

DOROTA SOSNOWSKA

ZMIANY AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ (+) KATECHINY W WYNIKU UTLENIANIA ENZYMATYCZNEGO

Streszczenie

(+) katechyna wykazuje cenne właściwości biologiczne, jest efektywnym zmiataczem wolnych rodników. W pracy badano wpływ enzymatycznego utleniania (+) katechiny na jej aktywność antyoksydacyjną. Proces utleniania (+) katechiny prowadzono przy udziale polifenolooksydazy (PPO) i tyrozynazy w pH 4 i 7. Aktywność antyoksydacyjną badanych roztworów określano dwoma metodami polegającymi na zmiataniu rodników: DPPH i ABTS. Zmiany zawartości (+) katechiny oraz produkty jej degradacji rejestrowano metodą HPLC i TLC. Szybkość utleniania (+) katechiny była wyższa w obecności PPO niż tyrozynazy. Obniżenie pH środowiska reakcyjnego z 7 do 4 powodowało zmniejszenie szybkości utleniania katechiny. Dwugodzinne utlenianie katechiny (PPO w pH 7) powodowało spadek zawartości tego monomeru o 57% i pojawienie się dimerów i tetramerów. Natomiast efektywność zmiatania stabilnego rodnika DPPH obniżyła się o 25% a ABTS tylko o 12%, co może sugerować, że produkty enzymatycznego utleniania (+) katechiny wykazują pewną aktywność antyoksydacyjną w stosunku do tych rodników.

Wstęp

Badania ostatnich lat wykazały, że cennym składnikiem owoców i warzyw strączkowych są flawanole należące do związków polifenolowych o szkielecie C₆-C₃-C₆. W tkankach roślin flawanole występują zarówno w formie monomerów flawan-3-oli czyli katechin, jak i w formie spolimeryzowanej jako proantocyjanidyny. Z uwagi na dużą liczbę grup hydroksylowych w cząsteczce są one związkami labilnymi, łatwo utleniają się, reagują między sobą i wchodzą w reakcje z innymi składnikami środowiska.

Katechiny są dobrymi substratami dla fenolooksydaz. Pierwszym produktem ich enzymatycznego utleniania są bardzo reaktywne chinony, które ulegają dalszym przemianom do brunatnych melanin, co obniża jakość produktów owocowych, szczególnie

jabłkowych. Na przebieg procesu enzymatycznego brunatnienia ma wpływ wiele czynników, a wśród nich: stężenie i rodzaj substratu, pH środowiska reakcyjnego, aktywność i powinowactwo substratowe polifenolooksydaz (PPO) [4, 6].

Z drugiej zaś strony flawanole wykazują cenne właściwości biologiczne, są bardzo efektywnymi zmiataczami wolnych rodników, które należą do czynników uszkadzających komórki i wywołujących mutacje i nowotwory. Skuteczność zmiatania przez (+) katechinę szczególnie groźnych dla zdrowia anionorodników ponadtlenkowych była 7-krotnie wyższa w porównaniu z kwasem askorbinowym [5], a jako czynnik opóźniający utlenienie LDL katechyna okazała się 10-krotnie skuteczniejsza niż kwas askorbinowy i aż 20-krotnie w porównaniu z α -tokoferolem [10].

Reasumując można stwierdzić, że katechiny są to związki nietrwałe, ulegające łatwo enzymatycznym i nieenzymatycznym przemianom wpływającym na cechy sensoryczne i wartość biologiczną przetworów owocowych.

Natomiast mało jest doniesień na temat wpływu powyższych przemian na aktywność antyoksydacyjną flawanoli.

Celem pracy było określenie zależności pomiędzy stopniem enzymatycznych przemian (+) katechiny, a jej aktywnością antyoksydacyjną.

Material i metody badań

Enzymatyczne utlenianie 0,6 mM (+) katechiny (Sigma) prowadzono z udziałem polifenolooksydazy (PPO) wyizolowanej z jabłek odmiany Lobo [8] lub tyrozynazy (Sigma) ($3,3 \cdot 10^4$ j.a./dm³) w buforze McIlvaine'a o pH 4,0 lub 7,0.

Zmiany zawartości (+)katechiny rejestrowano metodą HPLC [7]. Analizy wykonywano przy użyciu chromatografu cieczowego firmy Knauer wyposażonego w detektor UV-VIS i kolumnę LiChrospher-100, RP-18 (5 μ m). Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 cm³/min. Detekcję (+)katechiny prowadzono przy długości fali 280 nm. Fazę ruchomą stanowił układ rozpuszczalników: (A) acetonitryl; (B) woda redestylowana zakwaszona do pH 2,6 85% kwasem orto-fosforowym.

Do badania stopnia polimeryzacji stosowano chromatografię cienkowarstwową na silikażelu G-60 w układzie rozwijającym: toluen – aceton – kwas mrówkowy (3:3:1). Chromatogramy wywoływano 4% roztworem waniliny w CH₃OH/HCl (4:1) [3].

Właściwości przeciwutleniające oznaczano metodami polegającymi na spektrofotometrycznym pomiarze zmian stężenia barwnych rodników:

- 1) stabilnego rodnika DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl) – aktywność antyoksydacyjną podano jako stężenie antyoksydanta potrzebne do 50% redukcji DPPH. Czym mniejsza wartość liczbowa IC₅₀ tym wyższa aktywność antyoksydacyjna badanego związku [12],

2) kationorodnika ABTS⁺ (2,2'azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) – wyniki wyrażano jako TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) określający milimolowe stężenie troloxu odpowiadające stężeniu 1mM badanych antyoksydantów. Czym wyższa wartość liczbowa TEAC tym wyższa aktywność antyoksydacyjna badanego związku [9].

Wyniki i dyskusja

Katechiny obok kwasu chlorogenowego i kawowego są polifenolami najbardziej podatnymi na utlenianie enzymatyczne. Szybkość tego procesu zależy m.in. od rodzaju enzymu i pH środowiska. Dla polifenolooksydazy optymalne pH wynosi około 7, ale pH owoców i przetworów owocowych jest znacznie niższe i wynosi 3-4. Wobec tego badania szybkości enzymatycznej degradacji katechiny prowadzono w pH 4 i 7. W tab. 1. przedstawiono zmiany zawartości (+) katechiny w czasie enzymatycznego utleniania rejestrowane metodą HPLC.

Tabela 1

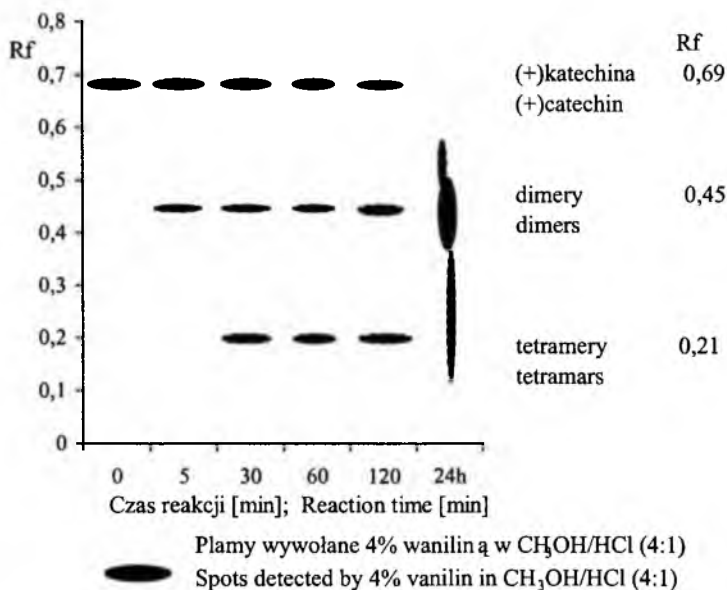
Zmiany zawartości (+) katechiny w wyniku enzymatycznego utleniania.
Changes of (+) catechin contents during enzymatic oxidation.

Czas reakcji Reaction time	Utlenianie katechiny w obecności PPO Enzymatic oxidation of catechin in the presence of PPO		Utlenianie katechiny w obecności tyrozynazy Enzymatic oxidation of catechin in the presence of tyrosinase
	pH = 7	pH = 4.0	pH = 7.0
[min]	Zachowalność Retention [%]	Zachowalność Retention [%]	Zachowalność Retention [%]
0	100	100	100
5	83,4	–	91,0
30	57,4	91,1	90,0
60	48,2	90,0	88,9
120	43,3	92,6	90,6
240	–	86,9	90,6
24h	30,9	82,0	71,5

W początkowym etapie proces enzymatycznego utleniania (+) katechiny w obecności PPO w pH 7 zachodził bardzo szybko – czas połowicznego rozpadu $\tau_{0,5} = 47$ min ($R^2 = 0,9$). Dalsze utlenianie było już znacznie wolniejsze i po 24 godzinach zachowalność substratu wynosiła 30%. Obniżenie pH środowiska reakcyjnego z 7 do 4 powo-

dowało zmniejszenie szybkości utleniania (+) katechiny. Po 47 min. jej zachowalność wynosiła około 90%, a po 24 godzinach 80%. Aktywność tyrozynazy w procesie utleniania katechiny była znacznie niższa niż PPO. W roztworze o pH 7 szybkość brunatnienia była zbliżona do zaobserwowanej z udziałem PPO przy pH 4.

Do kontroli przemian (+) katechiny w procesie enzymatycznego utleniania zastosowano chromatografię cienkowarstwową (rys. 1).



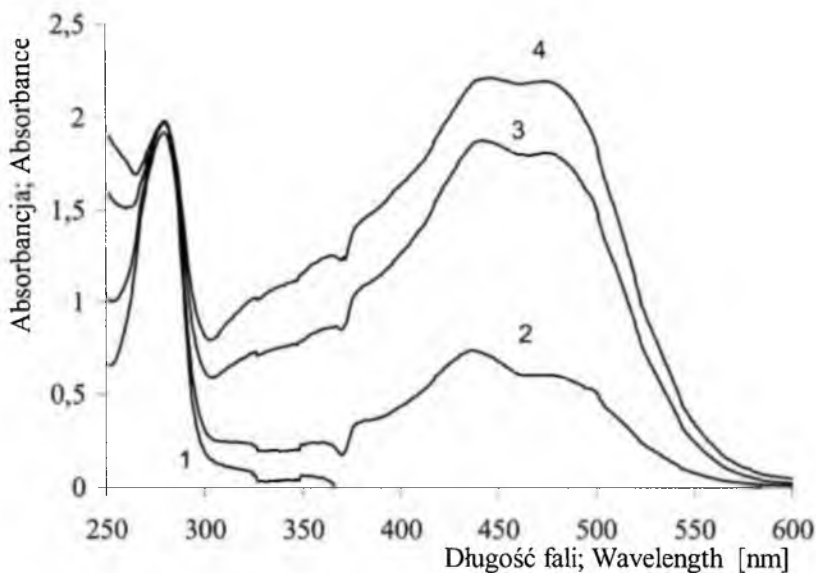
Rys. 1. Chromatogram TLC produktów utleniania (+) katechiny w obecności PPO w pH 7.

Fig. 1. The TLC chromatogram of (+)catechin oxidation products in the presence of PPO at pH 7.

Na chromatogramie TLC (PPO w pH 7) zaobserwowano wyraźny ubytek monomeru (+) katechiny i powstawanie związków o wartości współczynników Rf odpowiadających dimerom i tetramerom tanin skondensowanych [3], które również wykazują aktywność antyoksydacyjną. Po 24 godzinach nie stwierdzono obecności monomeru, natomiast zaobserwowano pojawienie się „ciągnącej się plamy”, wskazującej na pojawienie się szeregu produktów polimeryzacji o zróżnicowanych masach cząsteczkowych. Guyot ze wsp. [2] stwierdził, iż w wyniku utleniania (+) katechiny polifenolooksydazą wyizolowaną z winogron powstawały związki będące izomerami proantocyjanidyn typu A i B.

Natomiast na widmach absorpcji przedstawiających utlenianie katechiny przez PPO w pH 7 (rys. 2) zaobserwowano niewielki wzrost absorbancji przy 280 nm oraz pojawienie się pików w zakresie widzialnym, który odpowiadał barwnym produktom

utleniania (+) katechiny. Według Guyota i wsp. [1], w procesie utleniania (+) katechiny w pH 6 przeważały związki o zabarwieniu żółtym – λ_{\max} 385 i 412 nm, zaś w pH 3 produkty utlenienia (+) katechiny wykazywały maksimum absorpcji przy 280 nm i powstawały jedynie śladowe ilości związków barwnych z maksimum absorpcji przy 400 nm.

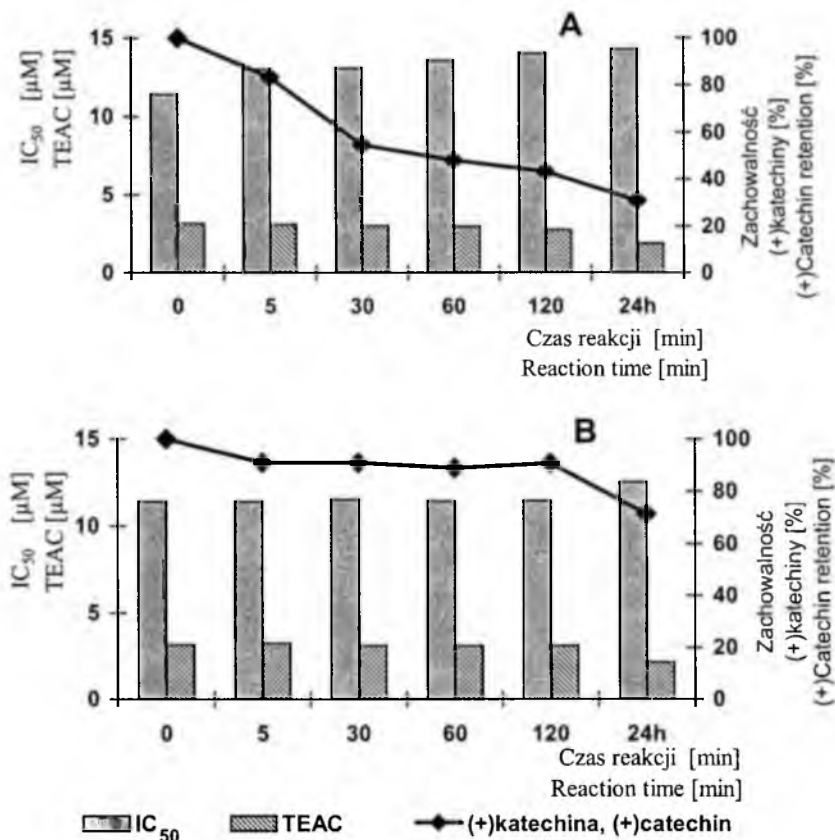


Rys. 2. Widma absorpcji w czasie utleniania (+) katechiny w obecności PPO w pH 7; po czasie: 1 – 0 min; 2 – 10 min; 3 – 30 min; 4 – 60 min.

Fig. 2. Spectra (+)catechin during enzymatic oxidation in the presence of PPO at pH 7; 1 – 0 min; 2 – 10 min; 3 – 30 min; 4 – 60 min.

Aktywność antyoksydacyjną produktów utleniania (+) katechiny określano dwoma metodami polegającymi na spektrofotometrycznym pomiarze zmian stężenia barwnych rodników (rys. 3). Po dwóch godzinach enzymatycznego utleniania (+) katechiny przez PPO w pH 7 spadek zawartości katechiny wynosił 57%, natomiast efektywność zmiatania stabilnego rodnika DPPH (wyrażana jako IC_{50}) obniżyła się o 25% zaś kationorodnika ABTS (wyrażona jako TEAC) tylko o 12%. Dalsze utlenianie (+) katechiny nie powodowało istotnych zmian IC_{50} , zaś współczynnik TEAC obniżył się aż o 40%. Sugerować to może, że produkty enzymatycznego utleniania (+) katechiny wykazują różną aktywność antyoksydacyjną w stosunku do badanych rodników. W obecności tyrozynazy (+) katechiny ulegała utlenieniu znacznie wolniej, a właściwości antyoksydacyjne badanych roztworów tylko w niewielkim stopniu uległy zmianie. Wcześniejsze badania własne wykazały również, iż w czasie ogrzewania roztwo-

rów (+) katechiny w 90°C, w pH 7 pomimo szybkiego spadku zawartości tego monomeru właściwości antyoksydacyjne badanych roztworów obniżały się znacznie wolniej (określane jako IC_{50} w metodzie z DPPH) [11].



Rys. 3. Relacja pomiędzy zdolnością zmiatania rodników DPPH [IC_{50} - μM] oraz kationorodnika $ABTS^+$ [TEAC - μM] a spadkiem zawartości (+) katechiny [%] w czasie utleniania roztworów modelowych w pH 7,0 w obecności: A – PPO; B – tyrozynazy.

Fig. 3. Influence of enzymatic oxidation on the relationship between antioxidant activity determined by DPPH [IC_{50} - μM] and $ABTS^+$ [TEAC - μM] radical scavenging and (+) catechin retention [%] in the presence: A – PPO; B – tyrosinase.

Podsumowanie

Szybkość enzymatycznego utleniania w dużej mierze zależy od rodzaju zastosowanego enzymu oraz pH środowiska reakcyjnego. Proces dwugodzinnego utleniania

(+) katechiny w obecności PPO w pH 7 powodował obniżenie zawartości tego monomeru o około 60% oraz pojawienie się nowych związków o współczynnikach Rf odpowiadających dimerom i tetramerom tanin skondensowanych. Aktywność antyoksydacyjna tych roztworów ulegała obniżeniu znacznie wolniej niż spadek zawartości katechiny (IC₅₀ o 25%, zaś TEAC tylko o 12%). Może to być spowodowane tym, iż produkty enzymatycznego utleniania (+) katechiny wykazują aktywność antyoksydacyjną w stosunku do badanych rodników.

LITERATURA

- [1] Guyot S., Cheynier V., Souquet J.M., Moutounet M.: Influence of pH on the enzymatic oxidation of (+) catechin in model systems; *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 2458.
- [2] Guyot S., Vercauteren J., Cheynier V.: Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase; *Phytochem.*, **42**, 1996, 1279.
- [3] Lea A.G.H., Bridle P., Timberlake C.F., Singleton V.L.: The procyanidins of white grapes and wines; *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**, 4, 1979, 289.
- [4] Łoś J., Wilska-Jeszka J., Pawlak M.: Enzymatic oxidation of polyphenols in fruit products and model solutions.; *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **5/46**, 1996, 83.
- [5] Oszmiański J., Lamer-Zarawska E.: Antymutagenna i antykancerogenna aktywność roślinnych polifenoli; *Przem. Spoż.*, **10**, 1992, 253.
- [6] Oszmiański J., Lee C.Y.: Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system; *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1990, 1202.
- [7] Oszmiański J.: Przemiany enzymatyczne związków fenolowych w układach modelowych i ekstraktach owocowych.; *Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu, Rozprawy*, **74**, 1988, 1.
- [8] Owusu-Ansah Y.I.: Polyphenoloxidase in wild rice (*Zizania palustris*); *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1989, 901.
- [9] 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*, **26**, 1999, 1231.
- [10] Vinson J.A., Dabbagh Y.A., Serry M.M., Jang J.: Plant flavonoids, especially tea flavonols are powerful antioxidants using an in vitro model for heart disease; *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 2800.
- [11] Wilska-Jeszka J., Sosnowska D.: Antioxidant activity of anthocyanins in relation to other phenolic compounds present in fruits, *Proceedings of Euro Food Chem X - Functional Foods – A new challenge for the food chemists*, Budapeszt, 1999, 423.
- [12] Yem G.C., Chen H.Y.: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity; *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 27.

CHANGES OF (+)CATECHIN ANTIOXIDANT ACTIVITY DURING ENZYMATIC OXIDATION

S u m m a r y

The effect of enzymatic oxidation of (+) catechin on its antioxidant activity was investigated. Enzymatic oxidation of (+) catechin in the presence of apple polyphenol oxidase (PPO) and tyrosinase was studied at 25°C and in solution at pH 4 and 7. The antioxidant activity was determined by two methods: ABTS and DPPH radical scavenging. (+) Catechin and the reaction products were monitored by HPLC and TLC.

The rate of reaction in the presence of PPO at pH 7 was higher than at pH 4. The reaction products of catechin oxidation were dimers and tetramers. The rate of oxidation of catechin in the presence of tyrosinase was slower than in the presence of PPO. Antioxidant activity of catechin after two hours oxidation (PPO at pH 7) was reduced about 25% in DPPH method (expressed as IC_{50}) and only about 12% in ABTS method (expressed as TEAC), in spite of big decrease content of monomer catechin (57%). This finding indicates that as a result of (+) catechin enzymatic oxidation the compounds with antioxidant activity are formed. ☒