

ANNA WLAZŁY, ZDZISŁAW TARGOŃSKI

POLIFENOLOOKSYDAZA I β -GLUKOZYDAZA W WYBRANYCH OWOCACH JAGODOWYCH

Streszczenie

Oznaczano aktywność polifenolooksydazy (PPO) i β -glukozydazy w owocach takich, jak: truskawka, malina, porzeczka czerwona i porzeczka czarna. Z każdego rodzaju owocu wybrano 3 odmiany. Do oznaczenia stosowano metody spektrofotometryczne. Substratem w reakcji enzymatycznej były katechol dla PPO i p-nitrofenolo- β -D-glukozyd dla β -glukozydazy. Zbadano również wpływ pH i temperatury na aktywność tych enzymów oraz ich termiczną inaktywację.

Aktywność PPO stwierdzono jedynie w truskawkach odmiany *Senga-Sengana* i *Ducat*, a aktywność β -glukozydazy w truskawkach *Senga-Sengana*, *Ducat*, *Marmolada* i malinach *Canby*, *Beskid*, *Seedling*. Optymalne warunki dla działania PPO były następujące: pH 4,5 i temp. 45°C, a dla β -glukozydazy pH w zakresie 5,0–5,5 i temp. od 40°C do 50°C w zależności od pochodzenia enzymu.

Wstęp

Owoce i przetwory z nich otrzymywane stanowią jeden z istotnych składników diety człowieka. Z jednej strony są one źródłem składników niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego, a z drugiej strony dostarczają bogactwa zapachowego i barwy żywności.

Jedną z cech żywności, którą spostrzegamy i według której oceniamy żywność od pierwszego wrażenia jest barwa. W przypadku owoców takich, jak: truskawki, maliny, porzeczki czerwone, porzeczki czarne i produktów z nich otrzymywanych barwę kształtują naturalnie występujące barwniki antocyjanowe, a także inne polifenole. Związki te podlegają jednak przemianom powodując poprzez to niekorzystne zmiany barwy. Istotny wpływ na przemiany endogennych polifenoli w szczególności w rozdrobionych owocach i sokach ma aktywność dwóch enzymów: β -glukozydazy i polifenolooksydazy [3].

Antocyjany, występujące w formie związanej w postaci glikozydów, stanowią dominującą formę tych związków w większości owoców o barwie czerwonej [12]. β -glukozydaza powoduje odszczepienie cząsteczki cukrów z tych antocyjanów i powstanie aglikonu o mniej intensywnej barwie i mniej stabilnego, ulegającego degradacji do bezbarwnych pochodnych [3].

Polifenolooksydaza (PPO) powoduje przemianę antocyjanów występujących w formie aglikonu, jak i innych polifenoli. Katalizuje reakcje utleniania grup hydroksylowych w obecności tlenu z wytworzeniem chinonów. Powstałe chinony są wysoko reaktywne i prowadzą do reakcji polimeryzacji i kondensacji pomiędzy białkami i polifenolami oraz są zdolne do łączenia się między sobą oraz z innymi związkami, doprowadzając w ten sposób do tworzenia się wysokocząsteczkowych związków o brązowym zabarwieniu [5, 10, 11].

Związki fenolowe oddziałują korzystnie na wartość biologiczną produktów owocowych. Między innymi zapobiegają niekorzystnym zmianom naczyń krwionośnych, powodują neutralizację wolnych rodników oraz mają pewną aktywność przeciwnowotworową [7, 9]. Polifenole wykazują również aktywność przeciwutleniającą, przez co ograniczają utlenianie m.in. witaminy C i innych substancji [8].

Z żywieniowego punktu widzenia obecność PPO w owocach jest więc niekorzystna, ponieważ poprzez przemianę związków fenolowych prowadzi do utraty ich właściwości antyoksydacyjnych. Natomiast z technologicznego punktu widzenia obecność PPO z jednej strony jest niekorzystna, ponieważ powoduje niepożądane zmiany barwy produktów owocowych, a z drugiej strony ma korzystny wpływ, ponieważ powodując przemiany związków fenolowych pozbawia ich niekorzystnych właściwości, jakimi są m.in. tworzenie zmętnień i osadów w sokach, koncentratów owocowych i winach [7]. Zmętnienia te powstają w wyniku kondensacji polifenoli między sobą lub z innymi związkami.

Podatność owoców na procesy brązowienia i zmiany barwy zależy od aktywności polifenolooksydazy, ogólnej sumy zawartych polifenoli, ich budowy, od bliskości substratu dla PPO [4, 5, 7, 12], a także od aktywności β -glukozydazy.

Znajomość właściwości i aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy może być pomocna przy wyborze odmian owoców i metod przetwarzania, by zagwarantować odpowiednie cechy sensoryczne produktom owocowym i stabilność ich barwy.

Celem pracy było określenie aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy w owocach jagodowych oraz przeprowadzenie częściowej charakterystyki tych enzymów pochodzących z różnych odmian tego samego gatunku owoców.

Material i metody badań

Materiałem badawczym były następujące owoce:

- truskawki: *Senga-Sengana, Ducat, Marmolada*;
- maliny: *Canby, Beskid, Seedling*;
- porzeczka czerwona: *Rondom, Holenderska, Jonker*;
- porzeczka czarna: *Ojebyn, Titania, Ben Lomond*.

Owoce przechowywano w stanie zamrożenia w temperaturze -20°C .

Ekstrakcja polifenolooksydazy i β -glukozydazy

W celu przeprowadzenia ekstrakcji enzymów 20 g rozmrożonych owoców homogenizowano przez 60 sekund z 25 cm^3 buforu cytrynianowo-fosforanowego wg Mc Ilvaine'a (sporządzonego z 0,1M kwasu cytrynowego i 0,2M Na_2HPO_4) o pH 7,0 z dodatkiem Tritonu X-100 (1%) i nierozpuszczalnego poliwinylpolipirolidonu (4%) [2]. Następnie całość pozostawiono na 2 godz., w temp. 4°C , w ciemnym miejscu. Po tym czasie całość odwirowano przez 15 min, przy obr. 9000^*g , w 4°C . Do oznaczenia aktywności enzymów użyto roztworu z nad osadu.

Oznaczenie aktywności polifenolooksydazy

Oznaczenia aktywności PPO dokonano w reakcji z katecholem poprzez pomiar zmiany absorbancji próby właściwej (A) i prób kontrolnych (B i C), przy długości fali 420 nm po upływie 30 min wobec wody destylowanej.

Tabela 1

Skład próby właściwej i prób kontrolnych do oznaczenia aktywności PPO.

The composition of the studied sample and the control samples in polyphenoloxidase activity assay.

Składnik Component	Próby / Samples		
	A	B	C
0,02 M katechol 0,02 M catechol	2 cm^3	2 cm^3	–
Bufor Mc Ilvaine'a Buffer Mc Ilvaine'a	1 cm^3	1 cm^3	–
Sok z owoców Fruit juice	$0,2\text{ cm}^3$	–	$0,2\text{ cm}^3$
Woda destylowana Distilled water	–	$0,2\text{ cm}^3$	3 cm^3

Oznaczenie aktywności β -glukozydazy.

Aktywność β -glukozydazy oznaczono w reakcji z p-nitrofenolo- β -D-glukozydem, poprzez pomiar absorbancji próby właściwej (A) i prób kontrolnych (B i C), przy dł. fali 420 nm po upływie 30 min i dodaniu po tym czasie 1 cm^3 1 M Na_2CO_3 do wszystkich prób.

Tabela 2

Skład próby właściwej i prób kontrolnych do oznaczania aktywności β -glukozydazy.

The composition of the studied sample and the control samples in β -glucosidase activity assay.

Składnik Component	Próby / Samples		
	A	B	C
0,9956 mM p-nitrofenolo- β -D-glukozyd 0,9956 mM p-nitrophenol- β -D-glucoside	0,75 cm ³	0,75 cm ³	–
Bufor Mc Ilvaine a Buffer Mc Ilvaine'a	0,75 cm ³	0,75 cm ³	–
Sok z owoców Fruit juice	0,2 cm ³	–	0,2 cm ³
Woda destylowana Distilled water	–	0,2 cm ³	1,5 cm ³

Absorbancję, do określenia aktywności enzymów, wyliczono według wzoru:

$$E_X = E_A - [E_B + E_C]$$

E_A – absorbancja próby A,

E_B – absorbancja próby B,

E_C – absorbancja próby C.

Za jednostkę aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy przyjęto zmianę absorbancji o 0,001 wywołowaną przez 1 cm³ enzymu w ciągu 1 min w warunkach oznaczenia.

Wpływ pH na aktywność PPO i β -glukozydazy

Badając wpływ pH na aktywność enzymów dokonywano pomiaru aktywności w buforze Mc Ilvaine a o następujących wartościach pH: 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0 w temperaturze 40°C. Pozostałe warunki były takie, jak przy oznaczaniu aktywności enzymatycznych.

Wpływ temperatury na aktywność PPO i β -glukozydazy

Wpływ temperatury na aktywność w/w enzymów przeprowadzono w następujących temperaturach: 20°C, 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, przy takiej wartości pH, przy której enzym wykazywał najwyższą aktywność. Pozostałe warunki były takie, jak przy oznaczaniu aktywności enzymatycznych.

Termiczna inaktywacja PPO i β -glukozydazy

W celu zbadania termicznej inaktywacji enzymów w czasie, roztwór zawierający enzym zmieszany z buforem cytrynianowo-fosforanowym wg Mc Ilvaine a (o pH przy

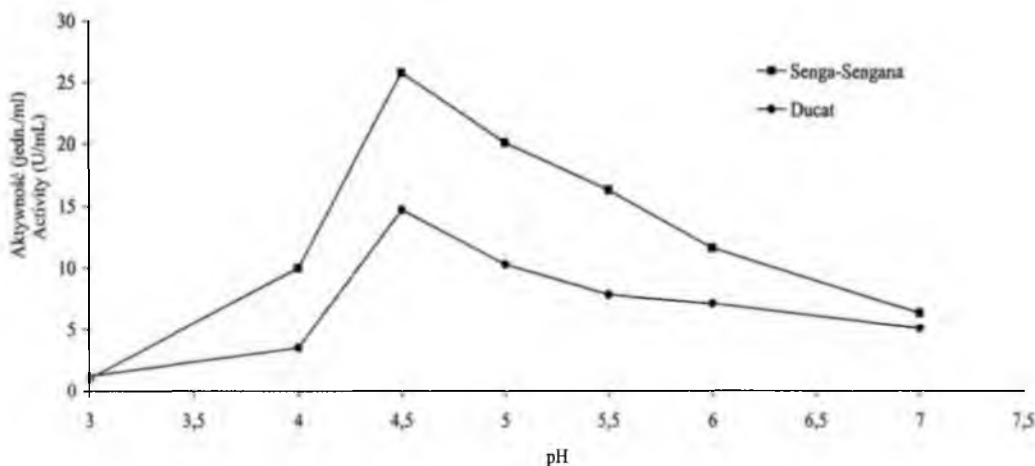
którym enzym wykazywał najwyższą aktywność) w stosunku 1:1 ogrzewano w temperaturach 45°C i 55°C i mierzono aktywność po 0,5, 1, 2, 4 godz. oraz w temperaturze 65°C mierząc aktywność po 5, 10, 15, 20, 30 minutach. Pomiaru dokonywano przy takiej wartości pH, przy której enzym wykazywał najwyższą aktywność.

Omówienie wyników

Badanie właściwości polifenolooksydazy

Aktywność polifenolooksydazy została stwierdzona jedynie w truskawkach dwóch odmian *Senga-Sengana* i *Ducat*. Pozostałe owoce nie wykazywały aktywności tego enzymu.

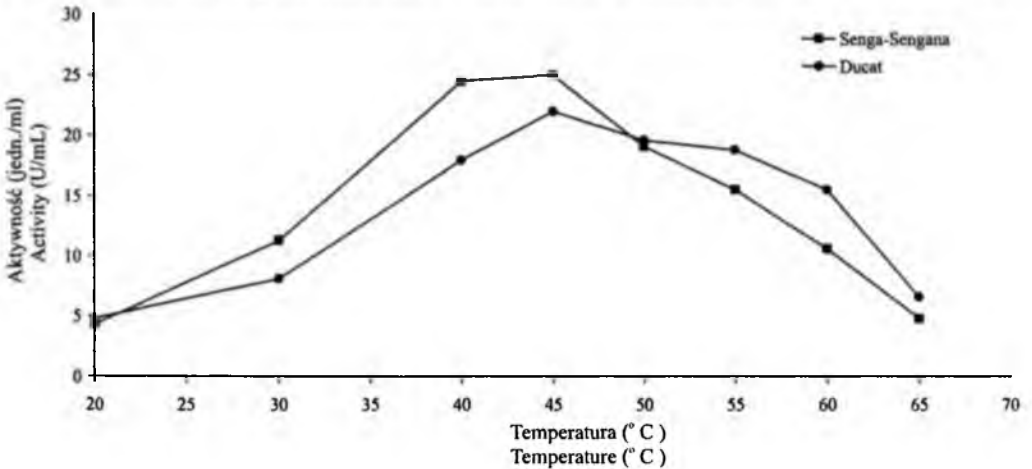
Najwyższą aktywność PPO uzyskano przy pH 4,5. Wynik ten był identyczny dla obydwu odmian truskawek: *Senga-Sengana* i *Ducat*, a aktywność wynosiła odpowiednio 25,8 i 14,7 jednostek. W zakresie pH 3,0–7,0 enzym miał najniższą aktywność przy pH 3,0. Aktywność PPO obecnej w wyciągu z truskawek odmiany *Senga-Sengana* w tym pH stanowiła jedynie 3,8% aktywności maksymalnej, a z odmiany *Ducat* 8,1% (rys. 1).



Rys. 1. Wpływ pH na aktywność polifenolooksydazy obecnej w wyciągach z truskawek.

Fig. 1. Effect of pH on the activity of strawberry polyphenoloxidase.

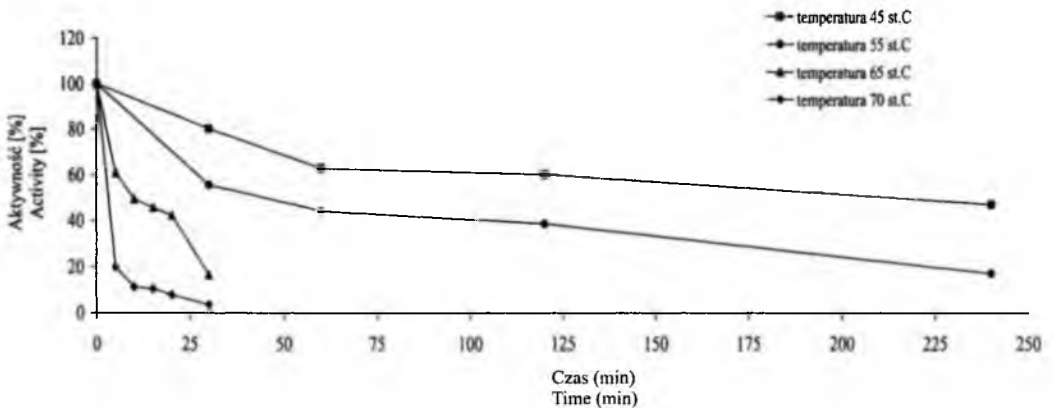
W wyniku badań aktywności PPO w różnych temperaturach, najwyższą aktywność posiadał enzym obecny w wyciągu z obydwu odmian truskawek, w temp.45°C. Poniżej i powyżej tej temperatury aktywność była niższa, lecz jeszcze w temperaturze 65°C aktywność enzymu kształtowała się na poziomie 30% aktywności maksymalnej dla odmiany *Ducat* i 19,2% dla odmiany *Senga-Sengana* (rys. 2).



Rys. 2. Wpływ temperatury na aktywność polifenolooksydazy obecnej w wyciągach z truskawek.

Fig. 2. Effect of temperature on the activity of strawberry polyphenoloxidase.

Pod wpływem ogrzewania wyciągu z owoców następował spadek aktywności PPO. Po upływie 4 godzin ogrzewania w temperaturze 45°C aktywność PPO obecnej w wyciągu z truskawek *Senga-Sengana* kształtowała się na poziomie 47% aktywności początkowej, a w temperaturze 55°C 17,2%. Całkowita inaktywacja enzymu nastąpiła w temp. 70°C po 30min ogrzewania. Natomiast w temperaturze 65°C po 30 min aktywność stanowiła 16,6% aktywności początkowej (Rys. 3).



Rys. 3. Termiczna inaktywacja polifenolooksydazy obecnej w wyciągach z truskawek *Senga-Sengana*, w różnych temperaturach.

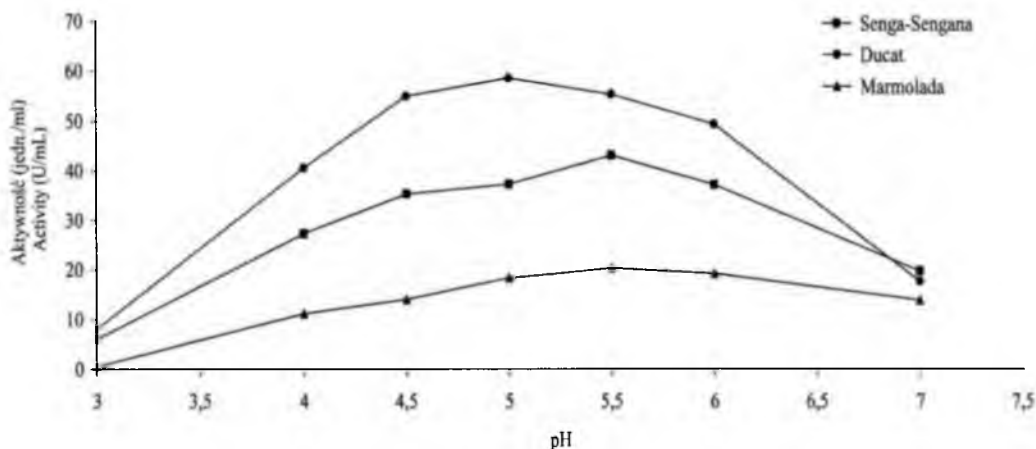
Fig. 3. Thermal inactivation of *Senga-Sengana* strawberry polyphenoloxidase at different temperature.

Badanie aktywności β -glukozydazy

Aktywność β -glukozydazy stwierdzono w truskawkach odmiany *Senga-Sengana*, *Ducat*, *Marmolada* oraz malinach odmiany *Canby*, *Beskid*, *Seedling*. Natomiast porzeczka czerwona i porzeczka czarna nie wykazywały aktywności tego enzymu.

Optymalna wartość pH dla działania β -glukozydazy wynosiła 5,0 dla enzymu obecnego w wyciągu z truskawek odmiany *Senga-Sengana*, *Ducat* i malin odmiany *Canby*, *Beskid*, *Seedling* oraz 5,5 dla enzymu obecnego w wyciągu z truskawek *Marmolada*. Najwyższą aktywność posiadał enzym obecny w wyciągu z truskawek *Ducat* i wynosiła ona 58,6 jednostki. β -glukozydaza obecna w wyciągu z malin wszystkich odmian nie posiadała aktywności w pH 3,0 i 7,0.

W przypadku β -glukozydazy obecnej w wyciągu z malin aktywność w różnych pH kształtowała się podobnie niezależnie od odmiany (rys. 5). Natomiast β -glukozydaza obecna w wyciągu z truskawek w zależności od odmiany wykazywała znaczne zróżnicowanie aktywności przy tych samych wartościach pH (rys. 4).

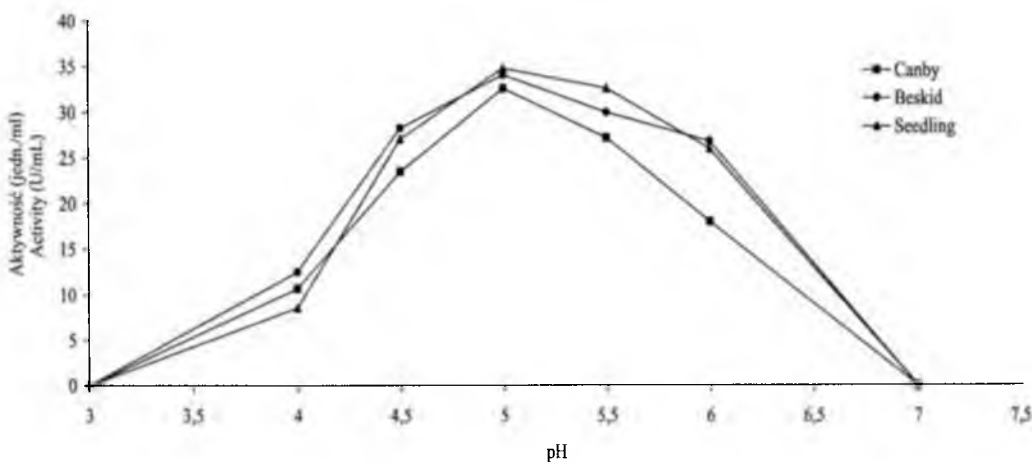


Rys. 4. Wpływ pH na aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągach z truskawek.

Fig. 4. Effect of pH on the activity of strawberry β -glucosidase.

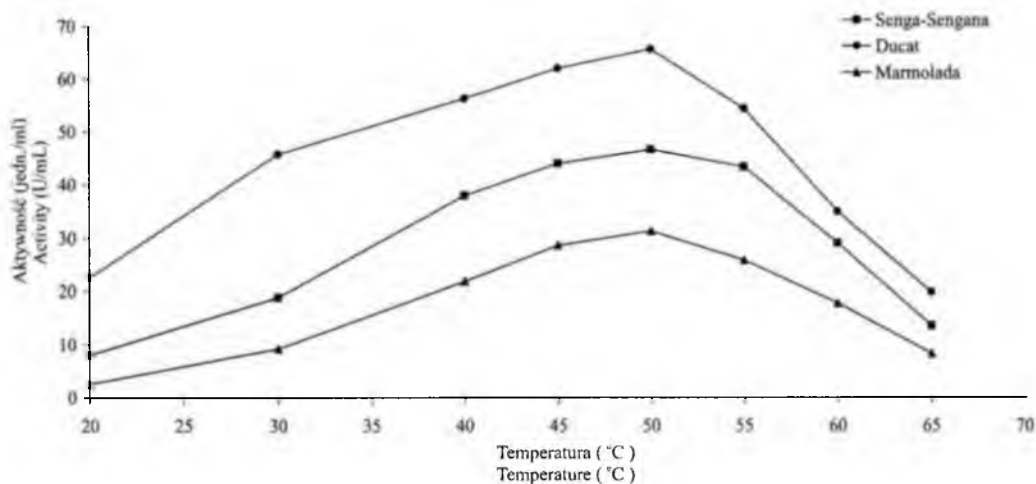
Optymalna wartość temperatury działania β -glukozydazy wynosiła 50°C w przypadku enzymu obecnego w wyciągach ze wszystkich badanych odmian truskawek, a 45°C w przypadku enzymu obecnego w wyciągu z malin *Canby* i 40°C dla enzymu obecnego w wyciągach z malin *Beskid* i *Seedling*. Najniższe aktywności uzyskano w temperaturze 65°C dla β -glukozydazy obecnej w wyciągach z truskawek *Ducat* i malin *Seedling*. Aktywność w tej temperaturze stanowiła odpowiednio 30% i 2,8%

aktywności maksymalnej. W przypadku β -glukozydazy obecnej w wyciągach z pozostałych źródeł najniższą aktywność stwierdzono w temperaturze 20°C (rys. 6 i rys. 7).



Rys. 5. Wpływ pH na aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągach z malin.

Fig. 5. Effect of pH on the activity of raspberry β -glucosidase.

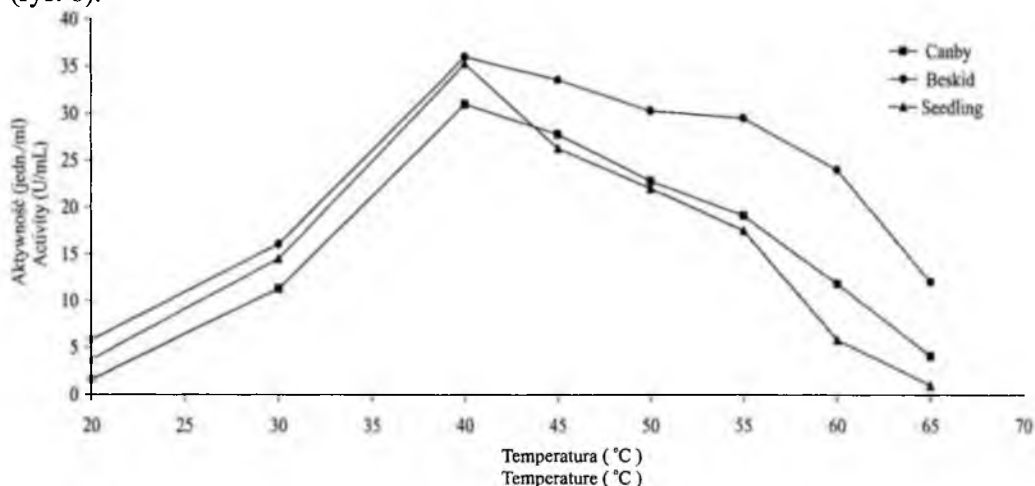


Rys. 6. Wpływ temperatury na aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągach z truskawek.

Fig. 6. Effect of temperature on the activity of strawberry β -glucosidase.

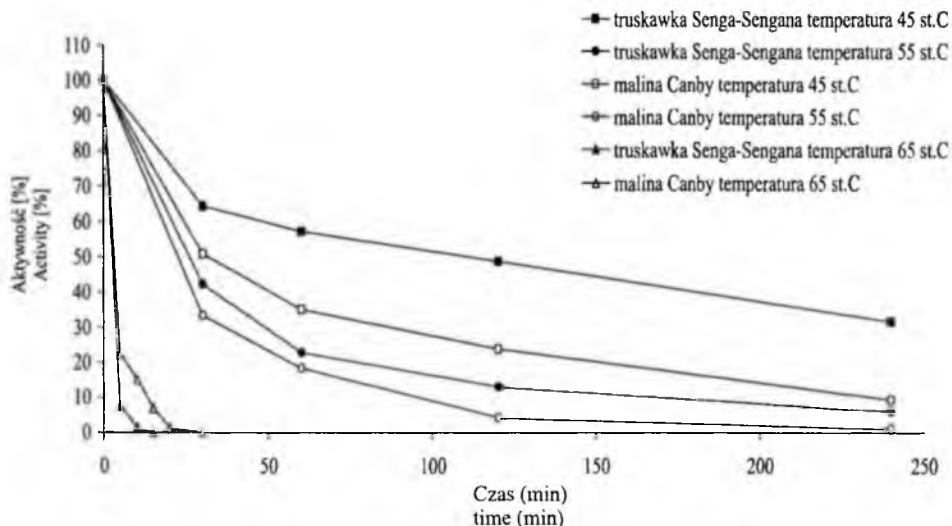
Pod wpływem ogrzewania wyciągu z truskawek *Senga-Sengana* i malin *Canby* następował spadek aktywności obecnej tam β -glukozydazy. Aktywność β -glukozydazy spadała już powyżej 40°C. Po 4 godzinach ogrzewania w temperaturze 45°C aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągu z truskawek kształtowała się na poziomie

31,6% aktywności początkowej, a w temperaturze 55°C na poziomie 5,8% aktywności początkowej. Natomiast aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągu z malin po 4 godzinach ogrzewania w temp. 45°C stanowiła 9,1% aktywności początkowej, a w temp. 55°C 1% aktywności początkowej. Całkowita inaktywacja β -glukozydazy obecnej w wyciągu z truskawek nastąpiła po 15 min ogrzewania w temp. 65°C, a β -glukozydazy obecnej w wyciągu z malin po 30 min ogrzewania w tej temperaturze (rys. 8).



Rys. 7. Wpływ temperatury na aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągach z malin.

Fig. 7. Effect of temperature on the activity of raspberry β -glucosidase.



Rys. 8. Termiczna inaktywacja β -glukozydazy w różnych temperaturach.

Fig. 8. Thermal inactivation of β -glucosidase at different temperature.

Wnioski

1. Owoce jagodowe, tj. truskawka, malina, porzeczka czarna, porzeczka czerwona, różnią się znacznie pod względem aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy. Wpływ na poziom aktywności tych enzymów w owocach ma również odmiana.
2. Soki z porzeczki czerwonej i porzeczki czarnej nie wykazywały aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy, a soki z malin i truskawek odmiany *Marmolada* wykazywały tylko aktywność β -glukozydazy.
3. Wykazane różnice w aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy zależne od odmiany owocu sugerują, że aktywności tych enzymów powinny być brane pod uwagę przy opracowywaniu technologii przetwórstwa tych owoców.
4. Najwyższą aktywność wykazywała polifenolooksydaza obecna w wyciągu z truskawek odmiany *Senga-Sengana* i β -glukozydaza obecna w wyciągu z truskawek odmiany *Ducat*.
5. Optymalna wartość pH i temperatury dla działania enzymów zależały od źródła, z którego pochodziły enzymy i wynosiły dla PPO pH 4,5, temp. 45°C, a dla β -glukozydazy pH w zakresie 5,0-5,5, temp. od 40°C do 50°C w zależności od odmiany owoców.

LITERATURA

- [1] Fraignier M.P., Marques L., Fleuriet A., Macheix J.J.: Biochemical and Immunochemical Characteristics of Polyphenol Oxidase from Different Fruits of Prunus. *J. Agric. Food Chem.*, **9**, 1995, 2375.
- [2] Gonzalez E.M., De Ancos B., Pilar Cano M.: Partial Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Raspberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1999, 4068.
- [3] Horubała A.: Zmiany barwy soków owocowych w procesach technologicznych ich otrzymywania i przechowywania. *Przem. Ferm.*, **8**, 1996, 31.
- [4] Lee C.Y., Kagan V., Jaworski A.W., Brown S.K.: Enzymatic Browning in Relation to Phenolic Compound and Polyphenoloxidase Activity Among Various Peach Cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 99.
- [5] Łoś J., Wilska-Jeszka J., Pawlak M.: Enzymatic Oxidation of Polyphenols in Fruit Products and Model Solution. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **1**, 1996, 83.
- [7] Oszmiański J.: Przemiany enzymatyczne związków fenolowych w układach modelowych i ekstraktach owocowych. *Zesz. Nauk. AR, Wrocław*, **74**, 1988, 7.
- [8] Oszmiański J.: Polifenole jako naturalne przeciwutleniacze w żywności. *Przem. Spoż.*, **3**, 1995, 94.
- [9] Sikorski Z.E.: Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. WNT, Warszawa 1994.
- [10] Wesche-Ebeling P., Montgomery M.W.: Strawberry Polyphenoloxidase: Extraction and Partial Characterization. *J. Food Sci.*, **5**, 1990, 1320.
- [11] Wesche-Ebeling P., Montgomery M.W.: Strawberry Polyphenoloxidase: Purification and Characterization. *J. Food Sci.*, **5**, 1990, 1315.

- [12] Wightman J.D., Wrolstad R.E.: Anthocyanin Analysis as a Measure of Glucosidase Activity in Enzymes for Juice Processing. *J. Food Sci.*, 4, 1995, 862.

POLYPHENOLOOXIDASE AND β -GLUCOSIDASE IN SELECTED BERRY FRUITS

S u m m a r y

The activity of polyphenoloxidase (PPO) and β -glucosidase in the following fruits: strawberry, raspberry, red currant, black currant was estimated. From each kind of fruit three varieties were selected. Spectrophotometric methods were used to estimate the enzymatic activity. The substrates for the enzymatic reactions were catechol for PPO and p-nitrophenol- β -D-glucoside for β -glucosidase. The influence of pH value and temperature on the activity of the enzymes and their thermal inactivation was also investigated.

PPO activity was detected in the following varieties of strawberries: *Senga-Sengana*, *Ducat*. β -glucosidase activity in strawberries: *Senga-Sengana*, *Ducat*, *Marmolada* and in the following varieties of raspberry: *Canby*, *Beskid*, *Seedling* was studied. The optimal conditions for PPO were as follows: pH 4,5, temperature 45°C, and for β -glucosidase pH in the range of 5,0–5,5 and temperature 40°C to 50°C depending on the origin of the enzyme. ☒