Charakterystyka aktywności procesów oksydacyjnych u niektórych odmian jabłek

*Caracteristique de l'activité des processus oxydatifs chez les certaines
varietés de la pomme*

K. A. BOGDAŃSKI

(Wpłynęło dn. 8.III.1954 r.)

W s t ę p

Obok innych systemów enzymatycznych w tkankach jabłka działają różne systemy oksydacyjne. Pierwsze doniesienie o enzymach utleniających w jabłkach opublikowała O n s l o w M. W. (1919/20). W dalszych pracach opisano poszczególne grupy tych enzymów, jak: peroksydazy, fenolazy i askorbinazę. Jednakże co do znaczenia poszczególnych grup oksydaz w jabłkach i stopnia w jakim wpływają one na ciemnienie (brązowienie) tkanek w procesach przetwórczych, zdania są jeszcze dotychczas podzielone. Podczas gdy R e d i, E s s e l e n i F e l l e r s przypisują szczególnie duży wpływ peroksydazom, P o i n t i n g J. D. i J o s l y n M. A. (1948) uważają, że główną rolę w procesach enzymatycznego ciemnienia miąższu odgrywają polifenoloksydazy, gdyż peroksydazy są unieczynniane na płaszczyźnie przekroju przy zetknięciu miąższu z powietrzem. Wszyscy autorzy podają, że substratem brązowiejącym pod wpływem działania oksydaz są w jabłkach związki o funkcjach polifenolowych, wchodzące w skład garbników. Według S a n d o C. E. (1937) w jabłkach występuje żółty pigment flawonowy 3-galaktozydokwercetyna, który posiada ugrupowanie polifenolowe podatne na utlenienie przez oksydazy.

Aktywność systemu utleniającego i jego lokalizacja jest cechą typową dla danej odmiany (D r a i n B. D. 1926 wg S m o c k a R. M., N e u b e r t a A. M. 1950). Można jednak ogólnie przyjąć, że system oksydacyjny przejawia najwyższą aktywność wokół wiązek przewodzących, co zaobserwowano również w odniesieniu do katalazy u odmiany McIntosh (C a r r i c k D. B. 1928). Jednak nawet u owoców danej

odmiany obserwuje się okresowe wahania aktywności oksydaz. Aktywność ta jest w pewnej mierze uzależniona również od fazy rozwoju owocu. Stwierdzono, że maleje ona stopniowo w miarę dojrzewania owocu przed zbiorem, jednak wzrasta, jeżeli owoc pozostawi się na drzewie po osiągnięciu dojrzałości. Nie zauważono współzależności pomiędzy długotrwałością przechowywania jabłek, a aktywnością oksydaz (S m o c k R. M., N e u b e r t A. M. 1950).

Jest wprawdzie rzeczą znaną, że jabłka w miarę przechowywania są coraz to bardziej podatne na brązowienie, jednakże zjawisko to jest nie tyle związane ze zwiększeniem aktywności oksydaz, ile z podwyższeniem się pH owoców oraz z łatwiejszym dostępem tlenu do tkanek o rozluźnionej budowie, wywołanej rozkładaniem się pektynowych lepiszczy komórek (B o g d a ń s k i C. 1950). Lokalnie zagrzewanie się owoców podczas przechowywania, a nieraz i obecność śladów alkoholu, powstającego w psujących się tkankach jabłka, zdają się natomiast stymulować aktywność oksydaz (S m o c k R. M., N e u b e r t A. M. 1950).

Na aktywność enzymów utleniających u owoców danej odmiany jabłek wpływa wreszcie położenie sadu. W zależności od krainy geograficznej, klimatu, rodzaju gleby, itd. aktywność oksydaz może być różna. Stwierdzono korelację dodatnią pomiędzy wysokością bezwzględną położenia sadu i aktywnością oksydaz, porównując jabłka z odmiany Jonathan pochodzące ze sadów w Stanie Washington położonych na wysokościach 850 i 2400 stóp nad p. m.; jednakże dla odmiany Winesap współczynnik takiej korelacji był o wiele niższy (wg S m o c k a R. M., N e u b e r t a A. M. 1950).

W niniejszej pracy ograniczono się do oznaczenia aktywności systemu polifenole-polifenoloksydaza w jabłkach z kilkunastu odmian uprawianych w Polsce. Polifenoloksydazy należą do oksydaz właściwych, czyli aerobowych, a więc wymagających obecności tlenu atmosferycznego. Katalizują one utlenianie substancji garbnikowych o funkcjach polifenolowych, a pośrednio także utlenianie kwasu askorbinowego. W związku z powyższym, na aktywność systemu utleniającego wywołującego brązowienie miąższu jabłek, składa się zarówno aktywność oksydaz, jak i zawartość obu wymienionych substratów. L e g r a n d G. i B o g d a ń s k i C. (1950) opisali zjawisko utleniania kwasu askorbinowego w jabłkach przez system polifenole-polifenoloksydaza. Przedstawiono też mechanizm tego zjawiska (B o g d a ń s k i C. 1952) oraz jego matematyczną interpretację dla potrzeb przemysłowych* (B o g d a ń s k i K. 1953), podając następujący wzór dla przebiegu opisanej reakcji utleniania:

* Kwas askorbinowy działający na zasadzie opisanej reakcji pełni rolę antyoksydanta przeciwdziałającego brązowieniu tkanek.

$$y = a \left[N \log \left(\frac{62}{63} \right) x \right], \text{ gdzie}$$

a = zawartość początkowa kwasu askorbinowego (w mg)

x = czas trwania reakcji (w min)

y = zawartość kwasu askorbinowego po czasie x trwania reakcji (w mg).

Ostatnio wyznaczono stechiometryczne proporcje pomiędzy absorpcją tlenu, a ubytkiem kwasu askorbinowego utlenianego za pośrednictwem systemu polifenoloksydaza-polifenole-dehidraza, rozwiązując tym samym dyskutowany od dłuższego czasu problem, ile cząsteczek tlenu jest potrzebnych do utlenienia cząsteczki kwasu askorbinowego w tej reakcji (Bogdański K., Bogdańska H. 1954).

M e t o d y k a

Oznaczanie aktywności polifenoloksydaz przeprowadzano testem absorpcyjnym, polegającym na pomiarze ilości tlenu zaabsorbowanego przez świeżo wytłoczone soki w standartowych warunkach (Dupaigne P., Bogdański C. 1950 a).

Do oznaczeń absorpcyjności tlenu zastosowano aparat Warburga z dyferencjonalnymi manometrami wypełnionymi izoatmosferycznym roztworem Brodie'go (zawierającym tauroglikocholan sodu i chlorek sodu w stężeniach tak dobranych, by ciśnienie słupa 100 mm roztworu odpowiadało dokładnie ciśnieniu 1/100 atmosfery). Jeden z manometrów pełnił rolę borometru w celu umożliwienia dokonywania korekty odczytów, na które wpływają także wahania ciśnienia barometrycznego atmosfery otaczającej. Manometry wraz z fiolkami zanurzonymi w łaźni wodnej o temperaturze 16°C — samoregulowanej z dokładnością do $\pm 1/100^\circ\text{C}$ — były wytrząsane w rytmie 120 wahań/min. W wyniku zmian napięcia prądu rytm ten był jednak obciążony pewną niedokładnością, a mianowicie około ± 4 wahań/min, nawet przy stosowaniu kompensacji.

Odczyty na manometrach dokonywane były w odstępach 5-cio minutowych podczas 20-to sekundowych przestojów aparatu. Dla każdej z odmian jabłek* stosowano 2—6 powtórzeń, zależnie od potrzeby. Oznaczenia kontrolne przeprowadzano na sokach, w których uprzednio zinaktywowano enzymy przez ogrzanie — stosując odpowiednie temperatury (Dupaigne P., Bogdański C. 1949).

Naturalne pH soków z jabłek poszczególnych odmian (wynoszące od 3,7—3,9) utrzymywało się dobrze podczas przebiegu doświadczenia, co jest zrozumiałe, gdyż soki jabłkowe są silnie zbuforowane (Barnes E. O. 1940).

* Jabłka odmianowe otrzymano z Sadu Pomologicznego SGGW w Skierniewicach.

W y n i k i

U przebadanych odmian jabłek występuje wyraźna współzależność pomiędzy ilością zaabsorbowanego tlenu, a stopniem brązowienia soków i tkanek. Wykres na ryc. 1 przedstawia te współzależności dla kilku od-

Ryc. 1. Korelacja pomiędzy absorbcyjnością tlenu u różnych odmian jabłek a stopniem brązowienia soków i tkanek

mian najbardziej typowych. Na wykresie podano ilości tlenu (w mm^3) zaabsorbowane przez 3-mililitrowe próby soków z tych odmian po różnych czasach (w min). Krzywe absorpcyjności dla poszczególnych odmian zaznaczono kolorami odpowiadającymi w przybliżeniu naturalnemu zabarwieniu soku z danej odmiany, ocenianemu po 30-tu minutach od chwili jego wyłoczenia.

Jak wynika z wykresu na ryc. 1, te odmiany jabłek, których soki silnie brązowieją po wyłoczeniu, absorbują najwięcej tlenu (Antonówka, Malinowa Oberlandzka), natomiast te, których soki posiadają jasne zabarwienie absorbują go najmniej (np. wyraźnie Księżna Luiza).

Średnie aktywności oksydacyjnej dla 17-tu odmian jabłek przedstawiono w postaci krzywych absorpcji tlenu na ryc. 2. Jak widać, soki z poszczególnych odmian jabłek absorbowały tlen w różnym stopniu. Z odmian przebadanych najsilniejszy system oksydacyjny posiadały odmiany: Antonówka, Malinowa Oberlandzka i Reneta Kanadyjska (Szara), natomiast odmiany: Księżna Luiza, Pepina Szafranowa i James Grieve wykazały najniższą absorpcyjność tlenu.

Ryc. 2. Średnie wyniki pomiarów aktywności oksydaz u 17 odmian jabłek:

Wykaz odmian: 1 — Antonówka; 2 — Bursztówka; 3 — Cesarz Wilhelm; 4 — Cytrynówka; 5 — Fameuse; 6 — Glogierówka; 7 James Grieve; 8 — Jonatan; 9 — Kronseiska; 10 — Księżna Luiza; 11 — Malinowa Oberlandzka; 12 — Pepina Szafranowa; 13 — Reneta Bergamotowa; 14 — Reneta Szara (Kanadyjska); 15 — Rypston; 16 — Stonehenge; 17 — Wealthy.

Analizując przebieg krzywych absorpcji dla soków z przebadanych odmian jabłek, można zauważyć różnice w zakresie:

- a) wielkości początkowej, kąta kierunkowego krzywej
- b) stopnia zmniejszania się kąta kierunkowego krzywej w miarę przebiegu reakcji
- c) ogólnej ilości zaabsorbowanego tlenu mierzonej w momencie, gdy kąt kierunkowy krzywej zdąża do wartości 0^0 (krzywa przebiega wtedy równolegle do osi x-ów, to znaczy absorbowanie tlenu zupełnie ustaje; zjawisko to nie jest jednak widoczne u wszystkich krzywych przedstawionych na rycinie 2).

D y s k u s j a

Wyżej przytoczone obserwacje, dotyczące różnic przebiegu i cech krzywych przedstawiających absorpcję tlenu przez soki z przebadanych odmian jabłek, pozwalają na postawienie pewnych wniosków odnośnie systemów oksydacyjnych tych odmian.

Działanie każdego systemu oksydażowego uwarunkowane jest obecnością oksydazy oraz substratu podatnego na utlenienie enzymatyczne. Specyficznym substratem dla polifenoloksydaz — jak to już podkreślono we wstępie — są polifenole, lecz może nim być i kwas askorbinowy. To ostatnie ma tym większe znaczenie, że wg P o i n t i g a J. D. i J o s l y n a M. A. (1948) w soku jabłkowym nie występuje askorbinaza, a kwas askorbinowy jest tu utleniany wyłącznie (enzymatycznie) za pomocą systemu polifenole-polifenoloksydaza przy udziale dehidrazy, zgodnie ze schematem podanym przez S z e n t G y ö r g y i' e g o (1928):

- I. fenol + tlen fenoloksydaza chinon + woda
- II. chinon + kwas askorbinowy dehidraza fenol + kwas dehydroaskorbinowy.

Dopóki więc cały kwas askorbinowy nie zostanie utleniony, dopóty natychmiast redukuje on ustawicznie utleniany substrat fenolowy (P i n t i n g J. D., J o s l y n M. A. 1948), nie dopuszczając tym samym do brązowienia soku. Kwas askorbinowy, jako najbardziej podatny na utlenianie*, stanowi więc w sokach jabłkowych substrat ostateczny, tzn. już nieodwracalnie utleniany.

* Ponieważ kwas askorbinowy ulega pierwszy zniszczeniu, soki jabłkowe nie zawierają go praktycznie już w kilka chwil po wytlóczeniu. S t r a c h a n C. C. (1942) opisuje jednak taką odmianę jabłek (Fresh Newtown), której sok zawiera tyleż kwasu askorbinowego ile owoc (7 mg⁰/o).

Należy jednak bardzo krytycznie odnosić się do wyników analizy kwasu askorbinowego w sokach jabłkowych, zwłaszcza pasteryzowanych, ze względu na obecność reduktorów, działających podczas analizy na 2,6 dwuchlorofenolidofenol analogicznie jak kwas askorbinowy (B o g d a ń s k i K., B o g d a ń s k a H. 1953).

W związku z powyższym uważano za celowe podać (ryc. 3) zawartości kwasu askorbinowego w jabłkach przebadanych odmian (wg pracy B o g d a ń s k i e j H. i B o g d a ń s k i e g o K. 1954) i uwzględnić je na wykresach na ryc. 2. W ten sposób uwidoczniono wpływ stężenia tego substratu na przebieg krzywych absorpcji tlenu.

Ryc. 3. Średnie zawartości kwasu l-skorbinowego u odmian badanych.

Ażeby wyjaśnić związek pomiędzy zawartością substratu i aktywnością oksydaz, a przebiegiem krzywych, zamieszczono ryc. 4 i 5, przedstawiające kolejno: schematyczny przebieg krzywych w zależności od stężenia substratu i aktywności oksydaz oraz wykres jednostek aktywności oksydaz w oparciu o wielkość początkową kąta kierunkowego krzywej.

LEGENDA:

- * — silna
 o — średnia
 Δ — słaba
 — aktywność enzymatyczna
 — linie przerywane oznaczają niższą wartość
 substratu wobec aktywności enzymatycznej

Ryc. 4. Schematy przebiegu utleniania.

Ryc. 5. Początkowe współczynniki kierunkowe krzywych utleniania w zależności od aktywności oksydaz.

Według Barcrofta (dane z pracy Keilina D. 1938) jednostki QO_2 oznaczają objętość tlenu w mm^3 zaabsorbowanego przez 1 mg suchej masy preparatu enzymatycznego podczas 1 godz w temp. $20^\circ C$ (na podstawie wyniku z dwóch pierwszych minut reakcji). Ponieważ 3 ml-owe próbki soku jabłkowego (w fiolkach) zawierają ca 500 mg suchej masy, można było na ryc. 5 wycechować w przybliżeniu jednostki aktywności w wartościach QO_2 .

W oparciu o analizę kątów kierunkowych i przebieg krzywych absorpcyjności tlenu można przyjąć, że odmiany Antonówka i Malinowa Oberlandzka posiadają wysoką aktywność polifenoloksydaz, a odmiany: Reneta Bergmotowa i Pepina Szafranowa — niską.

Natomiast odmiany: Księżna Luiza i James Grieve posiadają w stosunku do aktywności oksydaz duży zasób substratu (enzymy są wysyczone substratem); odwrotnie przedstawia się ten stosunek u odmiany Malinowa Oberlandzka, która posiada mały zasób substratu w stosunku do aktywności oksydaz.

Wyniki niniejszej pracy mogą mieć znaczenie praktyczne przy doborze odmian jabłek dla przemysłu. Wiadomo bowiem, że owoce o aktywnym systemie polifenole-polifenoloxydaza silniej brązowieją (Bogdański C., Legrand G., 1950, Dupaigne P., Bogdański C. 1950), co je nieraz dyskwalifikuje jako surowiec do różnych gałęzi wytwórczości (soki, susze, kompoty, itp.), a zwłaszcza do produkcji soków pitnych (Bogdańscy H. i K. 1953).

Streszczenie

Autor przedstawił w niniejszej pracy wyniki oznaczeń aktywności oksydacyjnej dla 17-tu odmian jabłek-przeprowadzonych za pomocą metody pomiaru absorpcji tlenu zużytego przez soki w procesie utleniania. Procesy utleniania przebiegają u poszczególnych odmian z różnym nasileniem, uzależnionym od aktywności enzymatycznej i zawartości substratu.

RÉSUMÉ

L'auteur dans ce travail a exposé les résultats du dosage de l'activité oxydase — chez les variétés de la pomme — mesurée sur les jus au moyen d'une méthode absorptiométrique de l'oxygène consommé. Les processus d'oxydation varient — suivant la variété estimée — par le degré de son intensité et de sa durée, facteurs jouant un rôle des fonctions de l'activité du système enzymatique et du teneur de jus en substrat oxydable.

LITERATURA

- Barnes E. O., 1940. Biochemical studies of some varieties of apples, plums and grapes grown in Minnesota. Univ. of Minnesota-Agr. Exp. St. Techn. Bull. Nr 143.
- Bogdańscy H. i K., 1953. Zjawiska utleniania jako ważny problem przemysłu wytwórczego soków owocowych. Przem. Roln. i Spoż. 7: 15—19.
- Bogdańska H., Bogdański K., 1954. Wpływ przechowywania różnych odmian jabłek na wahania zawartości kwasu 1-askorbinowego jako funkcji zmian jędrności miąższu. Roczn. Nauk. Roln. 69 A: 385—408.
- Bogdański C. 1950. Contribution à l'étude du système oxydoreducteur des jus de pomme. Thèse de Doct. es Sciences, Paris-Sorbonne (streszczenie: 1950. Année Biol. 26: 681—682).
- Bogdański C., 1952. Étude sur le mécanisme de l'action de l'acide ascorbique dans les jus de pomme. Fruits et Dérivés. 21: 19—21.
- Bogdański K., 1953. Studium nad mechanizmem antyoksydacyjnego działania kwasu 1-askorbinowego (witaminy C) w sokach jabłkowych. Przem. Rol. i Spoż. 7: 167—171.
- Bogdański K., Bogdańska H., 1954. Pozorna zawartość witaminy C w sokach jabłkowych. Zeszyty Naukowe Politechniki Gdańskiej — w druku.

- Bogdański K., Bogdańska H., 1954. Zależność pomiędzy stopniem absorpcji tlenu a obniżaniem zawartości kwasu 1-askorbinowego w ekstraktach z tkanek jabłka. *Roczn. Chemii* 28: 291—293.
- Bogdański C., Legrand G., 1950. Notions sur l'activité oxydasique des jus de pomme frais ou pasteurisés. *Ind. Agr. et Aliment.* 67: 129—131.
- Carrick D. B., 1928. The effect of freezing on the catalase activity of apple fruits. *Cornell Univ. Agr. Exp. St. New York Univ. Ithaca.* Nr 122.
- Drain B. D., 1926. *Botan. Gaz.* 32: 183.
- Dupaigne P., Bogdański C., 1949. Influence de la température et de la durée de pasteurisation sur l'activités des polyphenoloxydases dans les jus de fruits. *Rev. Intern. des Ind. des Fruits.* 8: 43—44.
- Dupaigne P., Bogdański C., 1950a. Etude préliminaire sur le brunissement des produits de fruits. Mesure pratique de l'activité des polyphenoloxydases. *Ind. Agr. et Aliment.* 67: 387—392.
- Dupaigne P., Bogdański C., 1950b. Le mécanisme du brunissement des pommes et des produits dérivés. *Fruits et Dérivés.* 11: 45—48 i 12: 33—36.
- Keilin D., Mann T., 1938. Polyphenol oxidase. Purification, nature and properties. *Proc. Royal Soc.-Series B.* 125: 187—204.
- Legrand G., Bogdański C., 1950. Oxydation de l'acide ascorbique par les jus de pomme. *Compt. Rend. Acad. Sc.* 230: 2039—2041.
- Onslow M. W., 1919/1920. Oxidizing enzymes. *Biochem. Journ.* 13: 1 i 14: 535—541.
- Pointing J. D., Joslyn M. A., 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.* 19: 47—63.
- Sando C. E., 1937. *J. Biol. Chem.* 117: 45.
- Smock R. M., Neubert A. M., 1956. Apples and apple products. New York Interscience Publ. Inc.
- Strachan C. C., 1942. Factors influencing ascorbic acid retention in apple juice. Dominion of Canada-Dept. of Agric. Publ. 732 Techn. Bull. Nr. 40.
- Szent-Györgyi, 1928. *Biochem. Journ.* 22: 1387.