenolowych. Z kolei biorąc pod uwagę aktywność fenolokwasów o stężeniu, przy którym następuje wygaszenie połowy rodników DPPH[·] (EC_{50}), kwas sinapinowy działał najszybciej (najmniejsza wartość $T_{EC_{50}}$).

Parametr AE pozwala na obiektywne porównanie aktywności przeciwutleniającej badanych związków, gdyż uwzględnia zarówno stężenie przeciwutleniacza niezbędne do obniżenia początkowej ilości DPPH[·] o połowę, jak i czas, w którym to nastąpi. Pozwala więc porównywać związki o podobnych parametrach EC_{50} , ale charakteryzujących się różnymi czasami $T_{EC_{50}}$ (lub odwrotnie – zbliżone $T_{EC_{50}}$, zróżnicowane EC_{50}).

Sanchez–Moreno i wsp.[13] sklasyfikowali przeciwutleniacze w czterech grupach, w zależności od wartości aktywności przeciwrodnikowej ($AE \leq 1 \cdot 10^{-3}$ – aktywność niska; $AE > 1 \cdot 10^{-3}$ i $\leq 5 \cdot 10^{-3}$ – aktywność średnia; $AE > 5 \cdot 10^{-3}$ i $\leq 10 \cdot 10^{-3}$ – aktywność wysoka; $AE > 10 \cdot 10^{-3}$ – aktywność bardzo wysoka). Badane kwasy fenolowe słodu należą do przeciwutleniaczy o średniej aktywności przeciwrodnikowej (tab. 2).

Tabela 2

Aktywność przeciwrodnikowa fenolokwasów.
Antiradical efficiency of phenolic acids.

| Kwas fenolowy Phenolic acid | Zakres stężeń Ranges of concentrations (g/kg DPPH [·]) | EC_{50} ^a (g/kg DPPH [·]) | $T_{EC_{50}}$ ^b (min) | AE ^c ($\times 10^{-3}$) | Klasa aktywności Classification |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|
| Kawowy Caffeic | 147 – 294 | 112 | 5,2 | 1,72 | średnia medium |
| Ferulowy Ferulic | 109 - 2206 | 87 | 6,4 | 1,80 | średnia medium |
| Sinapinowy Sinapic | 92 - 138 | 106 | 3,7 | 2,56 | średnia medium |
| Syringinowy Syringic | 183 - 1838 | 192 | 14 | 0,37 | niska low |

a – stężenie przeciwutleniacza potrzebne do obniżenia początkowej zawartości DPPH[·] o 50%;

a – amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH[·] concentration by 50%.

b – czas potrzebny do osiągnięcia stałego stężenia DPPH[·] przy stężeniu przeciwutleniacza odpowiadającym EC_{50} ;

b – time needed to reach a steady state at the concentration corresponding to EC_{50} .

c – aktywność przeciwrodnikowa = $1/EC_{50} \cdot TEC_{50}$;

c – antiradical efficiency = $1/EC_{50} \cdot TEC_{50}$

Pewne różnice pomiędzy wartościami wyznaczonych parametrów, a podanymi w pracy Sanchez-Moreno i wsp.[13] mogą wynikać z zastosowania innego rozpuszczalnika, a także odmiennego sposobu określania końca spadku absorbancji. Badania przeprowadzone przez Sanchez-Moreno i wsp. [13] oraz Psomiadou i Tsimidou [11] wykazały, że kwasy: kawowy i ferulowy charakteryzują się wyższą aktywnością przeciwrodnikową niż np. BHA, DL- α -tokoferol, kwercetyna, resweratrol. Jednakże w porównaniu z kwasem askorbinowym, którego wartość AE wynosi $11,44 \cdot 10^{-3}$, są mniej aktywne.

Kwas p-kumarowy nie wykazywał właściwości przeciwrodnikowych w warunkach przeprowadzonego testu.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono zróżnicowanie próbek słodu pod względem zawartości związków fenolowych. W badanych ekstraktach słodowych zidentyfikowano i oznaczono ilościowo następujące fenolokwasy: ferulowy, kawowy, sinapinowy i p-kumarowy. Ponad 90% fenolokwasów występowało w formie związanej z frakcją błon komórkowych. W największych ilościach występował kwas ferulowy, natomiast największą aktywność przeciwrodnikową w teście z DPPH' wykazał kwas sinapinowy. Przeprowadzone badania wykazały duży udział związanych fenolokwasów wśród związków fenolowych słodu ogółem.

Literatura

- [1] Ahluwalia B., Fry S.C.: Barley endosperm cell walls contain a feruloylated arabinoxylan and a non-feruloylated β -glucan, *J. Cereal Sci.*, **4**, 1986, 287.
- [2] Debourg A.: Polepszanie organoleptycznej i fizykochemicznej stabilności piwa. Cz. II. Stabilność fizykochemiczna, *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, **10**, 1998, 18.
- [3] Doderer A., Kokkenlink I., Van der Veen S., Valk B.E., Schram A.W., Douma A.C.: Purification and characterization of two lipoxygenase isoenzymes from germinating barley, *Biochim. Biophys. Acta*, **1120**, 1992, 97.
- [4] Ho Ch.-T., Lee Ch.Y. (eds): Phenolic compounds in food and their effects on health – analysis, occurrence and chemistry, American Chemical Society, Washington 1992.
- [5] Madsen H.L., Andersen C.M., Jorgensen L.V., Skibsted L.H.: Radical scavenging by dietary flavonoids. A kinetic study of antioxidant efficiencies, *Eur. Food Res. Technol.*, **211**, 2000, 240.
- [6] Maillard M.-N., Berset C.: Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 1789.
- [7] Montanari L., Perretti G., Natella F., Guidi A., Fantozzi P.: Organic and phenolic acids in beer, *Lebens. – Wiss. u. – Technol.*, **32**, 1999, 535.
- [8] Noel S., Liegeois C., Lermusieau G., Bodart E., Badot C., Collin S.: Release of deuterated nonenal during beer aging from labeled precursors synthesizes in the boiling kettle, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1999, 4323.
- [9] Oszmiański J.: Polifenole jako naturalne przeciwutleniacze w żywności, *Przem. Spoż.*, **3**, 1995, 94.

- [10] Pekkarinen S.S., Stockmann H., Schwarz K., Heinonen I.M., Hopia A.I.: Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1999, 3036.
- [11] Psomiadou E., Tsimidou M.: On the role of squalene in olive oil stability, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1999, 4025.
- [12] Samotyja U., Małecka M., Klimczak I.: Skład frakcji wolnych fenolokwasów w piwie, *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, artykuł w druku.
- [13] Sanchez-Moreno C., Larrauri J. A., Saura – Calixto F.: A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food Agric.*, **76**, 1998, 270.
- [14] Sieliwanowicz B.: Przeciwutleniające właściwości fenoli piwa i ich potencjalne konsekwencje żywieniowe, *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, **4**, 1998, 9.
- [15] Singleton V.L., Rosi J.A.j.r.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 1965, 144.
- [16] Schwarz K., Bertelsen G., Nissen L.R., Gardner P.T., Heinonen M.I., Hopia A., Huynh – Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L.H., Tijburg L.: Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds, *Eur. Food Res. Technol.*, **212**, 2001, 319.
- [17] Walters M.T., Heasman A.P., Hughes P.S.: Comparison of (+) – catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer stability. Part 1: Forced – aging, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **55**, 1997, 83.

COMPOSITION AND ANTIRADICAL ACTIVITY OF PHENOLIC ACIDS OF MALT

Summary

Phenolic acids are interesting constituents of foodstuff of plant origin due to their antioxidant activity. Total phenolic compounds were determined and four phenolic acids (ferulic, caffeic, sinapic and p – coumaric) were identified and quantified in malt from two barley varieties. Ferulic acid has been identified as the most important quantitatively. Insoluble bound phenolic acids covered over 90% of total phenolic acids content. The antiradical efficiency of phenolic acids of malt was investigated using method based on the reaction with DPPH[•]. Sinapic acid appeared as the most effective radical scavenger. ☒