

## НОВІ ПІДХОДИ ДО ВИКОРИСТАННЯ РОСЛИННИХ АРОМАТОТВІРНИХ ФЕРМЕНТІВ

Г.Є. Дубова<sup>1,2\*</sup>, І.В. Левчук<sup>3</sup>, О.Ю. Галкін<sup>1</sup>, Є.В. Хмельницька<sup>2</sup>, Н.Л. Поєдинок<sup>1</sup>

<sup>1</sup>КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

<sup>2</sup>Полтавський державний аграрний університет, Полтава, Україна

<sup>3</sup>Укрметртестстандарт, Київ, Україна

\*Corresponding author: hdubova16@gmail.com

Received 18 May 2023; Accepted 14 August 2023

**Проблематика.** Як ароматотвірні ферменти для надання аромату переробленій сировині застосовують протеази, а також комплекси ферментів із різними комбінаціями ліпази, амілази та целюлази. Рослинні ферменти мають значний потенціал впливу на реакції утворення аромату.

**Мета.** Дослідження реакцій цілеспрямованої зміни аромату цибулі, листя дерев липи та вишні шляхом активації (для листя липи та вишні) або гальмування (для цибулі) дії комплексу ферментів рослинного походження.

**Методика реалізації.** Листя липи та вишні, а також плоди цибулі використано як об'єкти, що змінюють аромат під дією комплексу ферментів. Для дії власних ферментів листя дерев були створені умови ферментації за принципом переробки листя чаю. Як додаткове джерело ферментів застосовано насіння гірчиці та коріння хрону. Для впливу на реакції утворення аромату цибулі використовували імбир, екстракти чорного та зеленого чаю, кори дуба.

**Результати.** Встановлено, що ароматотвірні ферменти листя дерев активні в різні періоди формування листя: комплекс ферментів листя вишні активний після цвітіння дерев, липи – до цвітіння. Для зміни аромату цибулі ефективними є рослинні ферменти, такі як мірозінази гірчиці, поліфенолоксидази хрону. Для гальмування процесу утворення цибулевого аромату ефективними є речовини, які містяться в екстрактах чорного, зеленого чаю, імбиру.

**Висновки.** Уповільненню або гальмуванню утворення цибулевого аромату сприяють компоненти імбиру, екстрактів чорного та зеленого чаю. Аромат листя дерев вишні та липи змінюється ферментами самого листя з утворенням аромату плодів вишні та цвіту липи відповідно. Рослинні ароматотвірні ферменти листя липи більший вплив на аромат мають у період до цвітіння, ніж після цвітіння, а листя вишні – після плодоношення.

**Ключові слова:** рослинні ферменти; ароматотвірні ферменти; листя вишні; листя липи; аромат цибулі.

### Вступ

Розуміння ферментативних механізмів формування аромату харчової сировини відкриває нові перспективи в розробці інноваційних харчових біотехнологій [1]. Наприкінці минулого століття почали досліджувати комплекси ферментів (так звані “флейворази”, або ферменти аромату), які опосередковують зміну або утворення аромату. Ферменти аромату обумовлювали, наприклад, такі трансформації чи властивості рослинної сировини: відновлення втраченого аромату овочів після термічної обробки ферментними препаратами з насіння гірчиці; здатність перетворювати органічні нелеткі сірковмісні сполуки на леткі сполуки аромату часнику та цибулі; перетворення сірковмісних попередників аромату капусти та споріднених видів рослин (крес-салат, гірчиця, редька); покращення аромату консервів ферментним препаратом зі свіжої кукурудзи [2]. Варіабельність

способів ферментативного утворення аромату залежно від комплексної дії ферментів привела до ще більшої зацікавленості ферментами аромату. На ринку з'явилися відповідні харчові добавки для покращення аромату харчових продуктів (торгова марка “Flavorase” компанії DSM Food Specialties). Спочатку до ферментів аромату відносили комбінацію кількох ферментів, які розкладають білки та інші складні молекули в харчових продуктах, вивільняючи ароматичні сполуки, що надають продукту більш насиченого смаку й аромату. Цей комплекс ферментів здебільшого застосовувався у м'ясопереробній промисловості.

Згодом з метою зміни аромату почали використовувати не тільки протеази, а й ліпази, амілази, целюлази. Залежно від конкретного продукту, аромат якого потрібно змінити, почали використовувати різні комбінації цих та інших ферментів, наприклад глюкозидази. Комерційні комплекси ферментів аромату швид-

ко стали широко застосовуваними в харчовій промисловості завдяки своїй здатності покращувати смакоароматичні характеристики харчових продуктів.

У галузі харчової біотехнології ефективність дії ферментів, виділених із рослин, частіше розглядають із погляду виконання однієї функції. Наприклад, соєве борошно, отримане з необроблених бобів сої, є природним препаратом активної ліпоксигенази, яка використовується як покращувач кольору пшеничного хліба і чинить окисну дію [3]. Водночас дія ліпоксигеназ вважається такою, що часто призводить до погіршення смаку й аромату пшона, бобів сої, молочних продуктів тощо [4]. Однак саме ліпоксигенази відповідають за формування категорії аромату “свіжого, зеленого, трав’янистого” та інших подібних ароматів зелених частин рослин [5]. Отже, залежно від умов реакції ліпоксигеназа може погіршувати аромат, створювати свіжий або не впливати на аромат. За аналогією ферменти групи глікозидаз застосовуються у виробництві підсолоджувачів, наповнювачів і загусників (декстринів) із крохмалю, а також модифікації вуглеводів у хлібопеченні [6]. У вищих рослин була показана участь  $\beta$ -глікозидаз у таких процесах, як ріст рослин, дозрівання, детоксикація, захист і вторинний метаболізм [7]. Глікозидази й естерази істотно впливають на аромат і смак вина, сприяючи більш вираженим сортовим характеристикам винограду. Застосування глікозидаз у комплексі з іншими ферментами, які пов’язані з ароматотвірними реакціями при переробці рослинної сировини, досліджується в галузі виробництва напоїв [8].

Ферменти, які змінюють суто аромат, найчастіше використовуються в комплексах, до складу яких входять ліпази, ліпоксигенази, гідропероксидліази та/або пероксидази [9]. Діапазон запахів, які формуються ферментативно, залежить від виду рослинної сировини, положення подвійного зв’язку поліненасичених жирних кислот, а також від специфічності ізоформ ферментів. Аналіз природного шляху формування аромату доводить, що в ньому зазвичай задіяна група ферментів, які формують суто специфічні ноти аромату, причому регулятором для таких специфічних ароматотвірних ферментів можуть бути як природні стресові умови, так і створені штучно (високі чи низькі температури, пошкодження тканин тощо) [10]. Прикладом активації специфічних ферментів з одночасним створенням стресових умов є фер-

ментація свіжозібраного листа дерев і ягід [11]. Ферментація, за умови попереднього пошкодження частково зневодненого листа дерев, активує їхні власні рослині ароматотвірні ферменти (РАФ), які формують у листі особливий аромат [12]. Активність ферментів рослинного походження може відрізнитись у певний період розвитку рослини. Відповідно, дія РАФ у певний період розвитку листа може бути визначена за зміною аромату або його інтенсивністю після ферментації.

Особливість рослинних ароматотвірних ферментів полягає в їх активації після руйнування рослинних тканин. При подрібненні рослин сімейства хрестоцвітих, особливо капусти броколі, ріпи, кормової та брюссельської капусти, редису, гірчиці, створюються сприятливі умови для вступу в реакцію ферменту мірозинази (ЕС 3.2.1.147, раніше – ЕС 3.2.3.1, тіоглюкозидглюкогідролаза) з різноманітними неароматичними глюкозинолатами. Мірозиназа міститься у спеціалізованих клітинах (ідіобластах), а по сусідству з ними знаходяться клітини, багаті сіркою, у вакуолях яких містяться глюкозинолати й аскорбат [1, 13]. При руйнуванні такої клітини аскорбат перетворюється на розчин (1–2 мМ) і активує фермент у разі змішування із глюкозинолатом.

Особливість мірозинази порошку гірчиці полягає в тому, що вона не активна в сухому стані й активується при додаванні води [14]. Тобто порівняно з іншим рослинними джерелами, як рослини сімейства хрестоцвітих (капустяних), особливо качанна капуста, капуста броколі, цвітна капуста, ріпа, кормова та брюссельська капуста, редька, у яких мірозиназа вже є активною в своєму природному оточенні, мірозиназа порошку гірчиці стає активною при контакті із соком цибулі або іншим водним розчином. У таких умовах, на наш погляд, може мати місце конкурентне інгібування з ферментами цибулі. Саме ця обставина є важливою для нашого дослідження, вона спонукала обрати серед інших рослинних джерел мірозинази саме порошок гірчиці. Мірозиназа, виділена з насіння гірчиці, має здатність відновлювати втрачений аромат бланшованої капусти [2]. Мірозинази глікозильовані на 10–20 % й існують у вигляді декількох ізоформ із молекулярною масою мономеру 65–70 кДа, причому їхня структура стабілізована трьома дисульфідними містками й іоном  $Zn^{2+}$ . Вони також можуть існувати у формі гомоолігомерів або їхніх комплексів з іншими білками. Мірозинази з різних

джерел характеризуються максимальною активністю за рН 4–8 і температури 40–75 °С [1, 15].

Цибуля, часник, цибуля-порей, деякі сорти цибулі шалот – рослини, які не мають характерного запаху, якщо вони не пошкоджені, а їхні ферменти не декомпартменталізовані. У разі подрібнення відбуваються вивільнення аліїнази (ЕС 4.4.1.4) і реакція з аліїном, в якій аліїнази є ароматотвірними ферментами для рослин роду цибулевих (*Allium* sp.). Аліїнази беруть участь у β-лізисі небілкових похідних амінокислот – S-алк(en)іл-L-цистеїн сульфоксидів (alk(en)yl cysteine sulfoxides, ACSO). За кімнатної температури у пошкоджених клітинах цибулі за 1 хв на сіркоорганічні сполуки перетворюється від 70 до 90 % ACSO, а за годину – 100 %, причому утворений цибулевий аромат є вкрай інтенсивним. Заморожування практично не впливає на активність аліїнази, за жорсткої теплової обробки зберігається близько 5 % залишкової активності ферменту [1, 16].

Значне поширення нутрицевтиків і функціональних харчових продуктів несе із собою нові виклики, пов'язані з маскуванням або нейтралізацією небажаних присмаків або запахів, властивих інгредієнтам із функціональними властивостями. Зазвичай для конкретного смаку й аромату рослинної сировини важливі лише кілька ключових летких сполук, тому використання можливостей ароматотвірних ферментів є виправданим і обґрунтованим. Особливо такий підхід є актуальним для органічної продукції, в якій застосування ферментів мікробного походження або штучних ароматизаторів є неприйнятним [17].

Реакції за участю “ферментів аромату” мають місце при утворенні нового аромату сировини, але для створення відповідних умов іноді необхідно унеможливити перебіг аналогічних реакцій з іншими ферментами сировини. Наприклад, відомо, що фітохімічні речовини із зеленого та чорного чаю інгібують активність α-амілази слини [18]. Ферменти слини, у т.ч. α-амілази, відіграють значну роль у відчуттях запаху, смаку та консистенції у порожнині рота, тому продовжують досліджуватися природа і значення взаємодій матриці аромат–слина–вино [19]. Гальмування активності деяких ферментів дає змогу не тільки оцінити їх роль у реакціях ароматоутворення, але й запропонувати альтернативний шлях з утворенням нових ароматичних сполук.

Отже, рослинні ароматотвірні ферменти – це комплекс ферментів, який має потенціал для подальшого дослідження в галузі харчових біотехнологій, а саме:

– з точки зору активності рослинних ароматотвірних ферментів у різні періоди росту та розвитку листя дерев для їхньої подальшої ферментації для досягнення листям аромату плодів і цвіту;

– з точки зору впливу на реакції утворення та гальмування аромату цибулевих, зміни їхнього аромату та подальшої ароматизації виробів із них.

*Ми ставимо за мету* дослідити реакції цілеспрямованої зміни аромату цибулі, листя дерев липи і вишні шляхом активації (для листя) або гальмування (для цибулі) дії комплексу ферментів рослинного походження.

## Матеріали і методи

*Рослинна сировина.* Цибулю ріпчасту свіжу (*Allium cepa* L.), чай чорний і чай зелений (*Camellia sinensis* L.), порошок насіння гірчиці (*Sinapis alba* L.), коріння хрону свіже (*Armoracia rusticana* Gaertn., Mey et Scherb.), імбир свіжий (*Zingiber officinale* Roscoe) закупували у продуктивній торгівельній мережі як харчові продукти. Кору дуба (*Quercus robur* L.) було придбано в аптекарській мережі як лікарський засіб – Дуба кора, кора по 100 г у пачках (*Quercus robur* L. виробництва ПрАТ “Ліктрави”, м. Житомир). Листя дерев вишні (*Prunus cerasus* L.) та липи серцелистої (*Tilia cordata* Mill.) для ферментації збирали в парковій зоні м. Полтава. Збір листя проводили тільки зранку (о 10-й годині, оскільки активність ферментів рослин із підвищенням температури в денні часи може змінюватись у результаті теплового впливу навколишнього середовища). Листя вишні збирали в такі періоди: за 10–12 діб до плодоношення, через 10–12 діб після плодоношення, за 3–5 діб до цвітіння та через 3–5 діб після цвітіння. Листя липи збирали за 14–17 діб до цвітіння і через 14–17 діб після цвітіння.

*Технологія підготовки цибулі.* Цибулю для досліджень вибирали відповідно до ДСТУ 3234–95 “Цибуля ріпчаста свіжа. Технічні умови”, очищали від лушпиння, зрізали денце та шийку, ополіскували водою та занурювали у підготовлені розчини (гірчиці, коріння хрону, кори дуба, зеленого чаю, чорного чаю).

#### *Приготування екстрактів рослин і суспензії гірчиці:*

– чорний або зелений чай заливали водою температурою  $99 \pm 1$  °C у співвідношенні 20 г чаю на 100 мл води, перемішували, настоювали протягом 1 год, охолоджували до температури 45 °C і використовували для витримки цибулі;

– порошок гірчиці заливали водою температурою  $22 \pm 2$  °C у співвідношенні 10 г сировини на 100 мл води, ретельно перемішували, отриману суспензію не фільтрували, використовували для витримки цибулі. Окремо готували суспензію порошку гірчиці за аналогічною методикою, в якій ферменти були інактивовані нагріванням (готову суспензію кип'ятили протягом 2 хв);

– кору дуба заливали водою температурою  $99 \pm 1$  °C у співвідношенні 20 г на 100 мл води, перемішували, настоювали протягом 1 год, охолоджували до температури 45 °C і використовували для витримки цибулі;

– коріння хрону очищували, нарізали на шматочки товщиною 3 мм, заливали водою температурою  $22 \pm 2$  °C і використовували для витримки цибулі.

*Технологія обробки цибулі.* Підготовлену цибулю витримували в суспензії гірчиці – від 10 хв до 1 год, в екстракті чаю – 7 год, в екстракті кори дуба – 7 год, в екстракті коріння хрону – 7 год. Після витримки в екстракті або суспензії цибулю ополіскували проточною водою, нарізали і подрібнювали в блендері для отримання тонкоподрібненого пюре. З частини пюре віджимали цибулевий сік. До одного зі зразків екстракту зеленого чаю додавали 2 краплі ефірної олії м'яти перцевої та 5 г цедри лимону з метою визначення можливості маскування цибулевого аромату. Оцінювали аромат подрібненої цибулі, цибулевого пюре та цибулевого соку. Як контроль використовували цибулеве пюре та цибулевий сік без попередньої обробки в суспензії чи екстрактах.

*Технологія обробки цибулі порошком гірчиці.* Підготовлену цибулю нарізали і подрібнювали в блендері одночасно з порошком гірчиці. В отриманому пюре оцінювали аромат і його стійкість.

*Технологія ферментації листя вишні та липи* складалася з трьох основних операцій [11]: приготування листа до сушіння – часткове зневоднення (або так зване зав'ялювання чи холодне сушіння), скручування листа, ферментація в напівзакритій посудині. По завершенні фермен-

тації листя висушують за щадними режимами. Спосіб зав'ялювання є одним із найбільш складних, оскільки листя повинно бути не підсушеним, а тільки зів'ялим. У нашому дослідженні процес зав'ялювання проводили в такий спосіб: свіжозібране листя розкладали на тканині й накривали тканиною зверху (або скручували тканину з листям у джгут). Після закінчення процесу зав'ялювання (через 12 год), кожен листок скручували трубочкою таким чином, щоб лист був частково пошкоджений. Скручене листя щільно складали в ємність, накривали вологою напівпроникною тканиною типу марлі для підтримки вологого стану в середині ємності. Масу в ємності ферментували 10–14 год. Протягом цього періоду маса набувала темного кольору і формувався аромат, характерний для плодів вишні або цвіту липи.

Для ферментації потрібно, щоб у приміщенні було тепло – 25–28 °C. Тканина, що накриває листя, має бути вологою, її потрібно періодично змочувати, щоб уникнути підсихання верхніх шарів листя. Запах фруктової маси під час ферментації посилюватиметься, а колір темнітиме. У деяких випадках, щоб визначити завершення ферментації, можна орієнтуватися на силу запаху. Коли запах стане досить насиченим, а колір темним, ферментоване листя піддають сушінню. Якщо масу тримати на ферментації довше, запах суттєво зміниться або стане ледве вловимим.

*Технологія приготування екстрактів із ферментованого та неферментованого листя.* Ферментоване листя підсушували і готували водні та водно-спиртові екстракти – заливали листя спиртовим розчином 40 %, витримували 24 год, фільтрували. Для отримання водних екстрактів листя дерев заварювали звичайним способом (гарячою водою  $90 \pm 2$  °C, настоювали в закритій посудині 15 хв).

Неферментоване листя – свіже листя, піддане заморожуванню для пошкодження клітинних оболонок із метою наближення неферментативних умов обробки листя до процесу ферментування. Приготування екстрактів із неферментованого листя проводили таким чином: листя заморожували за температури  $-18 \pm 2$  °C, витримували в замороженому стані протягом 12–16 год, подрібнювали, заливали спиртовим розчином 40 %, витримували 2–4 год, фільтрували.

*Оцінка аромату* подрібненої цибулі, цибулевого пюре, соку, екстрактів ферментованого

та неферментованого листя, зібраного в різний період розвитку листя, проводилась дегустаційною комісією з 11 осіб, які перед органолептичною оцінкою не вживали страв із сильним ароматом, не палили [20, 21].

Для кількісного визначення зміни аромату обробленої цибулі була розроблена й використана 5-бальна система оцінювання: 5 – відсутність цибулевого аромату, 4 – у цілому аромат цибулі відсутній, але є ледь відчутний цибулевий відтінок, 3 – аромат цибулі не відсутній, але й не відразу ідентифікується, 2 – цибулевий аромат присутній, але не інтенсивний порівняно з ароматом свіжого плоду цибулі, 1 – цибулевий аромат такий, як у свіжому плоді. Для кожного члена комісії на дегустацію представлялись усі зразки подрібненої цибулі, які оцінювались по черзі. Кожен член комісії результати дегустаційної оцінки заносив у дегустаційну карту з 5-бальною шкалою та робив свій узагальнений висновок щодо змін аромату.

Свіжа цибуля як головні ароматичні чинники містить (поріг сприйняття – концентрація, від якої починається розпізнавання аромату і його ідентифікація з джерелом походження): 3,4-диметил-2,5-діоксо-2,5-дигідротіофен (7 мкг/л), пропілметантіосульфонат (1,7 мкг/л), пропілпропантіосульфонат (1,5 мкг/л), тіопропаналь S-оксид (основний лакриматор) [22]. Зазначені пороги сприйняття для подрібненої цибулі вказують на те, що для органолептичної оцінки ефектів щодо зміни цибулевого аромату не треба залучати спеціально навчених експертів. Стійкість отриманих змін аромату цибулі перевіряли протягом 96 год у цибулевому пюре, яке зберігали в щільно закритому посуді за температури  $6 \pm 2$  °C.

Для порівняння інтенсивності аромату ферментованого та неферментованого листя вишні й липи та його відповідності ароматам плодів вишні або цвіту липи відповідно була розроблена та використана описова система оцінювання. Кожному члену комісії на дегустацію представлялись усі зразки екстрактів із ферментованого і неферментованого листя, які оцінювались. Кожен член комісії заносив результати дегустаційної оцінки у дегустаційну карту з 5-бальною шкалою (5 – аромат екстракту повністю відповідає аромату цвіту липи або плодів вишні, 4 – аромат екстракту частково відповідає аромату цвіту липи або плодів вишні, 3 – аромат екстракту відповідає фруктовому солодкому аромату, має виразний відтінок аромату

цвіту липи або плодів вишні, 2 – аромат екстракту має ледь виразний відтінок цвіту липи або плодів вишні, 1 – аромат екстракту не відповідає фруктовому солодкому, аромату цвіту липи, плодів вишні) та робив свій узагальнений висновок щодо відповідності аромату плодам вишні або цвіту липи. Для порівняння були підготовлені еталонні зразки вишневого та липового аромату відповідно у вигляді свіжих вишень і цвіту липи. Середня оцінка за 5-бальною шкалою визначалася як середнє арифметичне балів по показниках дегустаторів.

*Хроматографічний аналіз летких компонентів ферментованого листя.* До наважки зразка масою 10 г додавали 100 мл гексану і струшували на шейкері протягом 30 хв. Екстракт фільтрували через паперовий фільтр і концентрували за температури 37 °C до об'єму 1 мл. Розділення летких компонентів проводили на газовому хроматографі Agilent Technologies 7890 A. Умови газохроматографічного розділення: колонка капілярна vf-5 ms (Varian), довжина 25 м, внутрішній діаметр 0,20 мм, товщина шару фази – 0,33 мкм; газ-носії – гелій, швидкість потоку 1 мл/хв. Програма термостата колонок 62 °C витримка 12,5 хв, нагрів 3°/хв до 92 °C, витримка 1 хв, нагрів 5°/хв до 165 °C, витримка 1 хв, нагрів 5°/хв до 200 °C витримка 2,5 хв. Температура інжектора 250 °C. Спосіб введення з діленням потоку, від 10:1. Детектор – полум'яно-іонізаційний. Температура: 300 °C. Повітря: 300 мл/хв. Водень: 30 мл/хв. Отримані результати порівнювали з часом утримання еталонних речовин.

*Етанольні екстракти листя* готували таким чином: наважку листя розтирали в ступці з етанолом 90 % у співвідношенні 50:50, отриману суміш фільтрували та досліджували спектрофотометрично.

*Спектрофотометричне вимірювання* оптичної густини екстрактів проводили за максимумами поглинання хлорофілу *a* – 665 нм, хлорофілу *b* – 649 нм на фотометрі КФК-3-01. Розрахунок вмісту пігментів у етанольних екстрактах листя виконували за формулами [23]

$$C_{\text{хла}} = [(13,95D_{665} - 6,88D_{649}) \cdot V] / m,$$

$$C_{\text{хлб}} = [(24,96D_{649} - 7,32D_{665}) \cdot V] / m,$$

де  $C_{\text{хла}}$ ,  $C_{\text{хлб}}$  – кількість хлорофілів *a*, *b*, мг/г си-рої речовини;  $D_{665}$ ,  $D_{649}$  – оптична густина спиртового екстракту пігментів за довжин хвиль (нм): 665, 649 відповідно;  $m$  – маса наважки, мг;  $V$  – об'єм етанолу, см<sup>3</sup>.

Спектри поглинання етанольних екстрактів досліджували на спектрофотометрі UV1280 Shimadzu:

- за довжини хвилі 200–900 нм для якісного порівняння пігментів у екстракті;
- за довжини хвилі 600–800 нм для якісного порівняння поліфенольних сполук в екстракті.

Для випробовуваних екстрактів проводили реакцію з реактивом Фоліна–Чокальтеу і визначали оптичну густину отриманих забарвлених розчинів [24,25].

**Статистична обробка.** Досліди виконували в трикратній повторності. Статистичну обробку даних проводили методами описової статистики, регресійного та дисперсійного аналізу з використанням програми Statistica 10.0. Значимість експериментальних даних оцінювали за допомогою дисперсійного аналізу. Статистично достовірними вважали результати зі значеннями  $p \leq 0,05$ .

### Результати

Дія рослинних ароматотвірних ферментів полягає в певному впливі на загальний процес формування аромату. Такий вплив може виражатись або у блокуванні/гальмуванні ферментативного утворення ключових компонентів аромату, або у формуванні нових летких компонентів. Таким чином, наші дослідження були сфокусовані на з'ясуванні обох можливих механізмів дії ароматотвірних ферментів у рослинній сировині.

#### *Гальмування утворення аромату цибулі*

З метою інактивації аліінази та інших ароматотвірних ферментів цибулі був застосований

метод настоювання цибулі в екстрактах із різним складом і концентрацією дубильних речовин – чорний, зелений чай і кора дуба (табл. 1). З метою встановлення можливості маскування аромату цибулі були використані, додатково з екстрактом зеленого чаю, ефірна олія м'яти перцевої та цедра лимону.

Реакції зміни аромату цибулі відбувались миттєво як за наявності порошку гірчиці, так і в поєднанні цибулі з водним розчином гірчиці (табл. 2). Щоб перевірити вплив саме комплексу ферментів гірчиці на ароматоутворення цибулі, були проведені досліди із суспензією, в якому ферменти були інактивовані нагріванням. Для порівняння інтенсивності впливу на реакції ферментів цибулі застосовували екстракт коріння хрону з активними пероксидазами, а також двостадійний вплив – спочатку екстрактом чорного чаю, після – суспензією порошку гірчиці.

Суспензія гірчичного порошку з інактивованим комплексом ферментів не привела до перетворень аромату цибулі. Це підтверджує ферментативну природу зміни аромату за участю гірчиці. Пероксидаза хрону частково вплинула на зміни аромату цибулі, присмак залишився цибулевий. Найкращими були результати застосування порошку гірчиці чи суспензії з нього – аромат змінювався до 96 год. Після цього цибулевий аромат частково відновлювався. Поєднання впливу суспензії гірчиці й екстракту чорного чаю створює особливі умови для формування нових ароматичних компонентів, подібних до аромату овочевого відвару.

Зразки цибулі з імбиром мали виражений аромат імбиру, але в соку відчувався присмак цибулі.

**Таблиця 1:** Вплив дубильних речовин екстрактів на аромат і смак цибулі

Спосіб інактивації ферментів	Аромат при нарізанні цибулі після настоювання		Аромат соку з цибулі	Оцінка дегустаторів
	5 год	12 год		
Настоювання з екстрактом зеленого чаю	Ледь відчутний цибулевий	Відчутний аромат цибулі	Пекучий, гострий, є цибулевий відтінок	4,26 ± 0,32
Настоювання з екстрактом зеленого чаю, ефірною олією м'яти перцевої, цедрою лимону	Аромат ефірної олії м'яти перцевої і лимону	Аромат ефірної олії м'яти перцевої, є цибулевий відтінок	Пекучий, гострий, є цибулевий відтінок	4,45 ± 0,10
Настоювання з екстрактом чорного чаю	Відсутній аромат цибулі	Відсутній цибулевий аромат	Пекучий, гострий, без цибулевого відтінку	4,92 ± 0,09
Настоювання з екстрактом кори дуба	Цибулевий аромат	Цибулевий аромат	Цибулевий аромат	1,64 ± 0,51

Таблиця 2: Зміни аромату цибулевого пюре та соку

Спосіб впливу на ферментативні реакції ароматоутворення	Аромат цибулевого пюре після настоювання		Аромат цибулевого соку	Оцінка дегустаторів
	5 год	12 год		
Екстракт коріння хрону	Ледь відчутний цибулевий аромат	Відчутний цибулевий аромат	Пекучий з ароматом хрону	3,50 ± 0,50
Суспензія гірчиного порошку	Відсутній цибулевий аромат	Відсутній цибулевий аромат	Пекучий	5,00 ± 0,09
Суспензія гірчиного порошку з інактивованим комплексом ферментів	Цибулевий аромат	Цибулевий аромат	Цибулевий аромат	1,14 ± 0,23
Порошок гірчиці	Відсутній цибулевий аромат	Відсутній цибулевий аромат	Пекучий	4,92 ± 0,03
Імбир	Аромат імбиру, цибулевий Аромат відсутній	Аромат імбиру, цибулевий аромат відсутній	Імбирний, є легкий цибулевий відтінок	4,58 ± 0,07
Екстракт чорного чаю, а після цього – суспензія гірчиці	Відсутній цибулевий аромат	Відсутній цибулевий аромат	Овочевий аромат, пекучий відтінок	4,76 ± 0,18

На наступних етапах досліджували вплив ферментів гірчиного порошку та суспензії з нього на реакції ароматоутворення цибулі без попереднього настоювання. Спочатку проводили попередню обробку цибулі, а саме очищення та промивання, водну суспензію гірчиного порошку готували шляхом додавання невеликої кількості води до сухого гірчиного порошку до отримання рідкої консистенції. Кількість внесеної води до сухого гірчиного порошку не мала суттєвого значення, оскільки вода слугувала тільки для активації ферменту мірозінази в ньому, а мінімальне зволоження є достатнім для цього. Цибулю разом із гірчициним порошком або суспензією гірчиного порошку подрібнювали в блендері (або пристрої подібного типу) до отримання однорідної маси, яку передавали на аналіз аромату. Кількість внесеного порошку гірчиці або суспензії мала прямо пропорційний вплив на тривалість руйнування цибулевого аромату: чим більше внесеного порошку або суспензії, тим триваліший був ефект руйнування аромату (залежно від сорту цибулі – до 96 год максимально). Принципової відмінності в застосуванні порошку гірчиці чи суспензії немає, технічно гірчициний порошок можна посипати на зріз цибулі, зручність застосування суспензії полягає в легкості більш точного дозування і розподілення при перемішуванні.

На підставі оцінок дегустаційної комісії щодо використання порошку гірчиці для гальмування утворення цибулевого аромату можна зробити такі висновки:

– настоювання цілої цибулини у водній суспензії гірчиці гальмує утворення цибулевого аромату, що робить цибулю деароматизованою після подрібнення;

– застосування порошку гірчиці під час подрібнення цибулі приводить до повного позбавлення від цибулевого аромату в тонкоподрібненому цибулевому пюре і соку, який відпресовували з пюре;

– використання попереднього настоювання цибулі в екстракті чорного чаю, подальше подрібнення на 2-4 частини і занурення подрібненої цибулі в суспензії гірчиці приводить до утворення овочевих ароматів при нагріванні або варінні;

– інактивація мірозінази та комплексу ферментів насіння гірчиці шляхом нагрівання унеможливорює гальмування реакції утворення цибулевого аромату.

#### **Утворення летких компонентів листя**

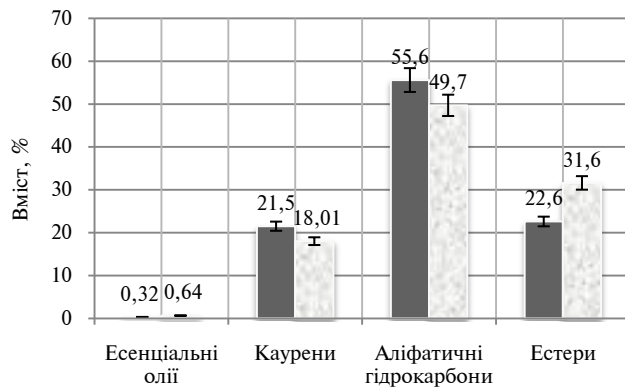
Листя вишні та липи, яке збирали в різні періоди, після ферментації досліджували хроматографічно на вміст ароматичних речовин та їхніх попередників (рис. 1, 2). У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що ферментація листя вишні до та відразу після цвітіння не продукує вишневого аромату, тому хроматографічний аналіз летких компонентів листя, зібраного в цей період, не проводився.

За результатами хроматографічного аналізу в листі вишні після плодоносіння та липи до цвітіння вміст есенціальних олій, естерів, які

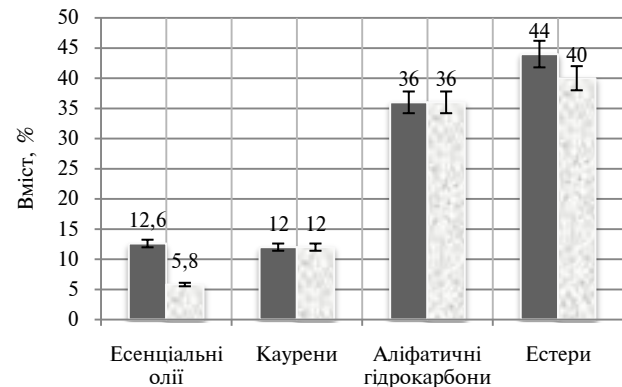
могли б обумовити неферментативну природу аромату, був зниженим. Характеристики аромату листя, зібраного в різні періоди, наведені в табл. 3.

Екстракти ферментованого листя, екстраговані водою та водно-спиртовим розчином, отримали подібні оцінки дегустаторів. Але за подальшими спостереженнями, для ферментованого листя липи екстрагування водно-спиртовим розчином дало змогу зафіксувати аромат без змін у розчині на триваліший період – до 6 місяців. З водних розчинів аромати випаровувались більш інтенсивно порівняно з водно-спиртовими розчинами. За результатами роботи дегустаційної комісії, після оцінки аромату зразків ферментованого листя, його водних і

водно-спиртових екстрактів були зроблені висновки, що для активації РАФ кращим є використання листя липи, зібраного перед цвітінням, а листя вишні – зібраного після плодоносіння. У листя, зібраного в цей період, після його ферментації, відчувається найбільш виражений аромат плодів вишні або цвіту липи. Екстракти листя без попередньої ферментації мали зелений трав'янистий аромат (GLV) без ознак приналежності до певного виду дерев. Тому до РАФ листя необхідно віднести поліфенолоксидази, які активуються при пошкодженні листя, ліпоксигенази та гідропероксидази та, ймовірно, хлорофілази, активність яких також впливає на ферментативні та метаболічні процеси листя.



**Рисунок 1:** Вміст ароматичних компонентів та їх попередників у ферментованому листі липи, зібраному в різні періоди: ■ – до цвітіння, □ – після цвітіння (значення являють собою середнє ± стандартне відхилення,  $n = 3, p \leq 0,05$ )



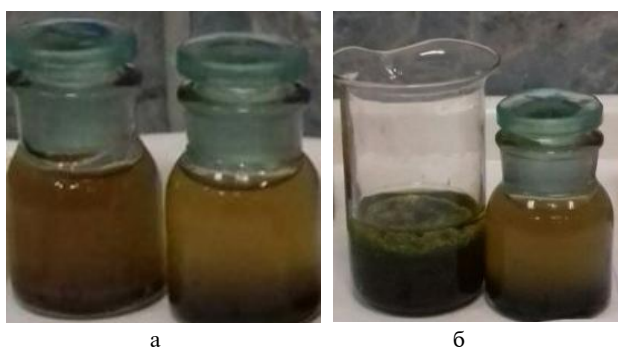
**Рисунок 2:** Вміст ароматичних компонентів та їх попередників у ферментованому листі вишні, зібраному в різні періоди: ■ – до плодоносіння, □ – після плодоносіння (значення являють собою середнє ± стандартне відхилення,  $n = 3, p \leq 0,05$ )

**Таблиця 3:** Характеристика зразків водно-спиртових екстрактів листя липи та вишні

Спиртовий екстракт	Вміст хлорофілу <i>a</i>	Вміст хлорофілу <i>b</i>	Оцінка дегустаторів	Опис аромату
<b>Ферментоване листя</b>				
Листя липи до цвітіння	5,8 ± 0,4	3,1 ± 0,2	4,84 ± 0,17	Виражений аромат цвіту липи
Листя липи після цвітіння	6,4 ± 0,5	3,8 ± 0,1	4,05 ± 0,25	Солодкий, фруктовий з відтінком липи
Листя вишні до цвітіння	7,3 ± 0,3	3,3 ± 0,2	1,07 ± 0,17	Без ознак приналежності до плодів вишні. Суто трав'янистий запах зеленого листа
Листя вишні до плодоносіння	6,9 ± 0,2	3,3 ± 0,2	4,11 ± 0,27	Солодкий, фруктовий з відтінком плодів вишні
Листя вишні після плодоносіння	6,1 ± 0,2	3,0 ± 0,1	4,85 ± 0,16	Виражений аромат плодів вишні
<b>Неферментоване листя</b>				
Листя липи до цвітіння	5,8 ± 0,4	3,1 ± 0,2	1,05 ± 0,10	Аромат зеленого листа, GLV
Листя вишні після плодоносіння	6,4 ± 0,2	3,0 ± 0,1	1,09 ± 0,13	Аромат зеленого листа, GLV

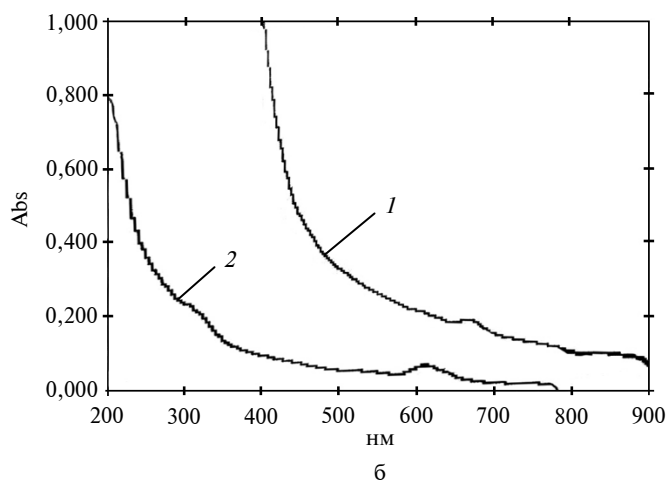
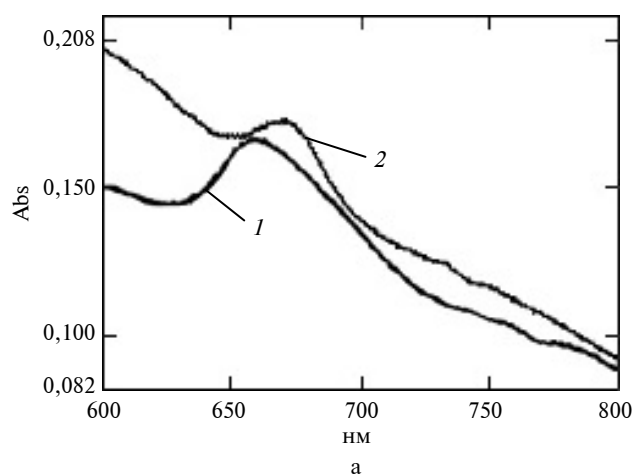


Ідентифікація поліфенолів, каротиноїдів, хлорофілів та їхніх похідних заснована переважно на характеристиках поглинання видимого світла. Реєстрування спектрів поглинання в ультрафіолетовому та видимому діапазонах дає змогу порівняти зразки екстрактів листя липи, зібраного в різні періоди (рис. 3, рис. 4а), ферментованого та неферментованого листя (рис. 4б).



**Рисунок 3:** Зразки екстрактів листя липи: (а) зліва – екстракт листя липи до цвітіння, справа – після цвітіння, (б) зліва – екстракт листя липи неферментованого, справа – ферментованого

Флавоони та флавоноли характеризуються двома вираженими максимумами за довжини хвиль 260 й 350 нм, а оксикоричні кислоти – великим максимумом за 300–320 нм. Корична кислота і лігнани мають максимум поглинання в діапазоні 280–300 нм [26]. Спектри поглинання спиртових екстрактів плодів, що містили антоціани, таніни та інші фенольні сполуки, виявили максимуми за довжиною хвиль у діапазоні від 507 до 515 нм [27]. Видимі спектри хлорофілів *a* і *b* та їхніх похідних характеризуються смугами поглинання в червоній області



**Рисунок 4:** Спектри поглинання екстрактів липи з листя: (а) зібраного в різні періоди часу (1 – після цвітіння, 2 – до цвітіння), (б) ферментованого та неферментованого (1 – ферментоване листя липи, 2 – неферментоване листя липи)

спектра в діапазоні довжин хвиль 600–700 нм і синій області 400–500 нм. Довжини хвиль максимального поглинання для хлорофілів *a* і *b*, розчинених в етиловому ефірі, становлять відповідно 660,5 і 642 нм у червоній області, 428,5 і 452,5 нм – у синій області [1].

У листі липи, зібраному до цвітіння, темнотона забарвлених пігментів дещо більше, а колір екстракту – темніший порівняно з листям, зібраним після цвітіння. Обидва екстракти на рис. 3а мають оливково-коричневий відтінок. Порівняно з екстрактом неферментованого листя, який мав яскраво-зелене забарвлення, колір екстрактів суттєво змінився, що можна пояснити утворенням похідних хлорофілу. Відомо, що похідні хлорофілу, утворені в ході обробки, за наявності або відсутності атома магнію в центрі тетрапірольного поділяють на дві групи. Похідні з магнієм мають зелений колір, а похідні, що його не містять – феофітини, мають оливково-коричневий колір [1]. Процеси феофітинізації приводять до незворотного перетворення хлорофілу та зміни зеленого забарвлення на брудний жовто-зелений, до зменшення зеленої складової кольору та підвищення червоної складової. У рослин, які мають кислий клітинний сік, феофітинізація може відбуватися при руйнуванні напівпроникного тонопласту, коли органічні кислоти надходять із клітинного соку в цитоплазму й витісняють магній із молекули хлорофілу [28]. Порівняння кривих спектрів поглинання екстрактів на рис. 4б ферментованого та неферментованого листя липи показує, що в діапазоні 200–420 нм барвні речовини ферментованого листя не реєструвались, а в діапазоні 421–900 нм їх по-

глинальна здатність була вищою, ніж у неферментованого листя. Спектральне профілювання етанольних екстрактів листків без необхідного очищення та виділення каротиноїдів, поліфенолів, хлорофілів та їхніх похідних у чистому вигляді дає досить приблизну оцінку якісного складу пігментів, утім для експрес-аналізу змін у пігментному комплексі листя є інформативним [27].

## Обговорення

### *Гальмування утворення аромату для продуктів на основі цибулі*

Аромат рослин не є компонентом, який входить до складу рослинної клітини подібно до інших органел (рибосом, пластидів тощо), а виникає у результаті складних хімічних реакцій за участю ферментів [22]. Таким чином, вплив на ферментативні реакції в рослинній сировині може привести не тільки до утворення аромату, а й до його суттєвої видозміни. Особливість впливу на ферментативні процеси в рослинній сировині має переваги порівняно з хімічним впливом на ароматичні сполуки. Відомим є спосіб запобігання утворенню аромату цибулі завдяки використанню неорганічних солей срібла. Спосіб усунення неприємного запаху цибулі полягає в м'якому селективному видаленні з екстрактів цибулі сірковмісних сполук і заснований на використанні неорганічних солей срібла, за наявності яких відбувається розрив хімічного зв'язку вуглець–сірка і відновлення нерозчинного сульфідів срібла. Цей спосіб десульфурізації не стосується хімічних компонентів, які обумовлюють корисні властивості цибулі, що дає екстрактам змогу зберегти властиві їм види біологічної активності [29]. Слід зазначити, що існує обмеження щодо використання кінцевого продукту (екстракту) – в зазначеному вище способі він рекомендований тільки для зовнішнього використання в косметичних продуктах.

Особливість механізму дії ферментів цибулевих полягає в тому, що фермент і субстрат у непошкодженій тканині рослини відокремлені клітинною стінкою і не взаємодіють до певного часу [1]. За умови пошкодження клітинної стінки фермент і субстрат приходять у взаємодію, і результатом такої реакції є утворення аромату. Під час пошкодження тканин вакулярний фермент алііназа контактує та гідролізує ACSO з утворенням відповідних кислот, які

далі перетворюються на різні сірковмісні біологічно активні сполуки переважно шляхом спонтанних реакцій [16]. У неушкоджених рослинах ACSO зберігаються в цитозолі клітин запасного мезофілу. Враховуючи це, можна використати такі рослинні речовини, які б могли інактивувати ферменти й запобігти реакції між ферментом і субстратом у цибуліні. Другим способом вплинути на ферменти цибулі є використання таких ферментів, які швидше за цибулеві атакують субстрат ACSO (конкурентне інгібування). До інактивації ферментів призводить зв'язування білків дубильними речовинами. Доведено, що танінові кислоти мають інгібувальний ефект до  $\alpha$ -амілази [30].

Отримані результати щодо зміни аромату та смаку цибулі під впливом дубильних речовин екстрактів (див. табл. 1) свідчать про те, що найбільш ефективно гальмують дію ароматотвірних ферментів цибулі компоненти чорного чаю: після 6–12 год настоювання при нарізанні цибулі характерний цибулевий аромат не утворювався. Дубильні речовини екстракту кори дуба не вплинули на реакції ароматоутворення і, відповідно, не інактивували ферменти, які беруть участь у цих реакціях – при подрібненні цибулі миттєво утворювався цибулевий аромат. Задовільним результатом можна вважати використання розчину зеленого чаю з ефірною олією м'яти перцевої та цедрою лимона, але отриманий результат маскування цибулевого аромату нестійкий, і при подальшій обробці цибулі аромат має тенденцію до відновлення.

Отримані результати в експериментах з екстрактами чаю дають змогу зробити такі висновки: не всі ферменти, відповідальні за утворення аромату, інактивуються танінами зеленого чаю, ймовірно, що саме аліінази призупиняють дію (зменшують активність унаслідок зв'язування білків із танінами чаю), але інші ферменти цибулі не інактивуються, й цибулевий аромат частково присутній. Це спостереження підтверджує, що застосування терміна “ферменти аромату” стосується комплексу ферментів, задіяних у реакціях ароматоутворення.

У представників роду *Allium* деякі ароматотвірні попередники можуть існувати у вигляді  $\gamma$ -глутаміл ACSO-пептидів, причому ці пептидзв'язані S-алк(ен)ан-L-цистеїнсульфоксиди не є субстратами для аліінази. Транспептидаза (EC 2.3.2.2) каталізує перенесення  $\gamma$ -глутамільної групи від ACSO на іншу амінокислоту з виділенням вільного ACSO, з яким потім може вступити у взаємодію з алііназою, що призведе

до посилення або утворення запаху. У рослинах роду *Allium*, сімейства хрестоцвітих і в бобових культурах, а також у грибах і деяких бактеріях містяться цистинліази (ЕС 4.4.1.8), відомі також під назвою  $\beta$ -цистатіонази. Цистинліази являють собою піридоксалеві ферменти, що каталізують  $\beta$ -елімінування цистину й утворення тіоцистеїну (*CYS-SSH*), а це сприяє посиленню сірчистого запаху [2, 31].

Таким чином, наявність, окрім аліінази, додаткових ферментів цистинліази та транс-пептидази, а можливо, ще й інших ферментів, пояснює неповне гальмування їх дії танінами зеленого чаю. Це привело до пошуку нових джерел речовин, які могли б вплинути на ферментативні реакції ароматоутворення не тільки при настоюванні, а й при подрібненні цибулі. Подібно до плодів цибулі активуються ароматотвірні ферменти гірчиці – при руйнуванні тканин у процесі обробки та при поєднанні з водою. Запах, смак і пекучість при цьому обумовлюються насамперед ізотіоціанатами, що утворюються в результаті дії глюкозинолаз на тіоглікозидні попередники [32].

Мірозиназа гірчиці вивільняє глюкозу та розщеплює сполуки, що містять ізотіоціанати. Ці високоактивні речовини *in vitro* є потужними індукторами ферментів другої фази [1]. Деякі ізоформи мірозинази активуються аскорбіновою кислотою – збільшення швидкості реакції відбувається у кілька сотень разів [1, 22]. У ріпчастій цибулі аскорбінова кислота міститься залежно від сорту та умов вирощування в кількості від 10 до 18 мг/100 г, чого виявилось достатнім для прискорення реакції з ізоформами мірозинази гірчиці (див. табл. 2).

У наших експериментах зразки цибулевих продуктів з імбиром мали виражений аромат імбиру, разом із тим у соку відчувався присмак цибулі. Екстракти імбиру мають здатність пригнічувати активність  $\alpha$ -амілази та  $\alpha$ -глюкозидази *in vitro* [33]. Слід зазначити, що імбир має власні ароматичні компоненти, які можуть маскувати цибулевий аромат на перших етапах отримання пюре цибулі. Зміни аромату цибулі можуть бути здійсненими шляхом розриву хімічного зв'язку вуглець–сірка [29]. Пояснення дії імбиру може полягати також у властивості впливати на сірковмісні зв'язки компонентів аромату.

При подрібненні цибулі клітини руйнуються, і вивільняється пропантіальний S-оксид (фактор сльозоточивості; lachrymatory factor – LF), який змушує очі сльозитися. Довгий час

вважалося, що LF утворюється неферментативним шляхом із 1-пропенсульфенової кислоти, передбачуваного продукту реакції аліінази, що діє на транс-(+)-S-(1-пропеніл)-L-цистеїнсульфоксид. Проте Т. Камої під час дослідження зміни кольору рослин цибулі встановив, що якийсь невідомий фермент, відповідальний за утворення LF, має міститися в сирому препараті аліінази цибулі. Було повідомлено про відкриття нового ферменту під назвою синтаза сльозоточивого фактора (lachrymatory factor synthase – LFS) і його застосування, наприклад, для несльозоточивої цибулі [34]. Слід зазначити, що при настоюванні цибулі в екстрактах чаю або в суспензії гірчиці порошку дія сльозоточивого фактора істотно зменшується.

Гальмування ферментативних взаємодій таніновими компонентами чорного чаю, порошком гірчиці, імбиру приводить до припинення реакції утворення цибулевого аромату, але різною мірою. Це пояснюється тим, що в реакціях ароматоутворення задіяний комплекс РАФ, а роль деяких ферментів у цих реакціях остаточно не визначена. Експерименти з радіоіндикаторами показали, що сульфоксиди S-алк(ен)ілцистеїну біосинтезуються з глутатіону, і решта ферментів цього шляху ще чекають на відкриття [15]. Коли рослинні тканини руйнуються дробленням або різанням, алііназа контактує з S-алк(ен)ілцистеїнсульфоксидами та розриває їхній C–S-зв'язок, у результаті чого утворюються сульфенова, піровиноградна кислоти й аміак. Пояснення впливу гірчиці порошку може полягати в тому, що мірозиназа розщеплює цей зв'язок із сірчистими сполуками, формуючи аромат, відмінний від цибулевого. Крім того, на перебіг ферментативних реакцій, можливо, додатковий вплив чинить алілізотіоціанат гірчиці.

У рослинних тканинах роду цибулевих (*Allium*), або сімейства хрестоцвітих (*Cruciferae*), або капустяних (*Brassicaceae*) сполуки-посередники смаку й аромату перетворюються на смакоароматичні сполуки ферментативним шляхом при пошкодженні клітин під час пережовування або при інших механічних пошкодженнях. Саме тому внесення сполук-інактиваторів або інших ферментів, які швидше атакують сполуки-посередники аромату цибулі, є ефективнішим на етапі подрібнення рослинної сировини, ніж під час екстрагування. Після ферментативних перетворень цибулева маса має пекучі властивості, а подразнювальна дія цибулі та сльозогінна дія лакріматора частково зберіга-

ються. Збереження цих факторів дає підстави вважати, що ферментативні зміни відбулися тільки з ароматичними сполуками, що дає переваги порівняно з іншими методами впливу на цибулевий аромат, наприклад тепловими (смаження, запікання). ACSO-пептиди є попередниками сірковмісних сполук, відповідальних за цибулеві запах і смак, та, крім цього, мають смакові властивості кокумі [1]. Ферментативний вплив на аромат дає можливість зберегти інші функції складових компонентів цибулі.

Вплив фермента мірозінази гірчичного порошку можна пояснити також тим, що в цьому ферменті є гідрофобний зв'язуючий "карман", що зв'язує R-групи глюкозинолату, які являють собою переважно алк(ен)ільні ланцюги, у т.ч. розгалужені або такі, що містять як заступники S, S=0, кето- або гідроксильні групи. Крім того, мірозіназа належить до сімейства 1 глікозилгідролаз і має дві унікальні властивості: вона гідролізує  $\beta$ -D-тіоглюкозиди (але не O-глікозиди) і має тільки один із зазвичай двох каталітичних залишків *Asp/Glu*. Деякі амінокислотні залишки (*Glu-464*, *Gln-39*, *His-141*, *Asn-186*) беруть участь в утворенні водневих зв'язків із глюкозою. Залишки *Gln-409* і *Arg-194*, *259* координуються із сульфатними групами субстрату, а *Glu-409* являє собою карбоксилатний нуклеофіл ферменту, що заміщає S-аглікон і бере участь у формуванні фермент-глюкозного ковалентного інтермедіату [1, 15]. Наведені особливості мірозінази дають можливість пояснити результат усунення цибулевого запаху при використанні порошку гірчиці або суспензії з нього.

#### **Особливості утворення летких ароматичних компонентів листя**

Ферменти в рослинній сировині можуть проявляти свою активність у різному ступені залежно від фази росту, умов зберігання чи переробки. Так, наприклад, доведено, що активність ліпоксигенази (ЛОГ, лінолеат:кисень:оксидоредуктази EC 1.13.11.12) багатьох рослин суттєво збільшується в березні, коли відбувається фаза пробудження [35, 36]. Встановлено, що вихід зі стану спокою відбувається на тлі зростання активності 9-ЛОГ [35]. Леткі речовини зеленого листя (green leaf volatiles – GLV) в основному є  $C_6$ -, а в поодиноких випадках також  $C_9$ -альдегідами, -спиртами й -ефірами, які утворюються рослинами у відповідь на біотичні чи абіотичні стреси. Ці сполуки є похідними жирних кислот

і названі за характерним запахом, що нагадує свіжоскошену траву. Рівень синтезу ферментних білків рослин визначається генетично. Неферментоване листя має характерний трав'янистий аромат завдяки участі комплексу ферментів (ліпоксигенази, аленоксидсинтази, гідропероксидліази, дивініл ефірсинтази, епоксіалкогольсинтази, пероксигенази, алкілгідропероксидредуктази) в реакціях із попередниками аромату [37, 22].

Активізація ферментного комплексу РАФ листя приводить до утворення аромату, відмінного від GLV. Рослини містять велику кількість фенольних сполук, перетворення яких тісно пов'язане з активністю окисних ферментів, особливо поліфенолоксидаз. Основні результати з дослідження технології приготування ферментованого листя дерев липи і вишні описані в [11]. Наразі відсутні наукові дані щодо періоду розвитку листя дерев, при якому аромат ферментованого листя відповідав би аромату плодів цих дерев або їх цвіту. На підставі отриманих результатів не підтвердилося припущення щодо одночасного формування ароматичних компонентів у листі та цвіті. Ймовірно, в цей проміжок часу активність РАФ, які б синтезували вишневий аромат у листі вишні, мінімальна. Активність поліфенолоксидаз, як і ліпоксигеназ, у різні періоди розвитку листя дерев має відмінності [38].

Каурени належать до класу гіберелінів і можуть бути виявлені в молодому листі, що росте [39]. Показник вмісту кауренів у листі вишні до та після плодоношення не змінюється, що свідчить про індіферентність цієї характеристики до досліджених фаз росту листя. Для листя липи вміст кауренів до цвітіння був більшим, ніж після цвітіння, в середньому в 1,2 разу. Тобто в період збору листя липи не припиняє накопичувати фітохімічні речовини (див. рис. 1, 2).

Багато естерів карбонових кислот мають характерні фруктові або квіткові запахи, чим пояснюється фруктовий аромат в екстрактах. Аліфатичні гідрокарбонати в листі виступають попередниками ароматичних речовин. Одним із представників цієї групи є кутин, який просочує зовнішній шар епідермісу листя та є різновидом восків, але утворений жирними кислотами з нижчою молекулярною масою. За ферментативні перетворення цих попередників аромату можуть відповідати ліпоксигенази та гідропероксидліази, які містяться в листі й активуються під час зав'язування та подальшої фер-

ментації. В результаті ферментативних перетворень цієї групи сполук формуються свіжі, зелені відтінки аромату [40].

Нами визначався вміст хлорофілу в екстрактах листя відповідно до кожного періоду його збору (див. табл. 3). Однією з найбільш очевидних змін у в'янутих рослинних тканинах, що містять хлорофіл, є втрата характерного зеленого кольору. Найчастіше втрата зеленого забарвлення шкіркою, а іноді й м'якоттю, пов'язана також із дозріванням більшості плодів, а "пожовтіння" – це характеристика тканин стебла і листя овочів, що в'януть. Це не має прямого впливу на формування аромату, подібного до аромату плодів або цвіту дерев, але в міру старіння листя, зі зменшенням вмісту хлорофілу збільшується вміст каротиноїдів. При розщепленні каротиноїдів діоксигеназами утворюються леткі апокаротиноїди, які формують аромат чайного листя під час ферментативної обробки [41]. Оскільки ферментація листя липи та вишні проводилась аналогічно чайному листю, ймовірно, появу фруктового аромату можна пояснити процесами, описаними вище, та наявністю естерів.

Нами було встановлено, що вміст хлорофілу в листі вишні після цвітіння, але до плодоносіння, та в листі, зібраному після означеного терміну, є різним (див. табл. 3). У першому періоді збору листя (до плодоносіння) вміст хлорофілу більший, у другому періоді (після плодоносіння) його вміст зменшився. Листя липи було зібране в період початку формування, тому вміст хлорофілу в цей період збору менший, ніж після цвітіння. Максимальна наближеність аромату листя до цвіту липи або плодів вишні характерна для періоду збору, коли вміст хлорофілу в листі менший за максимальне значення. Хлорофіл має важливе значення в процесах фотосинтезу і пов'язаний із білковими молекулами у високоорганізованих комплексах. Температурний і водний режими розвитку листя впливають на вміст хлорофілу, кількість ферменту Рубіско, білків світлозбирального комплексу, цитохрому [42]. Підготовчі операції та ферментація листя створюють стресові умови, які призводять до штучного старіння листя і денатурації білків у ньому. В дослідженнях листя маніюки при зменшенні рівня хлорофілу в міру дозрівання рослин збільшувався вміст антиоксидантних речовин, таких як вітамін С, поліфеноли та  $\beta$ -каротин [43]. Збіль-

шення поліфенолів у листі своєю чергою приводить до активації відповідних ферментів – поліфенолоксидаз.

Порівнюючи процеси ферментації листя дерев і листя чаю, слід звернути увагу на те, що основним біокатализатором під час ферментації листя чаю є поліфенолоксидази, які відповідють за реакції потемніння рослинної сировини [44]. Ушкодження рослинних тканин при нарізанні, приготуванні, а в нашому дослідженні – при ферментації, перемикають метаболізм, який приводить до збільшення респіраторної активності, продукування етилену, в'янення та дозрівання [45]. У зелених частинах рослин хлорофіл завжди супроводжують каротиноїди –  $\beta$ -каротин, лютеїн, віолаксантин, неоксантин тощо [26]. Ці та інші барвні пігменти обумовлюють зміну кольору екстрактів під час ферментації листя.

Слід окремо зазначити, що в листі вишні, зібраному до цвітіння, зміна кольору, тобто потемніння, відбувалася з невеликою швидкістю або не відбувалася взагалі. У той же час зміни аромату листя вишні, зібраного в цей період, також не відбувалось. Таким чином, зміна концентрації барвних речовин в екстрактах листя дає наочне уявлення про процеси ферментолізу в листі, зібраному в різні періоди розвитку, і може слугувати певним маркером ферментативних реакцій.

Різниця спектрів поглинання екстрактів на рис. 4а доводить, що між поглинальною здатністю зразків існують якісні відмінності. В молодому листі липи, зібраному до цвітіння, барвні речовини починають інтенсивно утворюватись при механічних пошкодженнях тканин, що супроводжується окисною конденсацією. Якісна різниця між спектрами поглинання ферментованого листя липи, зібраного в різні періоди, свідчить про те, що у ферментативних процесах ароматування задіяні ферменти, які чинять вплив на зміну забарвлення. Крива спектрів поглинання етанольних екстрактів листя, зібраного до цвітіння, демонструє вищий вміст відповідних речовин, ніж в екстрактах після цвітіння. Це дає змогу підтвердити природу ферментативних перетворень у листі, зібраному в різний період розвитку.

Синтез фенолів рослин пов'язаний із підвищеною активністю фенілаланін аміак-ліази (ФАЛ, ЕС 4.3.1.5), халконсінтази, також інших ферментів вторинного синтезу [27, 45]. На ак-

тивність ФАЛ впливають такі фактори, як: світло, механічні пошкодження, захворювання тощо. У відповідь на стрес метаболічний шлях ФАЛ бере участь у виробництві різних природних продуктів (фітоалексину, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів тощо) [46]. Пошкодження листя перед ферментацією є тим фактором, який запускає цілу низку ферментативних перетворень, які обумовлюють зміну кольору й аромату листя.

Продукти ферментативного окиснення фенолів – хінони – окиснюють інші речовини листя й утворюють ароматичні речовини, які беруть участь у формуванні аромату ферментованого листя. Хінони схильні також до реакцій конденсації, що приводять до утворення високомолекулярних коричневих пігментів, які мають високу реакційну здатність і легко з'єднуються з SH- й аміногрупами білків [47]. Це пояснює той факт, що чим інтенсивніше відбувається зміна кольору пошкодженого листя під час ферментації, тим більш вираженим стає його аромат.

Хімічний склад листя плодів дерев і ягід передбачає наявність у них попередників аромату, ідентичних тим, що містяться у плодах цих дерев або ягід. Наприклад, є підстави припускати, що листя та плоди яблуні можуть мати подібні ароматичні компоненти [48]. Те саме стосується інших дерев і ягід (абрикос, вишні, малини, смородини). У роботі [12], де представлено технологію напоїв із ферментованого листя плодів дерев і ягід (яблуні, вишні, шовковиці, малини тощо), було поставлено за мету розробити альтернативні варіанти напоїв, подібних до чаю. Однак не були описані результати відповідності аромату ферментованого листя до аромату плодів або ягід. У нашому дослідженні результатом є визначення кращого періоду збору листя для отримання аромату плодів вишні й цвіту липи ферментативним шляхом. Це дає змогу збільшити виробництво натуральних ароматизаторів для органічної продукції.

Функція листя як джерела ароматичних компонентів є досить новою. Листя є метаболічно активним органом із дуже невеликими запасами енергії, що призводить до його псування при відділенні від рослини [49]. Ферментація свіжозірваного листя запобігає його псуванню та може забезпечувати утворення різних ароматичних сполук. Передумовою для обґрунтування таких реакцій є технологія обробки чайного листя, який може набувати різних

ароматів залежно від умов проведення ферментативних реакцій. В основі одержання чорного, білого, червоного, жовтого чаю лежать особливі умови окисних процесів і ферментативних реакцій у чайному листі [50]. Аналогічно для листя липи та вишні вибір періоду його збору є ключовим із точки зору досягнення ідентичності аромату липи та вишні, оскільки склад ферментів листя залежить від етапу його розвитку.

Хімічні зміни, що відбуваються в рослинах після збирання, регулюються найрізноманітнішими біохімічними механізмами. Сама по собі наявність того чи іншого ферменту ще не задає його функціональної ролі деякому фізіологічному явищу. Наприклад, у бульбах картоплі є інвертаза, але її активність іноді інгібується білковим інгібітором інвертази [1]. Попередники смаку й аромату зовсім не обов'язково перетворюються на смако-ароматичні речовини *in situ*, навіть незважаючи на наявність специфічних ферментів аромату, оскільки ці реагенти можуть бути фізично відокремлені один від одного клітинними мікроструктурами. Важливість руйнування цілісності клітини для біохімічних змін рослин неможливо переоцінити – таке пошкодження особливо впливає на формування смаку й аромату, побічних присмаків і запахів.

Руйнування листя є стресовим фактором, який впливає на всі структури рослинної тканини – припиняється надходження води й нутрієнтів, уповільнюється дихання. Своєю чергою гіпоксія рослин впливає на зміни активності рослинних ферментів [51]. У таких умовах, на наш погляд, слід враховувати зміни активності рубіско (*D*-рибулозо-1,5-дифосфат-карбоксілази/оксигенази, EC 4.1.1.39), що відіграє стабілізуючу роль і впливає на каталітичну активність і швидкість дії ферментів у стресових умовах [52]. Білкові компоненти листя, як рубіско, разом із дубильними речовинами утворюють складні комплексні з'єднання [53], а в міру старіння листя (вишні) або на початку його розвитку (листя липи) ці комплекси менш стабільні, що є позитивним для вивільнення дубильних речовин. Тому період збору листя є важливим фактором для отримання аромату листя, подібного до аромату плодів вишні або цвіту липи.

Фермент Рубіско становить близько половини усього білка в листі рослин. Характер відповіді рубіско RA (Rubisco activase, рубіско активізаза) і RBP (Rubisco binding protein, рубіскозв'язувальний білок) на дію температури залежить від інтенсивності та тривалості впливу,

типу клітин і тканин, а також стадії розвитку рослини [54]. Саме тому вибір періоду збору листя є важливим для отримання специфічних ароматів, які ідентифікуються з джерелом походження листя, а в подальших дослідженнях РАФ увага повинна бути зосереджена саме на аспекті їх взаємозв'язку з Рубіско. Фермент Рубіско також має високу харчову цінність і добру засвоюваність *in vitro* [55].

Ферментативне перетворення попередників аромату листя вишні та липи обумовлене такими чинниками: наявність сполук-попередників, температура, тривалість ферментації, активність води, комплекс рослинних ферментів, і може бути зупинене при достатньому накопиченні необхідних ароматів. Наприклад, різні режими ферментації або її відсутність дають нам білий, зелений, жовтий, червоний, чорний різновид чаю, а за ступенем ферментації чай ділиться на ферментований, напівферментований, легко ферментований і неферментований. Відсутність процедури спеціальної ферментації листя липи та вишні призвела до утворення виключно аромату GLV-профілю. Це підтвердило включення до процесу ароматотворення поліфенолоксидаз як частини комплексу РАФ. Саме попереднє руйнування цілісності листя дає ферментам доступ до субстратів під час ферментації. З метою досягнення максимального наближення до аромату плодів вишні чи цвіту липи необхідно враховувати період збору листя, коли не тільки комплекс РАФ є найбільш активним, але й сформовані необхідні попередники аромату – субстрати. Слід окремо зазначити, що в спиртових екстрактах листя липи містився рослинний слиз, такий як і в цвіті липи. Його роль в ароматотворенні не визначалась, але була відзначена подібність функціональних ознак екстракту листя до цвіту липи.

Цінність свіжовичавленого цибулевого соку або пюре для здоров'я людини доведена багатьма вченими. Найбільшим досягненням нашого дослідження є розроблення підходу до зміни аромату цибулі як головного чинника, який перешкоджає щоденному вживанню її у свіжому вигляді. У результаті була доведена можливість виготовлення і зберігання свіжовичавленого цибулевого соку або пюре без специфічного аромату шляхом використання інгібіторів ферментативного утворення рослинного походження. Оброблене цибулеве пюре розглядалося як основа для розробки нутрицевтиків. Зразки виробів (соку та пюре) з цибулі, в яких

застосовувався імбир, були визнані найкращими за органолептичними показниками. При розробці рецептур функціональних або дієтичних харчових продуктів із цибулею використання імбиру є обґрунтованим не тільки з точки зору покращення аромату. Імбир є джерелом фітохімічних речовин із сильною антиоксидантною дією та властивостями інгібіторів щодо ключових ферментів, пов'язаних з діабетом 2-го типу, а саме  $\alpha$ -амілази й  $\alpha$ -глюкозидази [33]. Використання імбиру з метою гальмування реакцій утворення аромату цибулі є доцільним у технологіях виготовлення нутрицевтиків і функціональних продуктів за участю цибулі.

### Висновки

Вибір періоду збору листя вишні та липи дає змогу досягти після ферментації максимального наближення до аромату плодів вишні або цвіту липи.

Рослинні ароматотвірні ферменти листя липи мають більший вплив на аромат у період до цвітіння, ніж після нього, а листя вишні – після плодоношення.

Екстрактивні речовини рослин імбиру, хрону, гірчиці, зеленого та чорного чаю є інгібіторами рослинних ароматотвірних ферментів цибулі.

Гальмування ферментативного утворення аромату цибулі відбувається за участю ферментів порошку гірчиці (переважно мірозидази), хрону (переважно поліфенолоксидази), танінами чорного та зеленого чаю, складовими компонентами імбиру, але різною мірою, оскільки в процесі ароматотворення задіяний не один фермент, а комплекс рослинних ароматотвірних ферментів.

Отримані результати дають змогу розробити асортимент харчових продуктів зі свіжої деароматизованої цибулі для систематичного вживання з лікувально-профілактичною метою, а також використати ферментоване листя вишні та липи для ароматичних екстрактів.

### Фінансування

Робота підтримана грантом Міністерства освіти і науки України “Розроблення методів підвищення біологічної активності харчових продуктів для спеціальних медичних цілей” у рамках держзамовлення на науково-технічні (експериментальні) розробки та науково-технічну продукцію в 2022–2023 рр. (№ ДР 0122U200933).

### Розкриття інтересів

Олександр Галкін і Наталія Поєдинок є членами редакційної колегії журналу “Innovative Bio-

systems and Bioengineering”, не брали участі у редакційному оцінюванні та ухваленні рішення про публікацію статті. Інші автори не мають конфліктів інтересів, які слід розкрити.

### References

- [1] Damodaran S, Parkin KL. Fennema's food chemistry. Boca Raton: CRC Press; 2008. 1214 p.
- [2] Potter NN, Hotchkiss JH. Food science. Springer Science & Business Media; 2012. 619 p.
- [3] Kaprelyants LV. Enzymes in food technologies. Odesa: Druk. 2009. 468 p.
- [4] Pratiwi RD, Rosyidi VA, Zanjabilla S, Dewi KS, Novandra R, Desvina D, Herawati H. Sensory evaluation of flavoring agent addition in soy-based beverage. Pharm Rep. 2022;2(1):46-6. DOI: 10.51511/pr.46
- [5] Contreras C, Tjellström H, Beaudry RM. Relationships between free and esterified fatty acids and LOX-derived volatiles during ripening in apple. Postharvest Biol Technol. 2016;112:105-13. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2015.10.009
- [6] Wang H, Wang J, Liu Y, Ji Y, Guo Y, Zhao J. Interaction mechanism of carnosic acid against glycosidase ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase). Int J Biol Macromol. 2019;138:846-53. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.179
- [7] Singh G, Verma AK, Kumar V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases. 3 Biotech. 2016;6(3). DOI: 10.1007/s13205-015-0328-z
- [8] Madende M, Madende Pr. Application of enzymes in producing bioactive oligosaccharides and peptides for the beverage industry. In: Value-addition in beverages through enzyme technology. Academic Press; 2023. p. 235-50. DOI: 10.1016/B978-0-323-85683-6.00014-4
- [9] Ferreira V, Lopez R. The actual and potential aroma of winemaking grapes. Biomolecules. 2019;9(12):818. DOI: 10.3390/biom9120818
- [10] Ribeaucourt D, Bissaro B, Lambert F, Lafond M, Berrin JG. Biocatalytic oxidation of fatty alcohols into aldehydes for the flavors and fragrances industry. Biotechnology Advances. 2022;56:107787. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107787
- [11] Dubova H, Levchuk I, O Holubets, Miroshnikov V. Fermentation technology of leaves for flavored drinks. Proc Univ Ruse (Razgrad). 2022;61(10.2):16-21.
- [12] Hrynenko I, Hrushetskyi, R, Khomichak L. Fermented leaves of fruit and berry crops as a raw material for drinks. Food Res. 2019;7(13):59-68.
- [13] Wiczorek MN, Drabińska N. Flavour generation during lactic acid fermentation of brassica vegetables – literature review. Appl Sci. 2022;12(11):5598. DOI: 10.3390/app12115598
- [14] Bhattacharya A, Li Y, Wade KL, Paonessa JD, Fahey JW, Zhang Y. Allyl isothiocyanate-rich mustard seed powder inhibits bladder cancer growth and muscle invasion. Carcinogenesis. 2010;31(12):2105-10. DOI: 10.1093/carcin/bgq202
- [15] Bhat R, Vyas D. Myrosinase: insights on structural, catalytic, regulatory, and environmental interactions. Crit Rev Biotechnol. 2019;39(4):508-23. DOI: 10.1080/07388551.2019.1576024
- [16] Yoshimoto N, Saito K. S-Alk(en)ylcysteine sulfoxides in the genus Allium: proposed biosynthesis, chemical conversion, and bioactivities. J Exp Bot. 2019;70(16):4123-37. DOI: 10.1093/jxb/erz243
- [17] Ivanov V, Shevchenko O, Marynin A, Stabnikov V, Gubenia O, Stabnikova O, Shevchenko A, Gavva O, Saliuk A. Trends and expected benefits of the breaking edge food technologies in 2021–2030. Ukr Food J. 2021;10(1):7-36. DOI: 10.24263/2304-974X-2021-10-1-3
- [18] de Wijk RA, Prinz JF, Engelen L, Weenen H. The role of  $\alpha$ -amylase in the perception of oral texture and flavour in custards. Physiol Behav. 2004;83(1):81-91. DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.07.014
- [19] Khramova DS, Popov SV. A secret of salivary secretions: Multimodal effect of saliva in sensory perception of food. Eur J Oral Sci. 2022;130(2):e12846. DOI: 10.1111/eos.12846
- [20] Yang J, Lee J. Application of sensory descriptive analysis and consumer studies to investigate traditional and authentic foods: A review. Foods. 2019;8(2):54. DOI: 10.3390/foods8020054
- [21] State Committee for Technical Regulation and Consumer Policy. DSTU ISO 6658:2005. Sensory research. Methodology. General instructions. Kyiv; 2006. 17 p.
- [22] Hui YH, editor. Handbook of fruit and vegetable flavors. New York: Wiley; 2010. 1095 p.
- [23] Korotkova I, Chaika T, Romashko T, Rybalchenko A. photosynthetic pigments content in emmer wheat plants as criteria of productivity in traditional and organic farming technology. Innov Biosyst Bioeng. 2022;6(1):31-9. DOI: 10.20535/ibb.2022.6.1.255277
- [24] Khatchapuridze Z, Gugulashvili G, Ghvachliani V, Ploeger A, Gulua L, Turmanidze T. In-vitro functional efficacy of extracts from Caucasian Rhododendron (Rhododendron caucasicum) and Rkatsiteli wines as pancreatic lipase inhibitors. Ukr Food J. 2021;10(1):37-50. DOI: 10.24263/2304-974X-2021-10-1-4



- [25] Al-Shwaiyat M, Denisenko T, Miekh Y, Vishnikin A. Spectrophotometric determination of polyphenols in green teas with 18-molybdodiphosphate. *Chem Chem Technol.* 2018;12(2):135-42. DOI: 10.23939/chcht12.02.135
- [26] Skrinchuk OY, Vasenda MM, Marchyshyn SM. Technological aspects of obtaining dense extracts from leaves of *Crambe koktebelica* and *Crambe cordifolia*. In proceedings of Conference Modern achievements in pharmaceutical science for the development and standardization of medicinal products and dietary supplements containing natural components; 2022 Apr 8; Kharkiv. p. 82-3.
- [27] Melnychuk MD, Likhanov AF, Kovalenko TM, Klyuvadenko AA. Secondary metabolites and their role in plant adaptation and defense systems. Vinnytsia: Vinnytsia National Agrarian University; 2022. 192 p.
- [28] Shcherbakova TV. Stabilization of the natural color of fruit and vegetable processing products [dissertation]. Kharkiv: Kharkiv State University of Food Technology and Trade; 2009. 219 p.
- [29] Seleznev KG, inventor. How to eliminate the smell of onions. Ukraine patent 125956. 2018 May 25.
- [30] Lou W, Chen Y, Ma H, Liang G, Liu B. Antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of tannic acid. *J Food Sci Technol.* 2018;55(9):3640-6. DOI: 10.1007/s13197-018-3292-x
- [31] Friedrich K, Wermter NS, Andernach L, Witzel K, Hanschen FS. Formation of volatile sulfur compounds and S-methyl-L-cysteine sulfoxide in Brassica oleracea vegetables. *Food Chem.* 2022;383:132544. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132544
- [32] Eib S, Schneider DJ, Hensel O, Seuß-Baum I. Relationship between mustard pungency and allyl-isothiocyanate content: A comparison of sensory and chemical evaluations. *J Food Sci.* 2020;85(9):2728-36. DOI: 10.1111/1750-3841.15383
- [33] Adefegha AOASA, Oboh G, Akinyemi A.J, Ademiluyi AO. Inhibitory effects of aqueous extract of two varieties of ginger on some key enzymes linked to type-2 diabetes in vitro. *J Food Nutr Res.* 2010;49(1):14-20.
- [34] Kamoi T. Discovery of overlooked enzyme in onion and its application. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.* 2019;194(7):698-700. DOI: 10.1080/10426507.2019.1603704
- [35] Babenko LM, Shcherbatiuk MM, Kosakivska IV. Lipoxigenase activity and rhizomes ultrastructure of vegetative and generative shoots of *Equisetum arvense* L. *Studia Biologica.* 2015;9(1):153-62. DOI: 10.30970/sbi.0901.405
- [36] Babenko LM, Voytenko LV, Skaterna TD, Musatenko LI. Lipoxigenase activity in *Equisetum arvense* L. ontogenesis. *Plant Physiol Genet.* 2014;46(1):37-44.
- [37] Vincenti S, Mariani M, Alberti JC, Jacopini S, Brunini-Bronzini de Caraffa V, Berti L, et al. Biocatalytic synthesis of natural green leaf volatiles using the lipoxigenase metabolic pathway. *catalysts.* 2019 Oct 22;9(10):873. DOI: 10.3390/catal9100873
- [38] Araji S, Grammer TA, Gertzen R, Anderson SD, Mikulic-Petkovsek M, Veberic R, et al. Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut. *Plant Physiol.* 2014 Mar;164(3):1191-203. DOI: 10.1104/pp.113.228593
- [39] Musiienko MM. *Plant physiology.* 2nd edition. Kyiv: Lybid; 2005. 808 p.
- [40] Dubova H, Yegorov B, Bezusov A, Voskoboinyk V. Study of factors affecting development of food aromatization. *Food Sci Technol.* 2017;11(3). DOI: 10.15673/fst.v11i3.603
- [41] Shi J, Wu W, Zhang Y, Baldermann S, Peng Q, Wang J, et al. Comprehensive analysis of carotenoid constituents in purple-coloured leaves and carotenoid-derived aroma differences after processing into green, black, and white tea. *LWT.* 2023;173:114286. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.114286
- [42] Semenikhin AV, Sukhovieiev VV, Patyka MV, Lukach VS. The effect of exogenous factors on the polyenzymatic activity of RuBisCO and ATP synthase of chloroplasts from pea leaves. *J Org Pharm Chem.* 2021;19(3):21-7. DOI: 10.24959/ophcj.21.240779
- [43] Simão AA, Santos MAI, Fraguas RM, Braga MA, Marques TR, Duarte MH, et al. Antioxidants and chlorophyll in cassava leaves at three plant ages. *Afr J Agric Res.* 2013;8(28):3724-30. DOI: 10.5897/AJAR2013.6746
- [44] Baumgertel A, Loebers A, Kreis W. Buckwheat as a source for the herbal drug *Fagopyri herba*: rutin content and activity of flavonoid-degrading enzymes during plant development. *Eur J Plant Sci Biotechnol.* 2010;4(1):82-6.
- [45] Zhang S. Recent advances of polyphenol oxidases in plants. *Molecules.* 2023;28(5):2158. DOI: 10.3390/molecules28052158
- [46] Rasool F, Uzair M, Naeem MK, Rehman N, Afroz A, Shah H, et al. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) genes family in wheat (*Triticum aestivum* L.): Genome-wide characterization and expression profiling. *Agronomy.* 2021;11(12):2511. DOI: 10.3390/agronomy11122511
- [47] Michaluk M, Poliak P, Lukeš, V, Klein E. From phenols to quinones: Thermodynamics of radical scavenging activity of para-substituted phenols. *Phytochemistry.* 2019;166:112077. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.112077
- [48] Knapp H, Straubinger M, Stingl C, Winterhalter P. Analysis of norisoprenoid aroma precursors. In: Carotenoid-derived aroma compounds. Chapter 2. American Chemical Society; 2001. p. 20-35. DOI: 10.1021/bk-2002-0802.ch002
- [49] Makrushin MM, Makrushina YM, Peterson NV, Melnykov MM. *Plant physiology.* Vinnytsia: Nova Knyha; 2006. 416 p.
- [50] Kong J, Yang X, Zuo X, Su X, Hu B, Liang X. High-quality instant black tea manufactured using fresh tea leaves by two-stage submerged enzymatic processing. *Food Sci Hum Wellness.* 2022;11(3):676-85. DOI: 10.1016/j.fshw.2021.12.025

- [51] León J, Castillo MC, Gayubas B. The hypoxia–reoxygenation stress in plants. *J Exp Bot.* 2021;72(16):5841-856. DOI: 10.1093/jxb/eraa591
- [52] Esquivel MG, Pinto TS, Marín-Navarro J, Moreno J. Substitution of tyrosine residues at the aromatic cluster around the  $\beta$ A- $\beta$ B loop of rubisco small subunit affects the structural stability of the enzyme and the in vivo degradation under stress conditions. *Biochemistry.* 2006;45(18):5745-53. DOI: 10.1021/bi052588y
- [53] Lou W, Bezusov A, Li B, Dubova H. Recent advances in studying tannic acid and its interaction with proteins and polysaccharides. *Food Sci Technol.* 2019;13(3):65-9. DOI: 10.15673/fst.v13i3.1452
- [54] Kosakovskaya IV, Klimchuk DA, Demirevskaya K, Bluma DA, Ustinova AYU. Influence of stress temperatures on the electrophoretic spectrum of proteins and ultrastructure of leaf cells of plants with different types of ecological strategies. *Bull Kharkiv Natl Agrar Univ Ser Biol.* 2010;(1):34-43.
- [55] Di Stefano E, Agyei D, Njoku EN, Udenigwe CC. Plant RuBisCo: An underutilized protein for food applications. *J Am Oil Chem Soc.* 2018;95(8):1063-74. DOI: 10.1002/aocs.12104

---

H.Ye. Dubova<sup>1,2</sup>, I.V. Levchuk<sup>3</sup>, A.Yu. Galkin<sup>1</sup>, Ye.V. Hmelnitska<sup>2</sup>, N.L. Poyedinok<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Poltava State Agrarian University, Poltava, Ukraine

<sup>3</sup>Ukrmetrteststandart, Kyiv, Ukraine

#### NEW APPROACHES TO USING PLANT FLAVOR-FORMING ENZYMES

**Background.** Proteases, as well as enzyme complexes with various combinations of lipase, amylase, and cellulase, are used as flavor enzymes to impart aroma to processed raw materials. Plant-derived enzymes have significant potential for influencing aroma-forming reactions.

**Objective.** The aim of this study is to investigate the intentional alteration of the aroma of onions, linden leaves, and cherry leaves by either activating (in the case of linden and cherry leaves) or inhibiting (in the case of onions) specific plant enzyme complexes.

**Methods.** Linden and cherry leaves, as well as onion bulbs, were selected as the subjects that change their aroma by a complex of enzymes. To activate the enzymes present in the tree leaves, fermentation conditions similar to those used in tea leaf processing were applied. Mustard seeds and horseradish roots were employed as supplementary sources of enzymes. Ginger, extracts of black tea, green tea, and oak bark were used to influence the reactions of onion aroma formation.

**Results.** It was determined that flavor enzymes of tree leaves are active in different periods of leaf formation: enzyme complex in cherry leaves becomes active after flowering, while linden leaves exhibit enzymatic activity before flowering. Plant enzymes, such as mustard myrosinases and horseradish polyphenol oxidases, were found to be effective in modifying the onion's flavor. The substances contained in extracts of black tea, green tea, and ginger were observed to effectively inhibit the development of onion aroma.

**Conclusions.** The compounds of ginger, black tea, and green tea extracts were found to slow down or inhibit the development of the onion aroma. The aroma of cherry and linden tree leaves undergoes transformation due to the natural leaf enzymes, resulting in aromas reminiscent of cherry berries and linden blossoms, respectively. Plant aroma-forming enzymes in linden leaves have a more significant impact on the aroma before flowering, whereas aroma-forming enzymes in cherry leaves exert a stronger influence after fruiting.

**Keywords:** plant enzymes; flavor enzymes; cherry leaves; linden leaves; onion aroma.