

THE INVESTIGATION OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF GLUCOSINOLATES BY MYROSINASE OF MUSTARD SEEDS

Professor Bezusov A.T., Doctor of Engineering, Liato V.I., Ph.D. candidate
Odessa National Academy of Food Technologies

The work was carried out in order to study how myrosinase acts under different conditions. This work allows us to develop the technology for canned foods from the cabbage vegetable such as juices, juice concentrates, dry powders (dietary fiber with adsorbed glucosinolates) puree etc.

Проведена робота по дослідженню діяльності мирозинази в різних умовах. Це дозволяє розробити технологію консервованих продуктів із капустяних овочів: соки, концентровані соки, сухі порошки (їстівні волокна з адсорбованими глюкозинолатами) пюре і др.

Keywords: glucosinolates, cruciferous, sulphoraphane, myrosinase.

The presence of glucosinolates is one of the main features of the chemical composition of cruciferous vegetables. Glucosinolates are sulfur-containing phytonutrients widespread in nature. There are more than 120 different species. They occur as secondary metabolites in almost all plants of the genus Brassicales (including the family Brassicaceae, Capparidaceae and Caricaceae).

Glucosinolates are water-soluble anions and belong to the glucosides. Each glucosinolate has a central carbon atom, which is joined to a thioglycoside group through a sulfur atom and to the sulfate group with the help of the nitrogen atom. In addition, the central carbon is associated with the side group. [1,2] (Fig. 1)

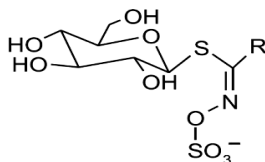


Fig. 1 – The overall structure of glucosinolates (R- functional group)

Glucosinolates differ depending on the structure of the side groups of the radical (R). This difference in the side groups is responsible for changes in the biological activity of these compounds in plants. Most of the work was carried out in connection with the toxic effects (such as goitrogen) on animals which were eating different kinds of cabbage, mustard, rape, etc., where large doses of glucosinolates were presented. [2]

Toxic effect is not related to glucosinolates but to the products of their decomposition - to thiocyanate, nitriles or isothiocyanates. These compounds are unstable and eventually transform into cyclic compounds causing, in the human goitrous disease.

The pharmacological effects of glucosinolates as protective agents against carcinogens were recently established to block the beginning of the formation of tumors in various decaying tissues such as liver, colon, breast, pancreas, etc. They inhibit the activation of enzymes and changes in the metabolism of steroid hormones and protect against oxidative damage. [1,2,3]

So far, it was managed to isolate indoles from plants of the cabbage family, which have an antitumor effect: ascorbigen, indole-3 carbinol, diindolylmethane and isothiocyanate, the most active of which is sulphoraphane (Fig.2).

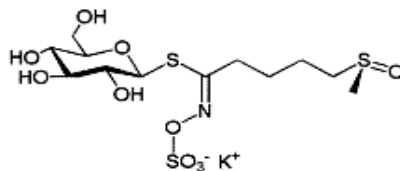


Fig. 2 – The overall structure of sulphoraphane

It was found that only undistorted glucosinolates show the pharmacological effect in humans. These glucosinolates later are converted into sulphoraphane under the influence of liver enzyme system. [4]

It was found that sulphoraphane is the most powerful amplifier of those enzymes which stimulate the ability of animal cells to resist diseases. [5,6]

Sulphoraphane is found in cruciferous vegetables such as broccoli and different kinds of cabbage. In its initial form (before the cell is damaged) sulphoraphane appears in the form of an indirect antioxidant. [4]

Sulphoraphane induces the activity of enzymes of detoxification. These enzymes act as a protective mechanism. They cause antioxidant activity that neutralizes free radicals to prevent cell damage that can lead to mutations which leads to cancer. In addition, the consequences of these indirect antioxidants remain even after they have reacted, unlike direct antioxidants, which neutralize only one molecule radical during the process and then immediately disintegrate. Indirect effect of antioxidants is long-term in nature and it causes an ongoing process that remains efficient and can last for several days [5].

On today's market of pharmacy there is a wide range of medicines and dietary supplements, extracted from plants of the cabbage family, in particular, such active ingredients as ascorbigen, indole-3 carbinol, diindolyl-metan and sulforaphane.

Cabbage vegetables are widely used in technology of preserving fruits and vegetables. Therefore the purpose of work is the development of production technology for canned foods from the cabbage with therapeutic and prophylactic purpose. During the processing of raw material which contains glucosinolates in its structure at the time of grinding enzymatic destruction takes place. This happens because of myrosinase in raw material, which turns glucosinolates into isothiocyanates, nitriles or thiocyanates. (Fig.3), [4.2]

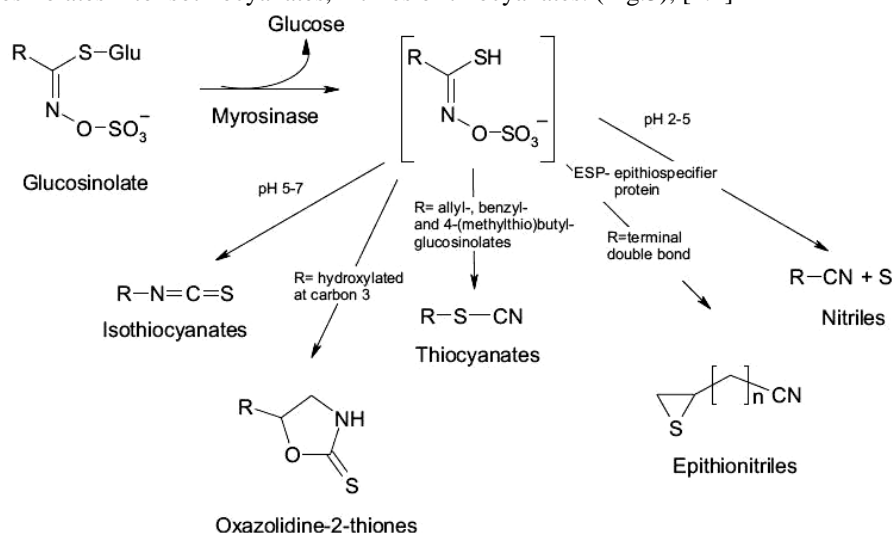


Fig. 3 – Structure of possible enzymatic destruction of glucosinolates

The hydrolysis of glucosinolates by myrosinase resembles the hydrolysis of glucosides by β -glucosidase. The difference lies in the presence of glucosinolates in the substrate – sulfur, β -glucoside oxygen. Aglycone fragment formed during the reaction may be an inhibitor or activator of the enzyme. [7,8]

The main feature of myrosinase is its high stability, and this is related to its role in the mechanism of plant protection.

In plant tissue glucosinolates are separated from myrosinase and exhibit hydrolytic effect only after tissue (cells) is damaged. This reaction is important for protecting plants from pests. Isothiocyanates formed during the hydrolysis of glucosinolates are detrimental for pests. [9, 10]

Unlike other enzymes, the formation (synthesis) which occurs in response to the needs of the cell, myrosinase is always present in an active, free form.

One of the features of β -glucosidases is their reaction to transglycosylation while myrosinase lacks this ability. The activator for myrosinase is L-ascorbic acid, for β -glucosidases, it acts as an inhibitor.

Myrosinase participates in the catalytic conversion of the aglycone. During the detachment of HSO_4^- (sulfate) under the influence of thiosulphatase, the activity of myrosinase reduces (stops) due to a possible rearrangement of the aglycone and the loss thioglucosidase activity. In the primary abstraction of glucose, the activity of myrosinase does not change [8].

In order to prevent the spontaneous hydrolysis of glucosinolates among other possible of inhibition of enzymes used in canning technology we can apply the method of thermal inactivation or inhibition of enzyme by changing pH.

We found that the enzyme myrosinase is most active at pH 7. By reducing the acidity of the medium to 3 the enzyme is completely inactivated. (Fig. 4)

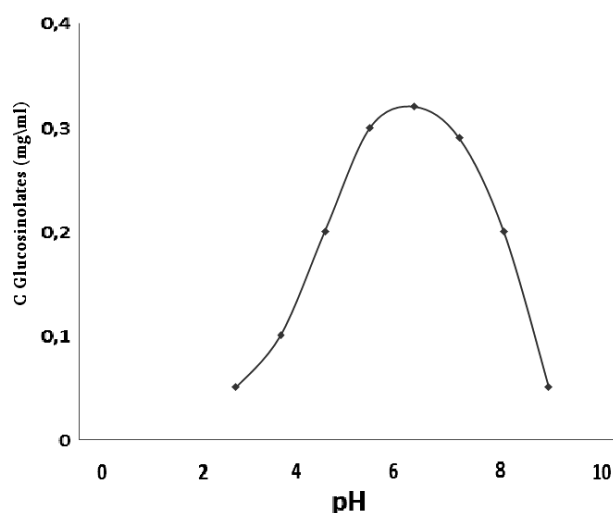


Fig. 4 – Dependence of myrosulphatase at different pH values

The thermal optimum of the enzyme myrosinase was investigated by (Fig. 3). With an increase in temperature, the inactivation of myrosinase occurs at 70 °C. Applying the temperature of inactivation will be effective at very rapid heating of raw materials up to 80 °C – it can be implemented in a steam-thermal unit (which is used to clean beet).

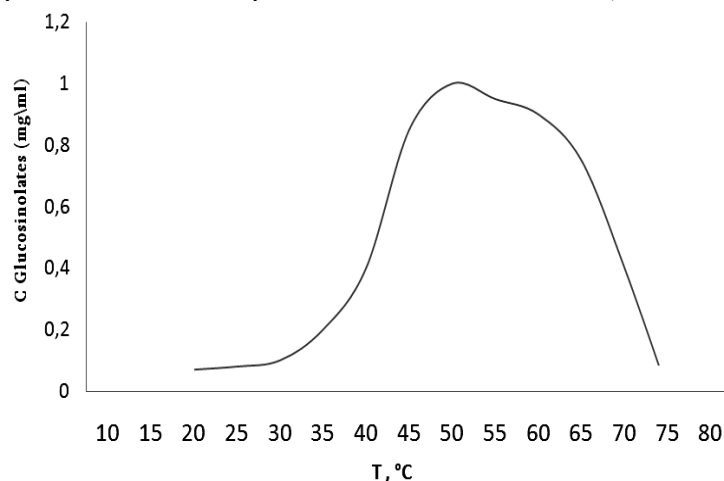


Fig. 5 — Dependence of temperature on myrosinase

Thus, on the basis of these studies it has become possible to develop the technology for products from cabbage vegetables: juices, concentrated juice, dry powders (dietary fiber with adsorbed glucosinolates), puree, etc.

Reference

1. J. P. Wathelet, P. J Wagstaffe., A. Boenke (1991): The certification of the total glucosinolate and sulphur contents of three rapeseeds (colza) CRMs 190, 366, 367. EUR 13339EN
2. Rosa,E.A., Heaney,R., Fenwick,G.R. and Portas,C.A.M. (1997) Glucosinolates in crop plants. In Janick,J. (ed.) *Horticultural Reviews*. John Wiley, Oxford, pp. 99–215.
3. Srinibas Das, Amrish Kumar Tyagi and Harjit Kaur (2000). "Cancer modulation by glucosinolates: A review"
4. Burow, M; Bergner, A; Gershenzon, J; Wittstock, U (2007). "Glucosinolate hydrolysis in *Lepidium sativum*-identification of the thiocyanate-forming protein.". *Plant molecular biology* 63 (1): 49–61. doi:10.1007/s11103-006-9071-5. PMID 17139450.
5. Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH (March 1992). "A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (6): 2399–403.
6. Matusheski,N.V. and Jeffery,E.H. (2001) Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile.*J. Agric. Food Chem.*, 49, 5743–5749.
7. «Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells» Graham P. Basten, Yongping Bao and Gary Williamson1.

8. Studies on the Mechanism of Myrosinase «investigation of the effect of glycosyl acceptors on enzyme activity» M. Grazia Botti, Malcolm G. Taylor and Nigel P. Botting.
9. «The myrosinase–glucosinolate system in the brassicaceae and its role in herbivore defense.» Steven J. Rauth
10. «Glucosinolates and their potential role in plant» Ivana Radoj, Redovnikovi, Tatjana Gliveti, Karmela Delonga, Jasna Vorkapi-Fura

УДК 664.86 : 635.41-026

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА БУРЯКОВОГО СОКУ НА ЙОГО ЯКІСТЬ

Сторожук В.М., канд. техн. наук, доцент, Галак О.В., студент
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

Досліджена технологія отримання бурякового соку без м'якоті із сирого і бланшованого буряка, обґрунтовані параметри процесу стерилізації і визначена його якість.

Researched technology for beet juice without pulp of raw beet and blanshovanoho, reasonable parameters of sterilization and determined its quality.

Ключові слова: буряк, бетанін, очищення, витягання соку, рН, стерилізація, летальність, показники якості.

Овочеві соки — цінний продукт харчування. Вони мають дієтичне і, в ряді випадків, лікувальне значення. Вони сприяють засвоєнню їжі і покращують обмін речовин.

Один із видів овочевих соків — буряковий, особлива цінність і лікувально-профілактична дія якого обумовлена наявністю розчинного пігмента — антоціаніну бетаніна [2].

У процесі переробки буряка з різних причин антоціани руйнуються і колір втрачається. Збереження ж природного кольору буряка є одним із суттєвих показників високої якості одержаного соку.

Оскільки, згідно з діючою НД, буряковий сік без м'якоті виробляють із сирого і бланшованого буряка, то і якість його може бути різною [4].

Відомо, що причини втрати кольору при переробці буряка носять ферментативний і неферментативний характер і пов'язані з використанням різних способів очищення буряка від шкірки.

Швидке ферментативне потемніння механічно очищеного і подрібненого перед витяганням соку буряка відбувається внаслідок окислення амінокислоти тирозину і утворення темнозбарвлених сполук — меланінів. При паротермічному очищенні в апаратах А9-КЧЯ руйнування фермента тирозинази відбувається при тепловій обробці коренеплодів гострою парою під тиском (750 ± 50) кПа до досягнення усередині клубня температури 98°C .

У свою чергу, нагрівання овочів приводить до неферментативного потемніння — руйнування антоціанів і зміни кольору соку. Останнє спостерігається і при наступній стерилізації.

Мета роботи — отримати буряковий сік без м'якоті за двома схемами — із сирого і бланшованого буряка з визначенням виходу соку при пресуванні, обґрунтувати режим стерилізації і визначити його якість.

Сік отримували згідно зі схемою, наведеною на рис. 1.

З наведених на схемі технологічних процесів досліджувались такі:

- очищення буряка з відповідною обробкою мезги і визначення показника клітинної проникності;
- витягання соку;
- змішування — корегування рН;
- процес стерилізації з визначенням необхідної і фактичної летальності.

Вибираючи спосіб попередньої обробки буряка, врахували, що тепла обробка, одночасно з інактивацією тирозинази, дозволяє збільшити клітинну проникність сировини в 10 разів і збільшити вихід соку з 35 % до 57 %.

Через низьку кислотність (рН 5,5...6,5) буряковий сік стерилізують при високій температурі (120°C) [5].

Для пом'якшення режимів стерилізації сік підкислюють аскорбіною і лимонною кислотами до рН не більш 4,4. У цьому випадку необхідну летальність режимів стерилізації відносно *S. sporogenes* розраховували за формулою [1]