

Gyorsfagyasztott gyümölcsök barnulása

I. Polifenolok mennyiségi meghatározása

ALMÁSI ELEMÉR ÉS MOLNÁR DÁVID

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest.

Érkezett: 1961. május 18.

Egyes gyorsfagyasztott gyümölcsök, így elsősorban az őszibarack, sárgabarack, alma, szilva sok esetben már az előkészítő műveletek illetve a tárolás alatt, de főként felengedéskor erős elszíneződést, barnulást mutatnak.

Ez az elszíneződés, barnulás nemcsak a gyorsfagyasztott gyümölcsök gyártásánál illetve forgalombahozatalánál fordul elő, hanem egész sor élelmiszer, illetve élvezeti cikk gyártásánál lényeges, sok esetben káros, sokszor viszont kedvező szerepet játszik. Így szorosan kapcsolódik a dohány, tea fermentálásához, amikor is a barnulási folyamatot pozitívan kell értékelnünk a megfelelő szín kialakítása miatt.

A gyümölcs és zöldségfélék feldolgozásánál viszont a romlás kezdetjelének számít, bár pl. az almale gyártásánál megkívánunk bizonyos sárgás, barna színt.

Az élelmiszereknél bekövetkező barnulási folyamatok általában két csoportba oszthatók: a nem enzimes és az enzimes barnulásra. Ezek közül a gyorsfagyasztott gyümölcsök gyártási problémáit tekintve az enzimes barnulás a lényeges, mert a feldolgozás, tárolás, forgalombahozatal folyamán általában kisebb hőmérsékletek uralkodnak, ahol a nem enzimes barnulás bekövetkezésének kicsi a valószínűsége.

Az enzimes barnulás

A gyümölcs és gyümölcskészítmények enzimes barnulását már régen megfigyelték. Így *Lindet* már 1895-ben arra a megállapításra jutott, hogy az almamust barnulását a mustban levő „tannin” enzimes oxidációja okozza (1).

A növények oxidációs enzimjeit elsősorban a növények lélegzésénél betöltött szerepük tisztázása céljából vizsgálták. (Többek között *Szentgyörgyi* és iskolája is). Ugyanakkor viszonylag sokáig elhanyagolt területet képviselt a barnulást előidéző enzim-rendszerek, ezen enzimek szubsztratumainak és a barnulási folyamatok mechanizmusának vizsgálata.

Onslow (1931) állapította meg (1), hogy a legtöbb barnulásra hajlamos növényi szövet szabad, orto helyzetű dihidroxil benzol származékokat, „polifenolokat” tartalmaz. Ezeknek a vegyületeknek többé-kevésbé tiszta vizes oldatai is megbarnulnak. A barnulás gyorsabb, ha a vizes oldathoz növényi szövet kivonatot adnak, de csak akkor, ha a kivonatot nem forralják fel. Ennek alapján feltételezte, hogy ezekben a növényekben olyan enzim van, amely az orto helyzetű hidroxilokat tartalmazó polifenolok autooxidációját katalizálja.

Onslow a növényeket két csoportba osztotta: o-polifenoloxidázt és o-polifenolokat tartalmazó növényekre valamint olyanokra, amelyekben ezek a vegyületek nem szerepelnek, a peroxidázt tartalmazó növényekre.

Az első csoportba tartoznak: alma, sárgabarack, őszibarack, szőlő, körte, szamóca, cseresznye, füge, banán.

A második csoportba tartoznak a citromfélék, dinnye, paradicsom, ribizske, ananász.

A modernebb enzimvizsgálati módszerekkel sikerült megállapítani egy réztartalmú oxidáz jelenlétét, amely a fenolok molekuláris oxigénnel való oxidációját katalizálja, továbbá egy vas-porfirin vázú peroxidázét, amely

a fenolok hidrogénperoxiddal való oxidációját katalizálja. A további kutatások során egyéb enzimek hatásosságát is kimutatták. Így *Spitzer* (1931) az o-dihidroxifenilalaninoxidázét, *Balls* és *Male* (1935) a peroxidázét (1). Az újabb kutatások csak részben erősítették meg ezeket a megállapításokat.

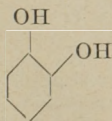
A jelenlegi ismeretek szerint (1) a gyümölcs-szövetek, illetve gyümölcs-készítmények enzimes barnulását elsősorban a polifenoloxidázok okozzák. A peroxidáz, flavoprotein enzim, citokromoxidáz csak alárendelt szerepet játszik. A polifenolok molekuláris oxigénnel való oxidációját természetesen többféle polifenoloxidáz katalizálja. Így *Nelson* és *Dawson* (1944) gombában olyan fenolázt talált, amely mind a monofenol, mind a polifenol jellegű vegyületeket oxidálni tudja. Ugyanilyen hatású enzimet talált *Kubowitz* (1937) a paradicsomban. *Ponting* és *Joslyn* (1948) peroxidáz mentes polifenolt vontak ki almából, amely csak az o-polifenolok oxidációját katalizálta.

Az eddigi vázlatos ismertetésből is kitűnik, hogy még sok kutatásra van szükség a polifenolok oxidációs barnulását előidéző enzimek tisztázására.

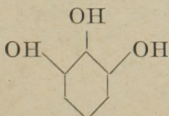
Ugyanez a helyzet ezen enzimek szubsztratumait illetően is. A legújabb vizsgálatok eredményeképpen (2) bizonyos áttekintés azonban már nyerhető ezen a területen is.

A fontosabb polifenolok

Az orto polifenolok legegyszerűbb képviselője a pirokatechin

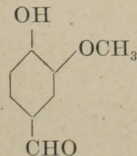
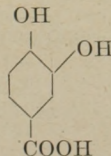
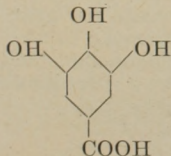
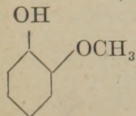


és a pirogallol



Ezek azonban sejtmérgek, a növényvilágban nem fordulnak elő.

Az egyszerűbb polifenolok közül, amelyek orto helyzetben szabad vagy észterezett OH gyököket tartalmaznak, ismertebbek és a természetben is előfordulnak.



guajakol

gallussav

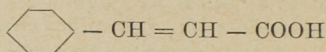
protokatechusav

vanillin

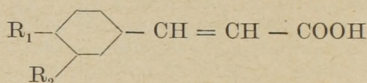
Az enzimes barnulásban azonban nem ezek az egyszerűbb vegyületek vesznek részt, hanem a növényvilágban fontos szerepet játszó fenilpropán származékok. Így elsősorban

- 1., az oxifahéjsavesterek
- 2., a leukoantociánok és katechinek.

1., Az oxifahéjsavészterek a fahéjsav



származékai. A gyümölcsök barnulása szempontjából fontosabb oxifahéjsavakat és észtereket a következő általános képlet tünteti fel:

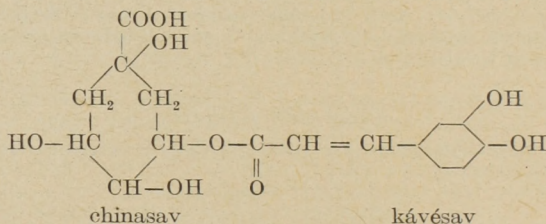


R₁ = OH, R₂ = H esetén p-kumársav

R₁ = OH, R₂ = OH esetén kávéssav

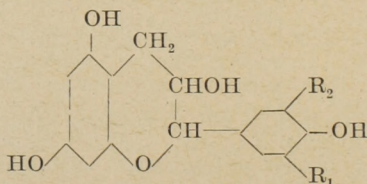
R₁ = OH, R₂ = OCH₃ esetén ferulasav

Az oxifahéjsavészterek egyik legelterjedtebb képviselője a klorogénsav



2., A katechinek és leukoantocianok a flavan vagy másként 2-fenilbenzo-dihidropropán származékai. Míg a katechinek alapváza flavanol-3, addig a leukoantociánoké flavandioll-3, 4.

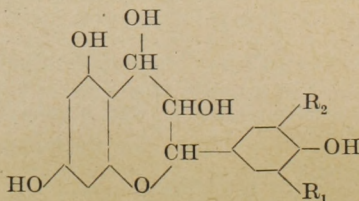
2. 1. A katechinek általános képlete



R₁ = OH, R₂ = H esetén (+) Katechin, illetve
(-) epikatechin (5, 7, 3', 4'-tetraoxiflavanol-3)

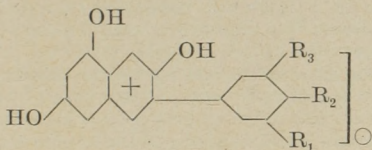
R₁ = OH, R₂ = OH esetén (+) gallokatechin
(-) epigallokatechin (delfinidoll) (3)
(5, 7, 3', 4', 5'-pentaoxiflavanol-3)

2. 2. A leukoantociánok általános képlete



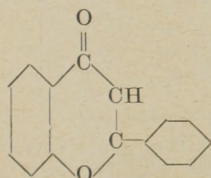
$R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$ esetén leukocianidin (5, 7, 3', 4' tetraoxiflevandiol-3, 4)
 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$ esetén leukodelfinidin (5, 7, 3', 4', 5' - pentaoxi-
 flavandiol - 3,4)

2. 3. A katechinekkel és leukoantociánokkal rokon vegyületek az antocianidinek



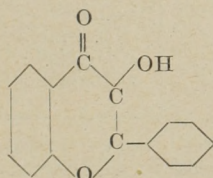
Az R_1 , R_2 és R_3 helyére belépő OH , H és OCH_3 gyököktől függően pelargonidin, cianidin, delfinidin, malvinidin antociánokról van szó.

2. 4. Ugyancsak rokon vegyületek az antoxantionok (a flavon, flavonol, flavanon, flavanonol származékai).



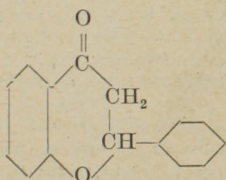
flavon

(2-fenilkromon)

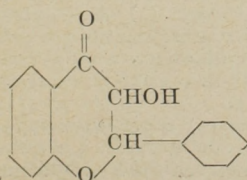


flavonol

(2-fenil - 3 hidrozikromon)



flavanon



flavanonol

A természetes flavonok illetve flavonolok: krizin, fizetin, apigenin, luteolin, galangin, kempferol, kvercetin (glukozidjai a kvercitrin és rutin), ramnetin.

A természetes flavanonok:

naringenin, eriodiktiol, heszperetin.

A természetben ezen kívül több izoflavon származék is előfordul (3).

A polifenolok mennyiségi meghatározása

A barnulásra hajlamos gyümölcsök polifenol tartalmának meghatározása azért fontos, mert az egyes fajták között lényeges különbség áll fenn a barnulásra való hajlam és az ezzel korrelációban levő polifenol tartalom között. Így Kertész (9) a nem barnuló „Sumbeam” őszibarack-fajtában 0,005—0,009%, ugyanakkor a barnuló „Elberta”-fajtában 0,132% „tannint” talált.

1., A polifenolok kivonása

A polifenolok izolálása a növényi nyersanyagokból jelentős nehézségekkel jár. Az egyik nehézség ott jelentkezik, hogy az előkészítő műveletek alatt az aktív polifenoloxidáz hatására a polifenolok átalakulnak. Ezért a nyersanyagban rendszerint 15–30 perces főzéssel inaktíválják a polifenoloxidázt (2, 4). Ugyancsak nehézséget jelent a megfelelő oldószer megválasztása. *Onslow* (1) a kioldásra etilalkoholt használt. Ugyancsak ezt használja *Munter*, *Johnson*, *Mikhaïlov* (4, 6, 7). *Clark* (5) acetont, *Roux* (8) etilacetátot, *Hermann* (2) metanolt használ. A legmegfelelőbb oldószer megállapítása céljából vizsgáltuk, hogy burgonyából egyébként azonos eljárás esetén különböző oldószerekkel mennyi polifenolt lehet kivonni. Az eredményeket a következő táblázat tünteti fel.

Oldószer	Polifenol mennyiség mg/100 g
aceton	34,5
etilacetát	45
etilalkohol	54
metilalkohol	82

Feltételezve, hogy a gyümölcsökre vonatkozóan is érvényesek a táblázatban közölt megállapítások, a polifenolok kioldására metilalkoholt alkalmaztunk.

2., Előkészítés a meghatározáshoz

Az előkészítési eljárás célja az oldószeres kivonatok bizonyos mértékű tisztítása. *Onslow* (1) az alkoholos kivonatból az alkohol ledesztillálása után ólomacetáttal kicsapta a polifenolokat, majd kénsavas precipitálás és szűrés után határozta meg a polifenolokat. Hasonlóan jár el *Clark* (5) is. Tapasztalatunk szerint ez az eljárás igen hosszadalmas és tetemes veszteségekkel jár.

Johnson (6) mügyantás tisztítást alkalmaz, *Hunter* (4) petroléterrel, illetve benzinnel oldja ki a zsirokat és viaszokat, *Hermann*, *Roux* (2, 8) az alkoholos kivonatból kloroformmal távolítja el a purinokat stb.

Az újabb fotometriás meghatározási módszerek kidolgozása révén (10) a meghatározás közvetlenül az eredeti vagy vákuumban besűrített metanolos kivonatból végezhető. Mi is ezt az eljárást alkalmaztuk.

3., Meghatározás

A polifenolok mennyiségi meghatározásánál a jelenleg alkalmazott eljárásokkal nem a polifenolok tényleges mennyiségét határozzuk meg, hanem többé-kevésbé fiktív számokat kapunk. Ez természetes is, mert nem egynemű anyagról van szó, hanem különböző anyagok változó arányú keverékéről. Ezért bármiféle vonatkoztatási alapot is használunk (OH gyökök, pirokatechin, kávésav stb.), csak tájékoztató jellegű számokhoz jutunk. A legrégebbi eljárások közül megemlíthető a ferrikloridos titrálás (1), a *Löwenthal*-féle, 1860-ból származó káliumpermanganátos titrálás indigokarmin indikátor jelenlétében, amelyet még ma is használnak (10).

Az újabb, használatos eljárások közül megemlíthetők a következők:
1., A *Kurszanov*—*Zaprometov* módszer (12, 11).

Ennek lényege, hogy Seignette só jelenlétében FeSO_4 segítségével határozza meg a polifenolokat. A FeSO_4 csak az orto-helyzetű, illetve 1, 2, 3 soros elrendezésű hidroxil-csoportokkal rendelkező polifenolokkal lép reakcióba. A Seignette só stabilizálja a színt, amelynek erőssége függ a pH-tól, ezért foszfátpufferben kell végezni a meghatározást. A színt S 72-es szűrővel 5 cm-es küvettában fotométeren mérik. Az 1, 2, 3 soros elrendezésű hidroxil-csoportokat tartalmazó polifenolok meghatározásánál 6,24 pH-jú, az orto helyzetű hidroxilokat tartalmazó polifenolok meghatározásánál 8,08 pH-jú puffer oldatokat használnak. A módszert kidolgozták orto és 1, 2, 3 soros elrendezésű hidroxilgyököket tartalmazó polifenol keverékek meghatározására is.

A meghatározást szalicilsav, guajakol, triptofán, tirozin, fenilalanin piridin, nukleinsav, inozit, glükóz és glicerin nem zavarják. A citromsav, kávéösszav, almasav, fumársav, oxálsav 1000 μg fölött zavarja a meghatározást. Nem reagálnak a polifenolok, ha az orto helyzetű hidroxilok közül az egyik metilezve van. A soros elrendezésű hidroxiloknál 1 helyettesítés, ha szélső helyzetű, nem csökkenti a reakció készséget.

2., Az *Arnou* (3) által kidolgozott meghatározási módszer lényege, hogy a fenolos OH csoportokat tartalmazó vegyületek NaNO_2 -vel melegítve sárga színű vegyületet képeznek, amely kolorimetriásan meghatározható. A lúg hatására rózsaszínűvé vált szín nátriummolibdát hozzáadásával 1 óra hosszat stabilizálható.

3. A *Spanyár—Inczédi* (14) által flavanol és flavanon típusú vegyületek meghatározására kidolgozott módszer lényege, hogy szulfanilsav jelenlétében képződő azovegyületek színét fotokoloriméterrel mérik.

4. Az 1, 2 dihidroxil és 1, 2, 3 trihidroxil (1, 4 dihidroxil) benzolvegyületeknél alkalmazható *Swain* és *Hillis* által (15) javasolt módszer. Ennek lényege, hogy a polifenolok Folin-Denis reagenssel képezett színét mérik. Aszkorbinsav jelenléte növeli az eredményt. A színt 725 μ -nál mérik.

5. Az oxifahéjsavak mennyiségi meghatározására (10) a spektrofotometriás módszer alkalmas. Az oxifahéjsavaknak az UV tartományban 300 $m\mu$ körül széles sávú maximumuk van. Ezen maximum kimérésével (rendszerint 300—325 $m\mu$) meghatározhatók az oxifahéjsavak. Ugyanez a helyzet a flavonoknál és antociánoknál is, úgyhogy ezeket is közvetlenül lehet határozni. Katechinek és leukoantociánok jelenlétében az eljárás nem alkalmazható.

6. A leukoantociánok meghatározhatók antociánná való átalakítás után. *Swain* és *Hillis* (16) módszere szerint a leukoantociánokat HCl-el hidrolizáltatják, majd 550 $m\mu$ -nál mérik a kialakult színt.

7. A katechinek és leukoantociánok együttes meghatározásánál (15) vanillinrel képződő színt mérik 450 $m\mu$ -nál.

Az alkalmazott eljárás

A kivonási, előkészítési, meghatározási módszerek kritikai vizsgálata után a következő eljárást alkalmaztuk a gyümölcsök polifenol tartalmának meghatározására.

1. Kioldás, előkészítés. 200 g anyagot kevés vízzel 15 percig forraltunk, majd lehűtés után hozzáadtunk 200 ml metanolt, turmixban felaprítottuk, hozzáadtunk még 600 ml metanolt és kb. 0 C°-on 14—16 órán át állni hagyjuk. Ezután redős szűrőpapíron szűrtük, 200 ml metanollal mostuk. A szűrletek összeöntése után vákuumban 100—200 ml-re besűrítettük.

2. Meghatározás. Az előzőekben felsorolt meghatározási módszerekkel kapcsolatosan a következőket állapítottuk meg.

A *Kurszanov*—*Zaprometov*-módszer hosszadalmas és nehézkes, csak kellően tisztított oldatokkal végezhető el a meghatározás. A *Spanyár*—*Inczédi*-eljárás a polifenolok meghatározására nem eléggé érzékeny.

Az oxifahéjsavak UV tartományban való spektrofotometriálásához megfelelő anyag szükséges a kalibrációs görbe felállításához, ezzel azonban nem rendelkezünk. Ugyanez vonatkozik a leukoantociánok antociánná való átalakítására is. Ezért az *Arnou* és a *Swain* és *Hillis*-féle Folin—Denis reagenses módszert alkalmaztuk a polifenolok együttes meghatározására.

Az *Arnou*-féle meghatározási eljáráshoz szükséges oldatok:

1. 0,5 N HCl oldat
2. Nitrit-molibdát reagens. 10 g NaNO_2 -t és 10 g nátriummolibdátot 100 ml-re oldunk fel
3. 1 n NaOH oldat
4. Standard oldat. 192 mg pirokatechint deszt. vízzel 1 l-re oldunk fel. Toul alatt tároljuk. Ebből a törzsoldatból 10 ml-t 100 ml-re feloldva kapjuk a standard oldatot.

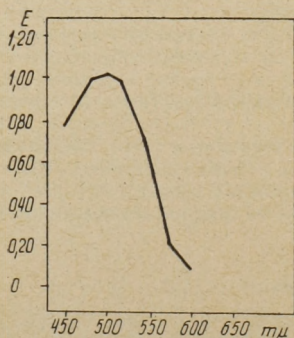
Eljárás: 1 ml vizsgálandó oldatot (0,02—1 mg polifenol tartalommal) 5 ml-es jelzett mérőedénybe teszünk. Hozzáadunk sorban 1 ml 0,5 N HCl-t, 1 ml nitritmolibdát reagenst (sárga szín lép fel), 1 ml NaOH-t (piros lesz a szín), és 5 ml-re töltjük fel. 1 órán belül fotométerben mérjük.

A polifenolmennyiséget a standard-oldattal felállított kalibrációs görbe segítségével határozzuk meg.

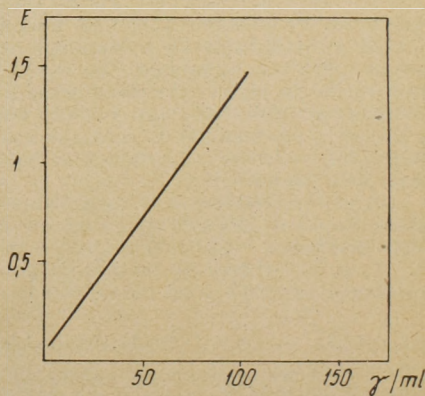
A standard-oldat segítségével 400—580 μ között kimértük az extinkció értékeit. Az eredményeket az 1. ábra tünteti fel.

Ezután a 450 μ -s maximumnál felállítottuk a kalibrációs görbét. (2. á.)

A *Swain* és *Hillis*-féle meghatározás menete:



1. ábra



2. ábra

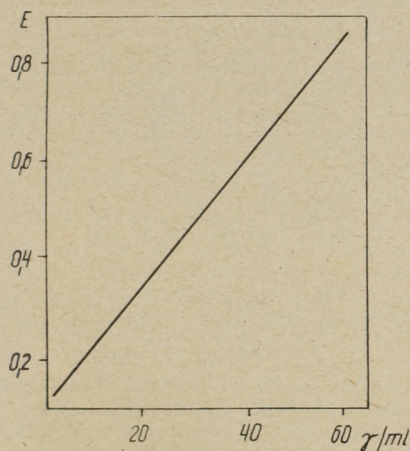
Oldatok: 1. Folin—Denis reagens: 10 g Na_2WO_4 -t, 2 g foszformolibdén-savat, 5 g foszforsavat (85%-os) 75 ml vízben feloldva 2 óra hosszat forralunk. Szűrés és lehűtés után 100 ml-re töltjük fel.

2. Telített Na_2CO_3 oldat.

Eljárás: 0,5 ml metanolos növényi kivonatot 7 ml vízben oldunk,

10 ml-es mérőedénybe öntjük. Hozzáadunk 0,5 ml Folin—Denis reagenst, összerázzuk. Pontosan 3 perc múlva hozzáadunk 1 ml telített Na_2CO_3 oldatot, 10 ml-re feltöltjük. 1 óra múlva 725 $\text{m}\mu$ -nál fotométerben mérjük.

A pirokatechinnel felállított kalibrációs görbét a következő ábra mutatja.



Eredmények

Néhány hazai gyümölcsfélése^g polifenol tartalmát a fenti eljárásokkal meghatározva a következő táblázat tünteti fel.

Megnevezés	Fajta	Polifenol tartalom mg/100 g	
		Arnou	Swain és Hillis
módszerrel			
Cseresznye	Germersdorfi	24	
Cseresznye	fehér	28	
Cseresznye	Szomolyai fekete	64	
Meggy	Cigány	84	
Meggy	befőtt	25	64
Málna	—	30	44
Málna	gyorsfagyasztott	11	
Szamóca	Eszterházi	50	
Sárgabarack	—	45	
Sárgabarack	gyorsfagyasztott	16	20
Őszibarack	Mayfleur	15	
Őszibarack	Elberta	27	
Őszibarack	Amsden	32	
Őszibarack	befőtt	16	33
Körte	gyorsfagyasztott	10	16
Szilva	Olaszkék, gyorsfagyasztott	27	75

A táblázat adataiból megállapítható, hogy a *Swain* és *Hillis* módszerrel nagyobb polifenol értékeket kapunk, mint az *Arnou* módszerrel.

IRODALOM

- (1) *Joslyn M. A. Ponting I. D.*: Enzyme-catalyzed oxidative browning of fruit products. *Advances in Food Research* 3, New York, 1951.
- (2) *Hermann K.*: *ZUL*, 106, 341, 1957.
- (3) *Fodor G.*: Szerves kémia, Budapest, 1960.
- (4) *Hunter A. S., Meister E. G. et al.*: *Food Research* 22, 648, 1957.
- (5) *Clark W. L., Mondy N. et al.*: *Food Technology* 6, 297, 1957.
- (6) *Johnson G., et al.*: *Food Research*, 16, 169, 1951.
- (7) *Mikhailov M. K.*: *Acta Chhimica*, 10, 421, 1957.
- (8) *Roux D. G., Maibs E. A.*: *The Biochemical Journal*, 74, 44, 1960.
- (9) *Kertész Z. I.*: *New York State Agric. Exper. Stat. Techn. Bull.* Nr. 219, 1933.
- (10) *Hermann K.*: *Die Fruchtsaftindustrie* 3, 87, 196.
- (11) *Roberts A. M.*: *Food Agric.* 11, 153, 1960.
- (12) *Kurnaszov A. L., Zaprometov M. N.*: *Biohimija*, 5, 467, 1949.
- (13) *Arnou L. E.*: *J. Biol. Chem.* 118, 531, 1937.
- (14) *Spányár P.—Inczédy A.*: *КОНИКИ közlemények*. I.—II. 13, 1958.
- (15) *Swain T., Hillis W. E.*: *J. Sci. Food Agric.* 10, 63, 1959.
- (16) *Swain T., Hillis W. E.*: *J. Sci. Food Agric.* 10, 533, 1959.

ПОТЕМНЕНИЕ БЫСТРОЗАМОРОЖЕННЫХ ПЛОДОВ. I. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ

Э. Алмаши и Д. Молнар

Авторы сообщают на основе литературных данных настоящее положение знаний в области полифенолов, субстратов ферментного потемнения плодов. На основе сопоставления нескольких методов определения количества полифенолов сообщают два наилучших метода определения. Сообщают данные содержания полифенолов в домашних видах плодов и консервированных изделиях.

DIE BRÄUNUNG VON SCHNELLGEFRORENEM OBST I. QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER POLYPHENOLE

E. Almási und D. Molnár

Die Verfasser geben eine Literaturübersicht über den gegenwärtigen Stand der Kenntnisse auf dem Gebiete der Obstbräunung, mit besonderer Berücksichtigung der Polyphenole, als Substrate der enzymatischen Bräunung. Auf Grund vergleichender, zur quantitativen Bestimmung der Polyphenole geeigneter Untersuchungen beschreiben sie die beiden sich am besten bewährenden Methoden. Sie teilen einige Angaben über den Polyphenolgehalt der einheimischen Früchte und Obsterzeugnisse mit.

BROWNING OF QUICK-FROZEN FRUITS I. QUANTITATIVE DETERMINATION OF POLYPHENOLS

E. Almási and D. Molnár

The present knowledge of phenomena connected with the browning of fruits, particularly in the field of polyphenols as the substrates of enzymatic browning is surveyed by the authors on the basis of data of literature. Based on a comparing examination of various methods suitable for the quantitative determination of polyphenols, two methods of determination are described which proved to be best suited for this purpose. Data are given in respect to the polyphenol content of Hungarian fruits and fruit products.