

Orbán Csaba¹, Csajbókné Cs. Éva¹, Dobronszki Andrea¹

Érkezett/Received: 2013. december/December – Elfogadva/Accepted: 2014. február/February

Az uborka (*Cucumis sativus*) érése során bekövetkező beltartalmi értékváltozások

Összefoglalás

Az uborka (*Cucumis sativus*) a magyar lakosság által egyik legnagyobb mennyiségben fogyasztott zöldségféle. A nemzetközi irodalomban számtalan olyan cikk lelhető fel, amelyek más élelmiszerekkel összehasonlítva vizsgálják a vitaminokat, az összes polifenoltartalom, valamint az antioxidáns-aktivitás értékeit, ugyanakkor a termés érettségének függvényében nem történtek vizsgálatok. Célunk volt, hogy az érés egyes stádiumban meghatározzuk a peroxidáz (POX)-, glutathion-S-transzferáz enzim (GST) aktivitásának változásait, valamint az összes klorofilltartalom és antioxidáns-aktivitás alakulását. Eredményeink alapján az érés előrehaladtával a peroxidáz-aktivitás csökken, míg a GST-aktivitás nő. A klorofilltartalom folyamatosan csökken, míg az antioxidáns-kapacitás lényegében nem változik. Mindezek alapján elmondható, hogy bár az uborkában igen jelentős növényélettani változások zajlanak, a táplálkozástudományi paraméterek változásai nem követik egyöntetűen az enzimek aktivitásváltozásait.

Bevezetés

Az uborka (*Cucumis sativus*) a hazai lakosság által egyik legnagyobb mennyiségben fogyasztott zöldségféle. Irodalmi adatok alapján egyik vitamin [1], valamint összes polifenol tartalom [2], és az egyes fenolos savak tekintetében [3] sem beszélhetünk magas értékekről a termésben, ahogyan karotinoidtartalma is minimális [4]. Antioxidáns-aktivitásáról szintén számos cikk lelhető fel, amelyek egyöntetűen bizonyítják, hogy más zöldség- és gyümölcsfélénkkal összehasonlítva alacsony gyökfogó képességgel rendelkezik [5], [6]. Mindezek ellenére kedvező elemösszetétele [7] és az antioxidáns tulajdonságú klorofill- [8], valamint élelmi rost tartalma [9] miatt mégis táplálkozási szempontból fontos élelmiszerek tekinthető.

Ugyan számos kutatás foglalkozik az uborka beltartalmi paramétereivel, de ezek főként más zöldségfélékben mért értékekkel vetik össze az egyes beltartalmi paramétereket, míg az érés során bekövetkező változásokról kevés forrás értekezik. Korábban más növényi élelmiszereken végzett vizsgálataink igazolták, hogy az érés során jelentős változásokkal kell számolni mind a növényélettani paraméterek, mind

az egészségmegőrzés szempontjából jelentős komponensek tekintetében [10]. Ezek közül kiemelkedően fontos a szabadgyökök eliminációjára való képesség, valamint az antioxidáns típusú színanyagok mennyiségi változása [11].

A változások oka egyrészt az, hogy az érés során a fejlődő növényben jelentős biokémiai változások történnek a kifejlett termésre jellemző szöveti struktúra kialakítása céljából, amelyek az egészségmegőrző komponensek mennyiségét is befolyásolják [12], másrészt maga az érés a növény számára stresszhatást jelent, ezért erre a megfelelő biokémiai folyamatok módosításával reagál [12]. A stresszre adott fiziológias válasz egyik legfontosabb eszköze a növény részéről a peroxidáz-enzimek aktivitásának változása [13]. A peroxidázok (POX) olyan protohem proszterikus csoportú direkt végoxidázok, amelyek légköri oxigén segítségével oxidálnak el különböző szubsztrátokat. Érdeklőség, hogy az egyes izoenzimek megoszlása szövetspecifikus [14]. Számos tanulmány igazolja, hogy az enzim aktivitása biotikus és abiotikus stressz hatására drasztikusan megváltozik [15].

¹ Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar, Alkalmazott Egészségtudományi Intézet, Dietetikai és Táplálkozástudományi Tanszék

¹ Semmelweis University, Faculty of Health Sciences, Institute of Applied Health Sciences, Department of Dietetics and Nutrition Sciences

A peroxidázokhoz hasonlóan a Glutathion-S-transzferáz (GST) enzim is a növényi anyagcsere kulcsfontosságú enzime, amely többek között a peszticidok eliminációjában, illetve az egyéb, fejlődési szakaszban keletkező szabadgyökök ellen védi a növényi szöveteiket [16], [17].

Mindezek teszik a két enzimet alkalmasá arra, hogy jelezzék a fejlődésben lévő termés aktuális növényélettani állapotát. A POX- és GST-aktivitás, valamint a táplálkozástudományi paraméterek együttes vizsgálata révén pedig teljesebb képet kaphatunk az uborka termésében az érés során lejátszódó változásokról.

Anyagok

Vizsgálati mintáinkat egy Heves megyei őstermelőtől szereztük be. A vizsgálati minták (*Cucumis sativus* cv. *Trilogy F1*) fóliasátras termesztésből származtak, ahol termőföldbe ültetve, csepegtetőrendszer segítségével öntözve történt a termesztésük. A vizsgálat napján 5 növényen lévő összes termést leszedtük, majd azonnal megkezdtük a feldolgozást. Ennek során méret alapján érettségi stádiumokba soroltuk a mintákat, majd megkezdtük a vizsgált paramétereknek megfelelő kivonatok elkészítését.

Módszerek

Klorofiltartalom meghatározása

A klorofiltartalom mérésére a szakirodalomban leírtak szerint [18] tiszta acetonos kivonást készítettünk, majd $\lambda=661.6$ és $\lambda=644.8$ nm-en mértük az abszorbanciát spektrofotométer segítségével. A klorofiltartalmat az alábbi képlet alapján számoltuk:

Klorofill a ($\mu\text{g}/\text{mg}$) = $11,24 \cdot A_{661.6} - 2,04 \cdot A_{644.8}$,
Klorofill b ($\mu\text{g}/\text{mg}$) = $20,13 \cdot A_{644.8} - 4,19 \cdot A_{661.6}$,
Klorofill össz. ($\mu\text{g}/\text{mg}$) = Klorofill a + Klorofill b

Az antioxidáns aktivitás meghatározása

Az antioxidáns aktivitás meghatározására a FRAP-módszert alkalmaztuk [19]. A mintákból 3% ortofoszforsavat és 10mM EDTA-t tartalmazó extrakciós eleggyel készítettünk kivonatot, majd a szakirodalomban leírtak szerint végeztük a vizsgálatokat. Adatainkat aszkorbinsav-egyenértékben (AsAe) adjuk meg.

Az enzimaktivitások meghatározása

A peroxidáz-, és glutathion-S-transzferáz enzimaktivitások meghatározásához 1 mM polietilén-glikolt, 1 mM fenilmetánszulfonil-fluoridot, 8 % polivinilpirolidont és 0,01 % TritonX-100-at tartalmazó pH7,5-ös Na-foszfát pufferrel homogenizáltuk a mintákat, majd 2000 g-n történő 20 perces gradiens centrifugálást követően a felülúszó fázisból végeztük el az enzimaktivitások meghatározását. A POX-aktivitás meghatározásakor a tetragvajakol képződését mértük 470 nm-en H_2O_2 szubsztrát jelenlétében, míg a GST-aktivitás mérésekor a reakcióelegyben lévő redukált glutathion és 1-kloro-2,4-dinitrobenzén konjugátum

képződésének sebességét követtük nyomon 340 nm-en [16].

Egységnyi enzimaktivitáson azt az abszorbancia-változást értjük, melyet 1 gramm minta idéz elő 1 perc alatt.

Statisztikai elemzések

A vizsgált paraméterek érettségi stádiumok közötti összehasonlítására egytényezős ANOVA módszert alkalmaztunk Kolmogorov-Smirnov normalitásvizsgálatot követően a GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA 92037 USA, www.graphpad.com” segítségével. Minden statisztikai elemzést 5%-os szignifikancia szinten ($P=0,05$) végeztünk.

Eredmények

Eredményeink alapján (1. táblázat) elmondható, hogy a POX-aktivitás az 1-es stádiumú, azaz a legkevésbé érett uborkában a legmagasabb (5257,71 U/g). Ez az igen nagy érték az érés előrehaladtával jelentősen csökken, míg a legnagyobb méretű termésekben a kiindulási érték 20%-ára (654,86 U/g) esik vissza.

1. táblázat: Az uborka beltartalmi paraméterműváltozásai az érés során (*= $p<0,05$ vs. megelőző stádiumú minta)

Table 1: Changes in nutritional values of cucumber during riping (*= $p<0.05$ vs. previous stage sample)

| Érettségi stádium Stage of ripeness | Méret / Size (cm) n=10 | | POX-aktivitás POX activity (U/g) n=7 | |
|--|---------------------------|------|--|--------|
| | átlag | SD | átlag | SD |
| 1 | 3,03 | 0,85 | 5257,71 | 342,43 |
| 2 | 7,21 | 0,70 | 900,86* | 95,90 |
| 3 | 8,71 | 1,03 | 620,57 | 117,47 |
| 4 | 12,30 | 1,58 | 654,86 | 195,67 |

| Érettségi stádium Stage of ripeness | GST-aktivitás GST activity (U/g) n=7 | | Antioxidáns-aktivitás Antioxidant activity (AsAe mg/100g) n=5 | |
|--|--|-------|---|------|
| | átlag | SD | átlag | SD |
| 1 | 187,86 | 7,34 | 11,81 | 0,71 |
| 2 | 199,29 | 11,43 | 11,00 | 0,94 |
| 3 | 209,57 | 7,59 | 11,06 | 1,02 |
| 4 | 216,71 | 7,27 | 11,28 | 0,47 |

| Érettségi stádium Stage of ripeness | Klorofill tartalom Chlorophyll content ($\mu\text{g}/\text{mg}$) n=5 | |
|--|--|------|
| | átlag | SD |
| 1 | 102,83 | 3,56 |
| 2 | 55,90* | 1,37 |
| 3 | 52,52 | 1,84 |
| 4 | 44,55* | 1,76 |

Changes in nutritional values during the ripening of cucumber (*Cucumis sativus*)

Csaba Orbán, Éva Csajbók, Andrea Dobronszki

Abstract

Cucumber (*Cucumis sativus*) is one of the most preferred vegetable among the Hungarian population. Although many articles can be found about the vitamin, polyphenol content and antioxidant-activity comparison of cucumber with other vegetables, there are only limited available information about the physiological and nutritional changes of cucumber during the ripening processes of the fruit. One of our aims was to study the peroxidase (POX)-, glutathione-S-transferase – enzyme (GST) activity changes, which indicate the physiological status of the plant tissues. Chlorophyll content and antioxidant-activity alteration via the ripening processes were also assessed. Our results indicate that POX-activity decreases dramatically, while the GST-activity continuously increases as the fruit grows. Chlorophyll content decreases, while the antioxidant-activity doesn't change significantly. From our results we can make the conclusion that although the physiological status of the cucumber fruit changes by the ongoing ripening processes; it doesn't come along with the change of the nutritional value alteration.

Introduction

Cucumber (*Cucumis sativus*) is one of the most often consumed vegetables in Hungary. Based on literature data, it does not possess particularly high amounts of any of the vitamins [1], total polyphenols [2], or certain phenolic acids [3], and its carotenoid content is minimal, as well [4]. There are many publications about its antioxidant activity, which unanimously prove that, compared to other fruits and vegetables, it has a low radical scavenging capability [5], [6]. Despite these facts, it is still considered an important foodstuff because of its favorable elemental composition [7], and also its antioxidant chlorophyll [8] and dietary fiber contents [9].

Although there are several studies on the nutritional values of cucumber, but they mainly compare nutritional values to those measured in other vegetables, while there are very few sources available about changes during the ripening process. Our earlier research on other plant-based foodstuffs proved that there are significant changes during ripening both in terms of physiological parameters and components important for health maintenance [10]. Of these, outstandingly important is the capability to eliminate free radicals, and changes in the amount of antioxidant type pigment molecules [11].

One of the reasons for changes is that there are significant biochemical changes in the growing plant during ripening, in order to develop the tissue structure characteristic of the mature fruit, that can affect the amount of health preserving components [12], and the other is that ripening is a stress factor for the plant, and it reacts by modifying the appropriate biochemical processes [12]. One of the most important tools of physiological answer to stress by the plant is a change in the activity of the peroxidase enzymes [13]. Peroxidases (POX) are direct terminal oxidases, containing a protoheme prosthetic group, that

oxidize different substrates with the help of atmospheric oxygen. It is interesting to note that the distribution of the individual isoenzymes is tissue specific [14]. Several studies show that there are drastic changes in enzyme activity due to biotic or abiotic stress [15].

Similarly to peroxidases, Glutathione S-transferase (GST) is also a key enzyme of plant metabolism, participating in pesticide elimination and protecting plant tissues against free radicals arising during the developmental stage, among other things [16], [17].

These facts make the two enzymes suitable to be used as indicators of the actual physiological status of the developing fruit. By examining POX and GST activities together with nutritional values, a more complete picture can be obtained about changes in cucumber during ripening.

Materials

Analytical samples were obtained from primary producers in Heves county. Analytical samples (*Cucumis sativus* cv. *Trilogy F1*) were produced in plastic tunnels, potted in soil, using a drip irrigation system. On the day of the analysis, every fruit from 5 plants was harvested, and processing was started immediately. During this, samples were enrolled into ripeness categories by size, and then preparations of extracts suitable for the parameters to be analyzed were started.

Methods

Determination of chlorophyll content

To measure chlorophyll content, extracts were prepared using pure acetone according to relevant literature [18], and the absorbance was measured at $\lambda=661.6$ and $\lambda=644.8$ nm using a photometer. Chlorophyll contents were calculated as follows:

$$\text{Chlorophyll}_a \text{ (}\mu\text{g/mg)} = 11.24 \cdot A_{661.6} - 2.04 \cdot A_{644.8}$$

$$\text{Chlorophyll}_b \text{ (}\mu\text{g/mg)} = 20.13 \cdot A_{644.8} - 4.19 \cdot A_{661.6}$$

$$\text{Chlorophyll}_{\text{total}} \text{ (}\mu\text{g/mg)} = \text{Chlorophyll}_a + \text{Chlorophyll}_b$$

Determination of antioxidant activity

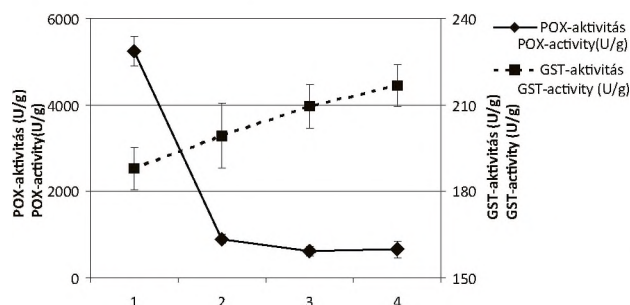
To determine antioxidant activity the FRAP method was used [19]. Extracts of the samples were prepared using an extraction mixture containing 3% orthophosphoric acid and 10 mM EDTA, and analyses were performed according to relevant literature. Data are given in ascorbic acid equivalent (AsAe).

Determination of enzyme activities

To determine peroxidase and glutathione S-transferase enzyme activities, samples were homogenized with a pH 7.5 sodium phosphate buffer containing 1 mM polyethylene glycol, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 8% polyvinylpyrrolidone and 0.01% Triton X-100. Enzyme activities were determined from the supernatant phase after gradient centrifugation at 2000 g for 20 minutes. For the determination of POX activity, formation of tetraguaiacol was measured at 470 nm in the presence of H_2O_2 substrate, while for GST activity determination, the rate of formation of the conjugate of reduced glutathione

Ezzel ellentétesen változik a GST-aktivitás (1. ábra).

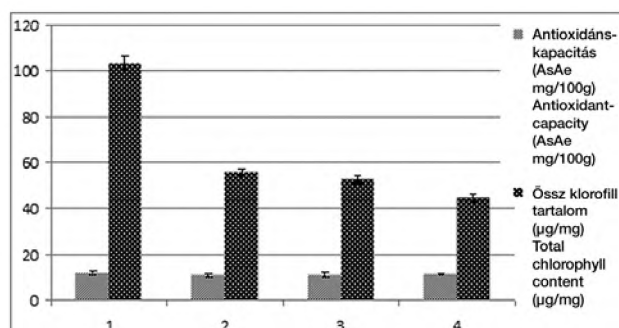
A legkisebb termésekben mértük a legalacsonyabb enzimaktivitást (187,86 U/g), amely az érés előrehaladtával fokozatosan emelkedett, bár a változások mértéke közel sem olyan drasztikus, mint a POX-aktivitásváltozások esetében tapasztaltunk.



1. ábra: A POX és GST-aktivitás változásai az érés során (átlag, SD, n=7)
Figure 1: Changes in POX and GST activities during ripening (average, SD, n=7)

A klorofilltartalom tekintetében a legmagasabb értékeket (102,83 µg/mg) az 1. érettségi stádiumú mintákban mértük, mely az érés előrehaladtával fokozatosan csökkent.

Az antioxidáns-aktivitás az összes vizsgált mintákban minimális volt (11mg/100g AsAe), és az érés előrehaladtával sem változott lényegesen (2. ábra).



2. ábra: Az összes klorofill tartalom és antioxidáns-kapacitás változása az érés során (átlag, SD, n=5)
Figure 2: Changed in total chlorophyll content and antioxidant capacity during ripening (average, SD, n=5)

Következtetések

Vizsgálatunkban az uborka (*Cucumis sativus*) érés során bekövetkező POX-, GST-aktivitásváltozását, klorofilltartalmát és antioxidáns-kapacitását vizsgáltuk. Eredményeink alapján látható hogy csakúgy, mint a korábban vizsgált növényi élelmiszerek esetében [10], az uborka esetében is jelentős növényélettani változások következnek be a progresszív érés során. Ezt igazolja mind a POX-aktivitás csökkenése, mind a GST-aktivitás növekedése. Utóbbi egyezik a nemzetközi irodalomban leírtakkal, melyek szerint a stressz hatására –jelen esetben az érés

folyamata – a GST-enzimek aktivitása jelentősen emelkedik [15]. A megfigyelt összes klorofill-tartalom-csökkenés szintén egyezik a nemzetközi irodalomban ismertettekkel, amelyek az érés előre haladtával bekövetkező klorofill tartalomvesztésről [11], valamint a növényben zajló intenzív klorofill-metabolizmusról értekeznek [20]. A megfigyelt antioxidáns-aktivitás értékei is megfelelnek más kutatások eredményeivel, melyek a többi zöldségféléhez képest az uborkában csupán minimális antioxidáns-aktivitást mutattak ki [5], [6].

Mindezek alapján elmondható, hogy az intenzív növényélettani változásokat nem követik egyöntetűen a táplálkozástudományi szempontból jelentős paraméterek változásai.

Irodalom / Literature

- [1] Rodler I. (2006): Új Tápanyagtáblázat. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest
- [2] Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006): Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry 99 (1), 191-203
- [3] Mattila, P., Hellström, J. (2007): Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. Journal of Food Composition and Analysis 20 (3-4), 152-160
- [4] Kandlakunta, B., Rajendran, A., Thingnganing, L. (2008): Carotene content of some common (cereals, pulses, vegetables, spices and condiments) and unconventional sources of plant origin. Food Chemistry 106 (1), 85-89
- [5] Číž, M., Čížová, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A., Lojek, A. (2010): Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. Food Control 21 (4), 518-523
- [6] Souri, E., Amin, G., Farsam, H., Barazandeh, T.M. (2008): Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 16 (2), 83-87
- [7] Furtana, G.B., Tipirdamaz, R. (2010): Physiological and antioxidant response of three cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salinity. Turk J Biol 34, 287-296
- [8] Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M. C., Sinnecker, P. (2005): Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. Food Research International 38 (8-9), 885-891
- [9] Almazan, A. M., Zhou, X. (1995): Total dietary fibre content of some green and root vegetables obtained at different ethanol concentrations. Food Chemistry 53 (2), 215-218
- [10] Orbán, Cs., Füstös, Zs., Gilinger, P.M. (2011): Changes in the quality of sweet pepper types during the post-harvest ripening. Journal On Processing And Energy In Agriculture 15 (2), 109-112
- [11] Hornero-Méndez, D., Mínguez-Mosquera, M.I. (2002): Chlorophyll disappearance and chlorophyllase activity during ripening of *Capsicum annum* L fruits. J Sci Food Agric 82, 1564-1570
- [12] Szalai István. (2006): A növények élete I-II. Ahogyan ma látjuk. Nemzedékek Tudása Tankönyvkiadó, Budapest
- [13] Láng Ferenc. (2007): Növényélettan 1-2. A növényi anyagcsere. ELTE Eötvös Kiadó Kft, Budapest
- [14] Passardi, F., Cosio, C. et al. (2005): Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. Plant Cell Rep 24, 255-265
- [15] Miller, R.A., Kelley, T.J., Mujer, C.V. (1990): Anodic peroxidase

isoenzymes and polyphenol oxidase activity from cucumber fruit: tissue and substrate specificity. *Phytochemistry* 29 (3), 705-709

[16] Venisse, J.-S., et al. (2003): Involvement of three pathogenicity factors of *Erwinia amylovora* in the oxidative stress associated with compatible interaction in pear. *FEBS Letters* 537 (1-3), 198-202

[17] Edwards, R., Dixon, D. P., Walbot, V. (2000): Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 5 (5), 193-198

[18] Jiang, H. W., Liu, M. J., Chen, I. C., Huang, C. H., Chao, L. Y., Hsieh, H. L. (2010): A glutathione S-transferase regulated by light and hormones participates in the modulation of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol* 154 (4), 1646-1658

[19] Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. (2001): Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. F4.3.1-F4.3.8

[20] Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239 (1), 70-76

[21] Gossauer, A., Engel, N. (1996): Chlorophyll catabolism – structures, mechanisms, conversions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 32 (3), 141-151



present in the reaction mixture and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene was followed at 340 nm [16].

One unit of enzyme activity is the change in absorbance caused by 1 gram of sample in 1 minute.

Statistical analyses

To compare the parameters analyzed among stages of ripeness, the one-way ANOVA method was used, following a Kolmogorov-Smirnov normality test, using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA 92037 USA, www.graphpad.com. All statistical analyses were performed at a significance level of 5% ($P=0.05$).

Results

Based on our results (Table 1) it can be stated that POX activity is highest in stage 1, i.e. least ripe cucumber (5257.71 U/g). This very high value decreases significantly with the progression of ripening, until it reaches 20% of the initial value in the largest fruits (654.86 U/g).

GST activities show a change in the opposite direction (Figure 1). Lowest enzyme activities were measured in the smallest fruits (187.86 U/g), and it increased gradually with the progression of ripening, although changes were not nearly as drastic as had been observed for POX activities.

In terms of chlorophyll content, highest values (102.83 $\mu\text{g}/\text{mg}$) were measured in samples of stage 1 ripeness, and it decreased gradually with the progression of ripening.

Antioxidant activities were minimal in all samples analyzed (11mg/100g AsAe), and they did not significantly change with the progression of ripening (Figure 2).

Conclusions

In this study, changes in POX and GST activities, chlorophyll content and antioxidant capacity in cucumber (*Cucumis sativus*) during ripening were investigated. Our results show that, similarly to other plant-based foodstuffs investigated earlier [10], there are significant physiological changes in cucumber as well during progressive ripening. This is supported by the decrease in POX activity, as well as the increase in GST activity. The latter agrees with data in international literature, according to which the activity of GST enzymes increases significantly due to stress – in this case, the process of ripening [15]. The decrease in chlorophyll content also agrees with international literature data, discussing a loss of chlorophyll content with the progression of ripening [11], and also intensive chlorophyll metabolism in plants [20]. Antioxidant activity values observed are also similar to the results of other studies, showing only minimal antioxidant activity in cucumber compared to other vegetables [5], [6].

Based on all this, it can be stated that intensive physiological changes are not accompanied by changes in nutritionally relevant parameters.