

**Wpływ warunków wzrostu i przechowywania na zawartość
związków biologicznie czynnych oraz aktywność przeciwutleniającą
kietków koniczyny (*Trifolium L.*)**

mgr inż. Ewelina Grygiel

Promotor

prof. dr hab. inż. Grażyna Budryn

Promotor pomocniczy

dr inż. Ilona Gałązka-Czarnecka

Streszczenie

Skiełkowane nasiona, w tym kielki koniczyny, mogą być ważnym źródłem fitozwiązków, wykazując wielokierunkowe działania farmakologiczne, prozdrowotne i profilaktyczne. Profil oraz poziom tych związków są silnie uzależnione od genotypu rośliny, ale także od warunków kiełkowania nasion, które mają istotne znaczenie dla podwyższenia wartości odżywczej oraz bioaktywnej, a także lepszej smakowitości skiełkowanych nasion.

Głównym celem pracy było porównanie składu ilościowego i jakościowego izoflawonów, związków polifenolowych oraz kwasu L-askorbinowego w wybranych odmianach kiełków koniczyny (*Trifolium* L.) oraz określenie aktywności przeciwutleniającej podczas wzrostu i kiełkowania w zróżnicowanych warunkach. Dokonano ponadto oceny wpływu przechowywania chłodniczego, w tym w modyfikowanej atmosferze, na zawartość i stabilność wybranych związków biologicznie czynnych oraz na aktywność przeciwutleniającą kiełków koniczyny różnych odmian. Jednocześnie wykonano analizę cech sensorycznych kiełków podczas przechowywania.

Materiał badawczy stanowiły nasiona dostępne w specjalistycznych placówkach handlowych i uzyskane z nich kielki pięciu odmian: koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense* L.) Rozeta i Nike, koniczyny białej (*Trifolium repens* L.), koniczyny egipskiej (*Trifolium alexandrinum* L.) i koniczyny bladuróżowej (*Trifolium hybridum* L.). We wstępnym etapie określono wydajność ekstrakcji związków polifenolowych oraz izoflawonów w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika i jego stężenia z wykorzystaniem ekstraktora ciśnieniowego. Drugi etap badań obejmował analizy podczas uprawy i wzrostu kiełków koniczyny w warunkach z dostępem do rozproszonego światła dziennego i w ciemności. Uprawę prowadzono w zautomatyzowanych kiełkownicach Mikrofarm EasyGreen. W ekstraktach z nasion i kiełków oznaczono zawartość polifenoli ogółem metodą Folina-Ciocalteu'a, zawartość kwasu L-askorbinowego metodą Tillmansa, zdolność zmiatania wolnych rodników DPPH, a także skład ilościowy i jakościowy izoflawonów oraz kumestrolu metodą LC-ESI-MS. Porównano także skład podstawowy kiełków poszczególnych odmian w tym zawartość wody, białka i tłuszczu.

Uzyskane w trakcie eksperymentów wyniki potwierdziły, że warunki wzrostu, a w szczególności dostęp do światła dziennego wpływa na syntezę izoflawonów, związków polifenolowych, kwasu L-askorbinowego oraz aktywność przeciwutleniającą kiełków koniczyny. Ponadto na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że zawartość w/w składników i zdolność przeciwutleniająca kiełków są istotnie determinowane przez odmianę kiełków oraz długość okresu kiełkowania. We wszystkich analizowanych próbach, kielki rosnące z dostępem do rozproszonego światła dziennego wykazywały wyższe zawartości kwasu L-askorbinowego i związków polifenolowych oraz silniejsze właściwości antyoksydacyjne. W porównywanych warunkach wzrostu można zauważyć, że ogólna zawartość badanych związków polifenolowych podczas uprawy zwiększała się sukcesywnie,

osiągając maksymalne wartości między 7 a 9 dniem zbioru kielków, w zależności od odmiany. Zdolność zmiatania wolnych rodników DPPH także zmieniała się istotnie w czasie kiełkowania, a maksymalne działanie zmiatające uzyskano w czasie 6 i 7 doby. Z kolei, aby zachować korzystną zawartość kwasu L-askorbinowego w kielkach koniczyny, najlepiej nie przekraczać 5 do 6 dni kiełkowania.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały ponadto, że zawartość zarówno izoflawonów jak i kumestrolu w nasionach jak i kielkach koniczyny była silnie zróżnicowana w zależności od odmiany. Najwyższym stężeniem analizowanych izoflawonów ogółem charakteryzowały się kielki i nasiona koniczyny czerwonej odmiany *Rozeta*, zaś najniższe ilości tych związków określono w kielkach i nasionach koniczyny białej. Dominującymi izoflawonami w nasionach koniczyny czerwonej były ononina i formononetyna. W koniczynie egipskiej oznaczono najwięcej genisteiny i biochaniny A. Nasiona koniczyny białej zawierały największe ilości genistyny, a nasiona koniczyny białoróżowej obfitowały w genisteinę i formononetynę. Istotne różnice zaobserwowano również w zawartości kumestrolu w zależności od badanej odmiany nasion. Związek ten występował w 5 z 3 przebadanych odmian koniczyny, a jego najbogatszym źródłem okazały się nasiona koniczyny białoróżowej (szwedzkiej) i białej, najmniejsze ilości oznaczono w koniczynie czerwonej odmiany *Rozeta*. Kumestrolu nie wykryto w nasionach koniczyny czerwonej *Nike* oraz nasionach koniczyny egipskiej, zaś występował w ich kielkach. Efekty przeprowadzonych analiz dowiodły, że zarówno profil jakościowy izoflawonów jak i dynamika ilościowa akumulacji tych związków w kielkach koniczyny uzależnione były od warunków prowadzenia uprawy, a także zmieniały się znacząco w czasie kiełkowania (na poziomie $p < 0,05$). Ponadto na podstawie uzyskanych wyników nie można ustalić jednego wspólnego dnia, który mógłby być najkorzystniejszym dniem zbioru kielków koniczyny pod względem najwyższego stężenia wszystkich badanych izoflawonów. Maksymalna zawartość poszczególnych substancji występuje w innych dniach, w zależności od odmiany, gatunku i warunków prowadzenia uprawy oraz jest cechą indywidualną każdego związku.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji można wnioskować, że dostęp do światła dziennego podczas kiełkowania koniczyny czerwonej sprzyja akumulacji izoflawonów w postaci wolnej (aglikonów), natomiast kiełkowanie w ciemności jest korzystne dla akumulacji form związanych izoflawonów (glikozydów). Podobne zależności występowały w zmianach stężenia biochaniny A i sissotryny, genisteiny i genistyny oraz daidzeiny i daidzyny w kielkach obu odmian koniczyny czerwonej.

Ostatni etap badań obejmował analizy kielków koniczyny czerwonej z nasion odmiany *Rozeta* przechowywane w warunkach chłodniczych w folii LDPE oraz pakowanie w zmodyfikowanym składzie atmosfery (MAP 1 i MAP 2). Uzyskane wyniki wskazują, że niska temperatura nie powoduje degradacji polifenoli, a dla zachowania względnie wysokiego poziomu związków polifenolowych najlepiej nie przekraczać 10 dni przechowywania w warunkach chłodniczych oraz zastosować MAP o zmniejszonej

zawartości tlenu - 5% i zwiększonej zawartości dwutlenku węgla (również 5%), które w czasie przechowywania kiełków koniczyny czerwonej jest korzystniejszym stężeniem dla zachowania właściwości antyoksydacyjnych aniżeli jego zwiększenie do 10%. Najlepszym wariantem przechowywania kiełków koniczyny dla spowolnienia degradacji kwasu L-askorbinowego było połączenie niskiej temperatury wraz z MAP o składzie 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂. Natomiast wzrost zawartości CO₂ do 10% nie powodował już lepszej stabilizacji tego składnika. Ponadto, na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można stwierdzić, że przechowywanie kiełków koniczyny czerwonej w zastosowanych warunkach MAP wpływa na ich wzrost bioaktywności. Zawartość izoflawonów wzrosła kilkukrotnie w czasie 14 dni przechowywania. Uzyskane wyniki świadczą także o tym, że przechowywanie kiełków koniczyny czerwonej w warunkach chłodniczych w temp. 2 ± 1°C, opakowanych w folię LDPE, wpływa korzystnie na zawartość barwników chlorofilowych i karotenoidowych w czasie do 10 dni.

Dokonana ocena sensoryczna kiełków pokazała, że kiełki przechowywane w MAP 2 wyróżniały się korzystniejszymi cechami sensorycznymi, w porównaniu do tych przechowywanych jedynie w warunkach chłodniczych (K) oraz w MAP 1. Można także stwierdzić, że przechowywanie kiełków koniczyny czerwonej w modyfikowanej atmosferze o składzie 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂, gdzie zastosowano obniżenie zawartości tlenu z jednoczesnym zwiększeniem stężenia dwutlenku węgla, wpływa pozytywnie na ich walory sensoryczne w czasie 7 do 9 dni. przechowywania

Przedstawione wyniki badań potwierdzają wpływ światła dziennego na syntezę izoflawonów oraz witamin, a także na aktywność przeciwutleniającą podczas kiełkowania nasion koniczyny. Późniejsze przechowywanie kiełków koniczyny czerwonej w zróżnicowanych warunkach w różny sposób wpływa na stabilność wybranych izoflawonów, witamin, chlorofili, karotenoidów, aktywność przeciwutleniającą oraz ich cechy sensoryczne. Dlatego warto analizować różne warunki wzrostu kiełków oraz ich przechowywania w celu zapewnienia możliwie najwyższych poziomów związków bioaktywnych.

Kiełki koniczyn badanych odmian z uwagi na wysoką zawartość związków bioaktywnych, jakimi są izoflawony, mogą być korzystnym dla zdrowia urozmaiceniem diety oraz być wykorzystywane w przemyśle spożywczym do otrzymywania złożonych produktów. Kiełkowanie nasion i późniejsze przechowywanie kiełków mogą być dobrymi sposobami na skuteczne modyfikowanie wartości nutraceutycznych jak i odżywczych.