

URSZULA GAWLIK-DZIKI

ZMIANY POZIOMU ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH I WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWIUTLENIAJĄCYCH PŁYNÓW UZYSKANYCH PO TRAWIENIU *IN VITRO* CHLEBA PSZENNEGO

Streszczenie

Chleb otrzymany z mąki pszennej handlowej typu 500, o wilgotności 15%, poddano trawieniu w warunkach *in vitro*. Badania obejmowały określenie zmian zawartości związków fenolowych ogółem oraz flawonoidów i fenolokwasów uwalnianych podczas trawienia chleba *in vitro*, określenie ich zdolności do neutralizowania wolnych rodników, siły redukcji, zdolności do chelatowania jonów Fe(II) oraz zdolności do hamowania peroksydacji lipidów.

W miarę postępu procesu trawienia wzrastała ogólna zawartość związków polifenolowych (od 0,34 do 0,62 mg/ml) oraz flawonoidów (od 0,13 do 0,21 mg/ml). Najwyższą zawartością fenolokwasów (174,45 µg/ml) charakteryzowała się próba otrzymana po trawieniu symulowaną śliną. Zdolność do neutralizowania wolnych rodników DPPH wzrastała od 9,8% (po I etapie trawienia) do 19,6% (po III etapie trawienia), natomiast zdolność do redukcji malała w miarę postępu trawienia. Podobną zależność stwierdzono badając zdolność do chelatowania jonów Fe(II), która malała od 51,2% (po I etapie) do 22,3% (po III etapie). Zdolność do hamowania peroksydacji lipidów była najwyższa po trawieniu symulowanym płynem jelitowym (72,69%). Aktywność przeciwrodnikowa była uzależniona od zawartości związków fenolowych. Stwierdzono zależność pomiędzy zawartością flawonoidów a zdolnością do hamowania peroksydacji lipidów oraz zdolnością do chelatowania a zawartością fenolokwasów.

Słowa kluczowe: chleb pszenny, aktywność przeciwutleniająca, polifenole, trawienie *in vitro*

Wprowadzenie

Produkty pochodzące z ziarna zbóż są znaczącym składnikiem diety człowieka. Przeciętny Polak spożywa około 100 kg chleba rocznie (najwięcej w Europie). Obecnie coraz częściej zwraca się uwagę na zdrowotne i dietetyczne aspekty żywienia. Zboża są bogatym źródłem polifenoli, a wśród nich szczególnie liczną grupę stanowią kwasy hydroksycynamonowe [5]. Związki te budzą zainteresowanie jako termostabilne naturalne substancje o wielokierunkowym działaniu przeciwutleniającym. Najwięcej poli-

fenoli jest zlokalizowanych w zewnętrznej części warstwy aleuronowej i okrywie oraz w zarodku ziarna [16]. Są one najczęściej kowalencyjnie związane z polimerami ściany komórkowej i mogą być uwalniane podczas kwaśnej hydrolizy. W ziarnach zbóż występuje również frakcja rozpuszczalnych fenolokwasów, które można wyekstrahować mieszaniną rozpuszczalników o różnej polarności [5]. Biologiczne funkcje polifenoli zależą od ich przemian w przewodzie pokarmowym i struktury chemicznej powstałych metabolitów.

W niniejszej pracy podjęto próbę określenia zmian biodostępności i właściwości przeciwutleniających związków biologicznie czynnych w pieczywie pszennym w trakcie trawienia w ludzkim przewodzie pokarmowym.

Material i metody badań

Materiałem do badań był chleb otrzymany z mąki pszennej handlowej typu 500, o wilgotności 15%, otrzymany metodą wypieku bezpośredniego (jednofazowego) [8]. Trawienie w symulowanym układzie *in vivo* prowadzono następująco:

Etap I – 10 g chleba rozdrabniano i przenoszono ilościowo do zlewki. Do prób dodawano 30 ml symulowanej śliny (w 1 dcm³ wody destylowanej rozpuszczono 2,38 g Na₂HPO₄, 0,19 g KH₂PO₄ i 8 g NaCl. Roztwór doprowadzono do pH = 6,75 i dodano α -amylazę (E.C. 3.2.1.1.), uzyskując preparat enzymatyczny o aktywności 200 U/ml) [15] i wytrząsano 10 min w temp. 37°C.

Etap II – próby otrzymane po I etapie trawienia doprowadzono do pH = 1,2 używając 5 M HCl i dodawano 30 ml symulowanego płynu gastrycznego (0,32% roztwór pepsyny w 0,03M NaCl o pH = 1,2). Próby wytrząsano 120 min w temp. 37°C.

Etap III – po trawieniu płynem gastrycznym próby doprowadzono do pH = 6 za pomocą 0,1 M NaHCO₃ i dodawano 30 ml mieszaniny zawierającej ekstrakt z żółci i pankreatynę (0,05 g pankreatyny i 0,3 g ekstraktu z żółci (Sigma-Aldrich, USA) rozpuszczono w 35 ml 0,1M NaHCO₃) [3]. Tak przygotowane ekstrakty poddawano procesowi trawienia *in vitro* w ciągu 60 min.

Równolegle wykonano próbę wzorcową (wodny wyciąg z chleba). Wyniki analiz tego wyciągu i prób po I etapie trawienia nie różniły się istotnie, dlatego jako wzorzec odniesienia przyjęto próby otrzymane po trawieniu symulowaną śliną.

Badania obejmowały oznaczenie zawartości związków fenolowych ogółem [13] oraz flawonoidów [1] i fenolokwasów [4] uwalnianych podczas trawienia chleba *in vitro*, określenie ich zdolności do neutralizowania wolnych rodników [2], siły redukcji [11], zdolności do chelatowania jonów Fe(II) [7] oraz zdolności do hamowania katalizowanego przez hemoglobinę utleniania kwasu linolowego [10]. Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Związki fenolowe były uwalniane stopniowo podczas trawienia w symulowanych warunkach *in vitro*. Najmniejsze stężenie polifenoli stwierdzono w próbach otrzymanych po I etapie trawienia. Zawartość związków fenolowych wyraźnie wzrastała po II etapie trawienia, natomiast po trawieniu symulowanym płynem jelitowym nie stwierdzono istotnych zmian ich zawartości (tab.1) Trawienie spowodowało również zmiany zawartości flawonoidów, przy czym największy wzrost ich zawartości stwierdzono po III etapie. Najwięcej fenolokwasów zostało uwolnionych z chleba pszennego podczas trawienia symulowaną śliną. Po II etapie trawienia zaobserwowano zmniejszenie ich zawartości. Po zalkalizowaniu płynu trawiennego (III etap trawienia) zawartość wolnych fenolokwasów wzrosła prawie dwukrotnie.

Tabela 1

Zawartość związków fenolowych w płynach pozostałych po trawieniu *in vitro* chleba pszennego.
Content of phenolic compounds in liquids released during *in vitro* digestion of wheat bread.

Etap trawienia <i>in vitro</i> Stage of <i>in vitro</i> digestion	Zawartość związków fenolowych ogółem Total phenolics content [mg/ml]	Zawartość flawonoidów Total flavonoids content [mg/ml]	Zawartość fenolokwasów Total phenolic acids content [μg/ml]
I	0,34	0,12	174,45
II	0,60	0,14	15,55
III	0,63	0,20	30,32

Objaśnienia: / Explanatory notes:

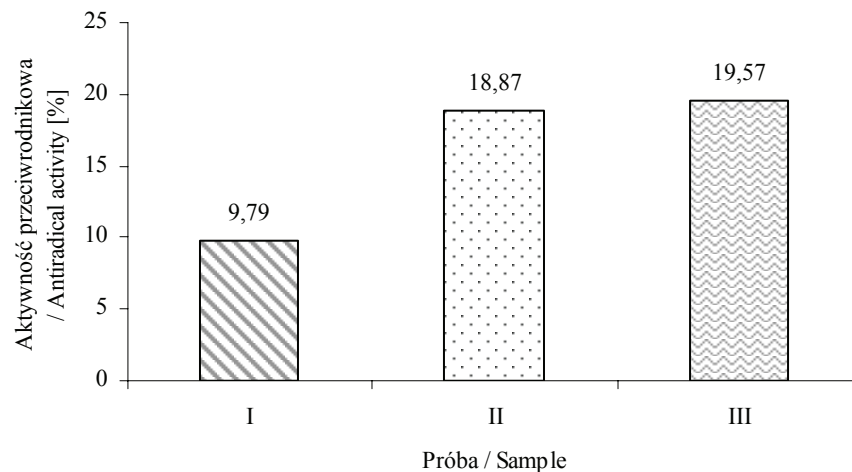
I - płyn po trawieniu symulowaną śliną / liquid after simulated saliva digestion,

II - płyn po trawieniu symulowanym płynem gastrycznym / liquid after simulated gastric fluid digestion,

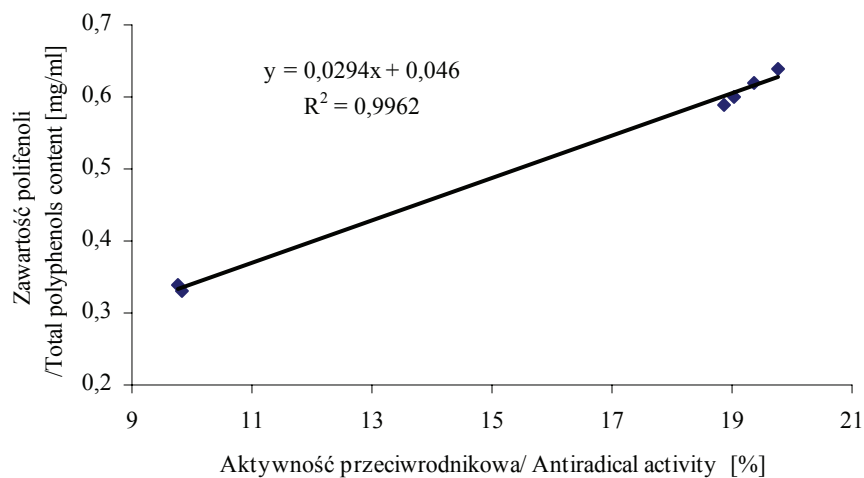
III- płyn po trawieniu symulowanym płynem jelitowym / liquid after simulated intestinal fluid digestion.

Po trawieniu symulowaną śliną, płynem gastrycznym i płynem jelitowym chleba pszennego otrzymano próby o nieznacznej aktywności przeciwrodnikowej. Aktywność przeciwrodnikowa wzrastała podczas inkubacji z roztworem DPPH i osiągała maksimum po 60 min. Najwyższą zdolnością do neutralizacji wolnych rodników charakteryzowała się próba otrzymana po trawieniu chleba symulowanym płynem gastrycznym (rys. 1).

Badając związek pomiędzy etapem trawienia, poziomem związków fenolowych i aktywnością przeciwrodnikową prób stwierdzono istnienie wprost proporcjonalnej zależności pomiędzy poziomem polifenoli a zdolnością do neutralizacji wolnych rodników (rys. 2)



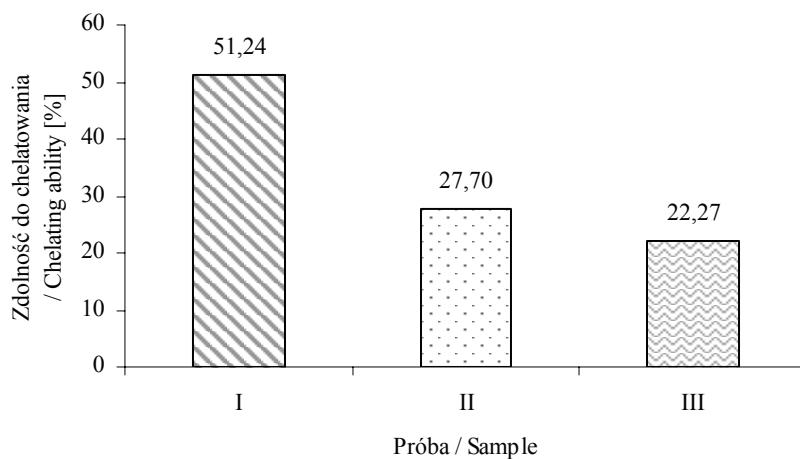
Rys. 1. Aktywność przeciwrodnikowa płynów pozostałych po trawieniu *in vitro* chleba pszennego.
Fig. 1. Antiradical activity of liquids after *in vitro* digestion of wheat bread.
Objaśnienia jak w tab.1./ Explanatory notes as in Tab.1.



Rys. 2. Zależność pomiędzy zdolnością do neutralizacji wolnych rodników a zawartością związków fenolowych.
Fig. 2. Relationship between antiradical activity and phenolic compounds content.

Znaczącą rolę w katalizie procesów oksydacyjnych prowadzących do powstawania rodników hydroksylowych i peroksydowych podczas reakcji Fentona odgrywa obecność jonów metali przejściowych. Procesy te można opóźnić poprzez chelatowanie i dezaktywację jonów żelaza. Płyny otrzymane po trawieniu *in vitro* chleba pszen-

nego wykazały zdolność do chelatowania jonów Fe(II). Była ona najwyższa po I etapie trawienia i zmniejszała się po II i III etapie (rys. 3).

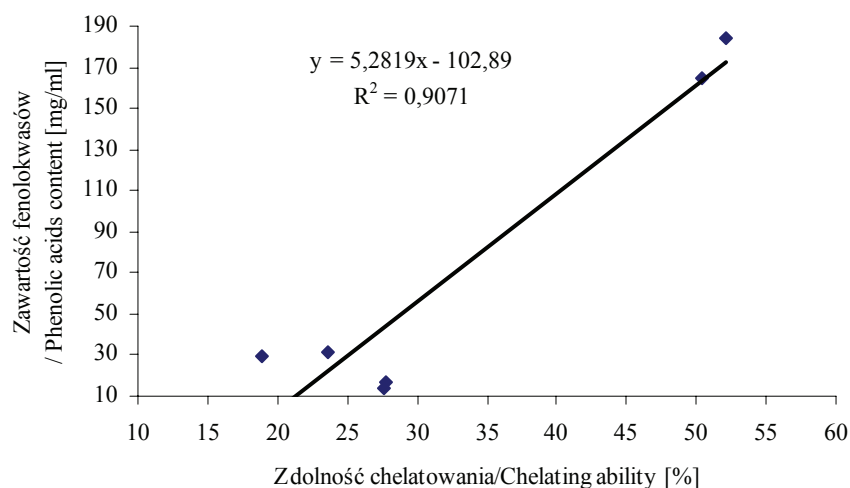


Rys. 3. Zdolność do chelatowania płynów pozostałych po trawieniu *in vitro* chleba pszennego.

Fig. 3. Metal-chelating ability of liquids after *in vitro* digestion of wheat bread.

Objaśnienia jak w tab. 1./ Explanatory notes as in Tab. 1.

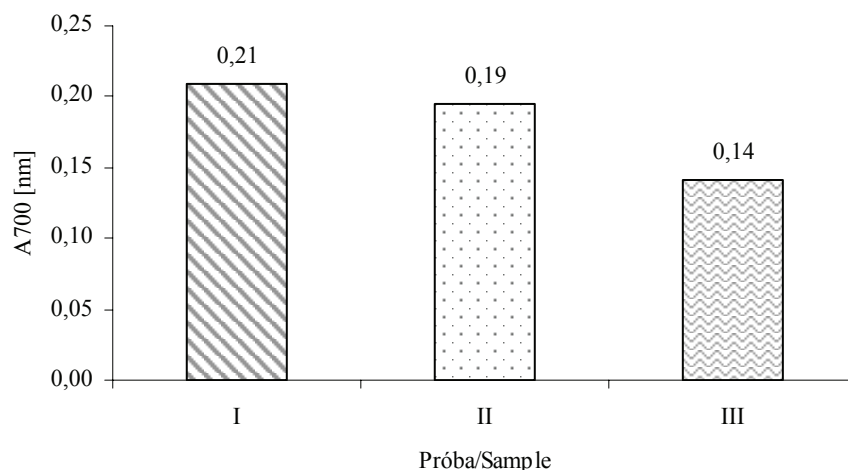
Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy zawartością fenolokwasów a zdolnością do chelatowania badanych prób (rys. 4).



Rys. 4. Zależność pomiędzy zdolnością do chelatowania a zawartością fenolokwasów.

Fig. 4. Relationship between metal-chelating ability and phenolic acids content.

Według wielu badaczy [8, 11] właściwości redukujące związków mogą być miernikiem jego aktywności przeciwutleniającej. Zdolność do redukcji Fe(III) jest powszechnie uważana za wyznacznik zdolności do oddawania elektronu. Analizując zdolność do redukcji badanych próbek stwierdzono, że była ona niewielka i nieznacznie malała po każdym etapie trawienia (rys. 5).



Rys. 5. Zdolność do redukcji płynów pozostałych po trawieniu *in vitro* chleba pszennego.

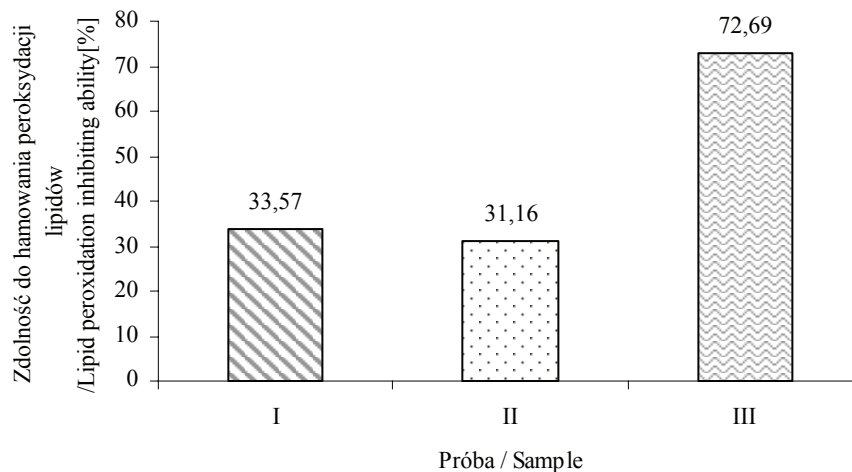
Fig. 5. Reducing power of liquids after *in vitro* digestion of wheat bread.

Objaśnienia jak w tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Niezwykle ważnym aspektem ochrony jest zabezpieczenie lipidów przed zmianami oksydacyjnymi [12]. W niniejszej pracy określono zdolność do hamowania katalizowanego przez hemoglobinę utleniania kwasu linolowego. Stwierdzono, że badane próby charakteryzowały się znaczącą aktywnością. Trawienie płynem jelitowym spowodowało ponaddwukrotny wzrost zdolności do hamowania peroksydacji lipidów w porównaniu z próbkami otrzymanymi po I i II etapie trawienia (rys. 6).

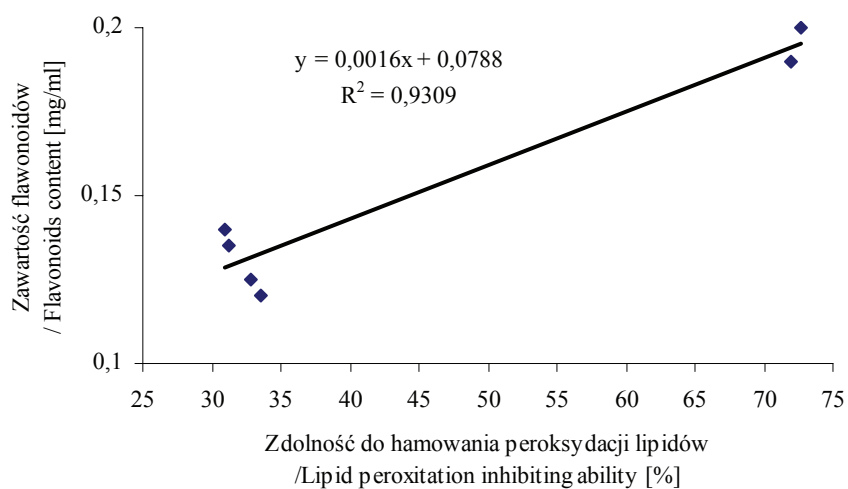
Zdolność do hamowania peroksydacji lipidów była uzależniona od zawartości flawonoidów w badanych próbkach (rys. 7).

Biologiczne funkcje polifenoli zależą od ich przemian w przewodzie pokarmowym i struktury chemicznej powstałych metabolitów. Prawdopodobnie końcowym etapem przemian kwasów fenolowych jest ich połączenie z kwasem glukuronowym lub siarkowanie, natomiast w przypadku flawonoli i flawanoli modyfikacja polega na metylacji. Zarówno glikozydy, jak i aglikony są wchłaniane w organizmach ludzi i zwierząt [6]. Możliwe jest, że estryfikacja kwasem glukuronowym i siarkowanie związków fenolowych wpływa na ich właściwości hydrofobowe i zdolność do delokalizacji elektronu, więc właściwości przeciwutleniające tak zmodyfikowanych związków mogą być odmienne od wykazywanych przez analogiczne aglikony [15]. Istnieje



Rys. 6. Zdolność do hamowania peroksydacji lipidów przez płyny pozostałe po trawieniu *in vitro* chleba pszennego.

Fig. 6. Ability of inhibition of lipid peroxidation by liquids after *in vitro* digestion of wheat bread. Objasnienia jak w tab. 1./ Explanatory notes as in Tab. 1.



Rys. 7. Zależność pomiędzy zdolnością do hamowania peroksydacji lipidów a zawartością flawonoidów.

Fig.7. Relationship between ability of inhibition of lipid peroxidation and flavonoids content.

niewiele danych dotyczących metabolizmu flawonoidów u ludzi. Związki te są metabolizowane w wątrobie i przez florę bakteryjną okrężnicy. Istnieją dane potwierdzające o-metylację, siarkowanie i podstawianie kwasem glukuronowym grup hydroksylowych flawonoidów w wątrobie. W okrężnicy ma miejsce rozszczepienie pierścienia aroma-

tycznego. Produkty dalszej degradacji, kwasy fenolowe, mogą być absorbowane i są wykrywane w moczu zwierząt [9].

Wnioski

1. Proces trawienia chleba pszennego spowodował uwolnienie związków polifenolowych z badanych prób, przy czym największa ich ilość uwolniona została po trawieniu symulowanym płynem gastrycznym. Trawienie symulowanym płynem jelitowym spowodowało znaczący wzrost zawartości flawonoidów, natomiast najwyższe stężenie fenolokwasów stwierdzono po trawieniu symulowaną śliną.
2. Płyny otrzymane po trawieniu *in vitro* pieczywa pszennego wykazywały niewielką zdolność do neutralizacji wolnych rodników. Aktywność przeciwrodnikowa wzrastała po II i III etapie trawienia i była skorelowana z zawartością związków fenolowych.
3. Zdolność do chelatowania Fe(II), skorelowana z zawartością fenolokwasów w badanych próbach, była najwyższa po I etapie trawienia i malała w miarę postępu procesu, podobnie jak zdolność do redukcji.
4. Wszystkie badane próby wykazały zdolność do ochrony lipidów przed utlenieniem, która była uzależniona od zawartości flawonoidów. Najwyższą aktywność stwierdzono w próbie po III etapie trawienia.

Praca była prezentowana podczas XXXVII Ogólnopolskiej Sesji Komitetu Nauk o Żywności PAN, Gdynia, 26 – 27.IX.2006.

Literatura

- [1] Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.-C., Pinkas M.: Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 1996, **46(II)**, **11**, 1086-1089.
- [2] Brand-Williams W., Cuvelier E., Berset C.M.: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 1995, **28**, 25-30.
- [3] Elles M., Blaylock M.J., Huang J.W., Gussman C.D.: Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements. *Food Chem.*, 2000, **71**, 181-18.
- [4] Farmakopea Polska, t. V, P. T. Farm., Warszawa 1999.
- [5] Gallardo C., Jimenez L., Garcia-Conesa M.-T.: Hydroxycinnamic acid composition and *in vitro* antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chem.*, 2006, **99**, 455-463.
- [6] Grajek W. (pod red): *Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty technologiczne, molekularne i analityczne*. WNT, Warszawa 2007.
- [7] Guo J-T., Lee H-L., Chiang S-H., Lin H-I., Chang C-Y.: Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan. *J. Food Drug Anal.*, 2001, **9/2**, 96-101.
- [8] Hinneburg I., Dorman H.J.D., Hiltuen R.: Antioxidants activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.*, 2006, **97**, 122-129.

- [9] Hollman P.C.H., Katan M.B.: Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoid in man. *Biomed. Pharmacol.*, 1997, **51**, 305-310.
- [10] Kuo J.M., Yeh D-B., Sun Pan B.: Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plant material. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3206-3209.
- [11] Oyaizu M.: Studies on products of browning reaction – Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutr.*, 1986, **44**, 307-315.
- [12] Santanam N., Ramachandran S., Parthasarathy S.: Oxygen radicals, antioxidants and lipid peroxidation. *Sem. Rep. End.*, 1998, **16**, 275-280.
- [13] Singleton V.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Etnol. Vitic.*, 1965, **16**, 144-158.
- [14] Tan Y.T. F., Kiang Pen K., Al-Manbali O.: Simultaneous determination of monophluorophosphate and fluoride. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2000, **1(3)**, article 24.
- [15] Virgili F., Pagana G., Bourne L., Rimbach G., Natella F., Rice-Evans C., Packer L.: Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a French maritime pine (*Pinus maritima*) bark extract. *Free Rad. Biol. Med.*, 2000, **28/8**, 1249-1256.
- [16] Zhou K., Yu L.: Antioxidant properties of bran extracts from Trego wheat grown at different locations. *J Agric Food Chem.*, 2004, **52**, 1112-1117.

CHANGES OF THE PHENOLIC COMPOUNDS LEVEL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LIQUIDS OBTAINED AFTER *IN VITRO* DIGESTION OF WHEAT BREAD

S u m m a r y

Bread obtained from wheat flour was digested in *in vitro* conditions. Changes of content of total phenolic compounds, flavonoids and phenolic acids released during *in vitro* digestion, determination of their ability to free radical scavenge, metal – chelating ability, reducing power and ability to inhibition of lipid peroxidation were evaluated.

During the *in vitro* digestion the content of total phenolics and flavonoids was increased from 0.34 to 0.62 mg/ml and from 0.13 to 0.21 mg/ml, respectively. The highest content of phenolic acids (174.45 µg/ml) was obtained in fluid after simulated saliva digestion. Ability of DPPH radical scavenging was increased from 9.8% (after simulated saliva digestion) to 19.6% (after simulated intestinal fluid digestion), whereas reducing power decreased during *in vitro* digestion. Similar relationship was obtained in the study of metal-chelating ability, which was decrease from 51.2% (after I stage) to 22.3% (after III stage). The highest ability of lipid peroxidation inhibition was obtained in sample after simulated intestinal fluid digestion (72.69%). Antiradical activity was correlated with total phenolic compounds content. Significant correlations between total flavonoids content and ability to inhibition of lipid peroxidation and with phenolic acids content and metal-chelating ability was found.

Key words: wheat bread, antioxidant activity, polyphenols, *in vitro* digestion ☒