

Halina Kozłowska, Henryk Zieliński, Adam Buciński, Mariusz K. Piskula
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, Oddział Nauki o Żywności

Składniki biologicznie czynne w kielkach nasion rzepaku*

Bioactive compounds in rapeseed sprouts

Słowa kluczowe: nasiona rzepaku, kiełkowanie, związki biologicznie aktywne, właściwości przeciwutleniające

Key words: seeds of oilseed rape, germination, bioactive compounds, antioxidant properties

Nasiona rzepaku „00” odmiany Mango poddano procesowi kiełkowania w szafie klimatyzacyjnej w temperaturze 25°C i wilgotności 95% bez dostępu światła przez 7 dni. W każdym dniu oznaczano zawartość związków fenolowych ogółem (TPC), białek rozpuszczalnych, tokoferoli (α -T, β -T, γ -T, δ -T), glutationu (GSH), kwasu askorbinowego (AH₂) oraz heksafosforanów inozytolu (InsP₆). Ponadto, w każdym dniu kiełkowania oceniano właściwości przeciwutleniające kielków poprzez pomiar ich całkowitej pojemności przeciwutleniającej (TAS) oraz zdolność do wymiatania anionorodnika ponadtlenkowego w warunkach *in vitro* (SOD). W czasie kiełkowania wzrastała zawartość wszystkich tokoferoli, związków fenolowych ogółem oraz kwasu askorbinowego. Jednocześnie obniżeniu ulegała zawartość zredukowanego glutationu, białka rozpuszczalnego oraz heksafosforanu inozytolu. Całkowita pojemność przeciwutleniająca kielków oraz ich zdolność do wymiatania anionorodnika ponadtlenkowego była wyższa niż w nasionach, a ich zdolność do wymiatania anionorodnika ponadtlenkowego rosła wraz z wydłużaniem czasu kiełkowania, aż do 7 dnia. Uzyskane wyniki wskazują, że kielki nasion rzepaku są cennym źródłem związków bioaktywnych o właściwościach przeciwutleniających i mogą stanowić produkt spożywczy.

Seeds of double low oilseed rape of Mango variety were subjected to a 7-day germination in a conditioning cabinet, at a temperature of 25°C and moisture content of 95%, without light. Every day, the content of total phenolics (TPC), soluble proteins, tocopherols (α -T, β -T, γ -T, δ -T), reduced glutathione (GSH), L-ascorbic acid (AH₂), inositol hexaphosphate (InsP₆), and additionally superoxide dismutase (SOD) – like activity and total antioxidant status (TAS) were determined. The results showed that during germination the content of all tocopherols, AH₂ and TPC increased. In contrast, a progressive reduction in GSH was noted. Similarly, during sprouting, the soluble proteins and inositol hexaphosphate (InsP₆) contents decreased gradually in a linear fashion. These observations were supported by the higher total antioxidant status of sprouts when compared to the seeds. Also, the superoxide dismutase (SOD-like activity) increased during the germination period. The results obtained indicate that the rapeseed sprouts represent a rich source of bioactive compounds and can be used in human diets.

* Pracę wykonano w ramach projektu badawczego nr 5 P06G 043 19 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Wstęp

Kielki należą do produktów roślinnych od dawna wykorzystywanych w żywieniu ludzi Dalekiego Wschodu, a ostatnio także w Europie. Stanowią one przykład nowoczesnego produktu z pogranicza dwóch grup żywności nowej generacji — żywności minimalnie przetworzonej i żywności funkcjonalnej — prozdrowotnej. Powodem dużej popularności kielków jest przeświadczenie, że wnoszą one do diety ważne z żywieniowego punktu widzenia składniki, a wśród nich fitozwiązki oraz witaminy, którym przypisuje się właściwości prozdrowotne. Do produkcji kielków wykorzystuje się najczęściej nasiona roślin strączkowych oraz niektóre gatunki zbóż, a najpopularniejszymi są kielki sojowe. W literaturze światowej niewiele jest informacji na temat składu chemicznego kielków, a szczególnie brak jest danych dotyczących ich wartości zdrowotnych. Dużo natomiast uwagi poświęcono kiełkowaniu ziarniaków zbóż w aspekcie fizjologii i biochemii roślin (Meredith, Pomeranz 1983; Okamoto, Akazawa 1980; Bewley, Black 1985).

Badając możliwość wykorzystania nasion rzepaku do produkcji jadalnych kielków, dokonaliśmy oceny konsumenckiej i profilu sensorycznego kielków oraz zawartości w nich glukozyzolanów (Kozłowska i in. 2002). Badania wykazały, że zawartość dominujących GLS, do których należy progoitryna i glikonapina, ulegała zmniejszeniu już po 4 dniach kiełkowania (w tym czasie kielki nadawały się do spożycia), podczas gdy zawartość GLS indolowych stopniowo wzrastała w miarę wydłużania czasu kiełkowania. Wśród czterech GLS indolowych wyjątek stanowiła 4-hydroksyglukobrassicina, której zawartość ulegała obniżeniu, podobnie jak jedyne go GLS arylowego glukonaturtyny. Wyniki oceny konsumenckiej wykazały, że kielki rzepaku spełniały oczekiwania jakościowe konsumentów, uzyskując w skali 10 jednostek umownych notę 4,6. Kielki rzepaku charakteryzowały się mniej intensywną barwą, niższą intensywnością zapachu warzywnego, a także niższą intensywnością smaku charakterystycznego dla nasion z rodziny *Cruciferae*.

Kielki z nasion rzepaku nie były dotąd brane pod uwagę jako składnik żywności i dlatego brak jest informacji dotyczących zawartości w tym produkcie związków bioaktywnych, a także nieznanne są ich właściwości przeciwutleniające. Stąd też postanowiono zbadać zupełnie inne związki biologicznie aktywne poza GLS w czasie kiełkowania oraz ocenić właściwości przeciwutleniające kielków.

Praca ta stanowi kolejny etap badań nad możliwością wykorzystania nasion rzepaku jako surowców do produkcji kielków stanowiących produkty o właściwościach żywności funkcjonalnej.

Material i metody

Procesowi kiełkowania poddano nasiona rzepaku dwuzerowego odmiany Mango pochodzące ze Stacji Hodowli w Olsztynie. Kielkowanie prowadzono

w szafie klimatyzacyjnej (Cliambic Cabinet, Economic Deluxe EC00-065, Snijders Scientific b.v., Holland) w temperaturze 25°C i wilgotności 95% bez dostępu światła przez 7 dni. Materiał do badań pobierano co 24 godziny, zamrażano w ciekłym azocie, a następnie liofilizowano. W tak przygotowanym materiale oznaczano zawartość poszczególnych związków biologicznie aktywnych oraz właściwości przeciwutleniające.

Oznaczanie związków biologicznie aktywnych

Zawartość związków fenolowych ogółem (TPC) oznaczano spektrofotometrycznie według metody Shahidi i Naczk (1995), natomiast tokoferole (α -T, β -T, γ -T, δ -T), kwas askorbinowy (AH₂) i heksafosforany inozytolu (InsP₆) były analizowane za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) zgodnie z metodami opisanymi odpowiednio przez Paterson'a i Qureshi (1993), Oruna-Concha i wsp. (1998) oraz Sandberg i Adherinne (1986). Zawartość białka rozpuszczalnego oszacowano metodą Bradford'a (1976), natomiast poziom zredukowanego glutationu (GSH) metodą enzymatyczną (Tietze 1969).

Metody oceny właściwości przeciwutleniających kielków

Pojemność przeciwutleniającą kielków oznaczono spektrofotometrycznie w ekstraktach uzyskanych na bazie 80% metanolu według metody Miller'a i Rice-Evans (1996). Pojemność przeciwutleniającą, wyrażającą zdolność ekstraktów do wymiatania kationorodnika ABTS^{•+}, wyrażono w stosunku do syntetycznego, rozpuszczalnego w wodzie analogu witaminy E — troloksu. Zdolność ekstraktów sporządzonych na bazie 0,1 M buforu fosforanowego do wymiatania anionorodnika ponadtlenkowego określono przy wykorzystaniu testu diagnostycznego służącego do badania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (RANSOD, Cat No SD 125, Randox Laboratories Ltd, UK).

Wyniki stanowią średnią z trzech oddzielnie prowadzonych procesów kiełkowania i z trzech równoległe wykonanych analiz chemicznych.

Wyniki i ich omówienie

Charakterystykę podstawowego składu chemicznego nasion rzepaku oraz kielków po 4 dniach kiełkowania przedstawiono w tabeli 1. Zawartość poszczególnych tokoferoli w nasionach i kielkach rzepaku przedstawiono w tabeli 2. W nasionach rzepaku głównym izomerem witaminy E był γ -T, a jego zawartość stanowiła 64% wszystkich tokoferoli. Nasiona rzepaku stanowiły jednocześnie bogate źródło α -tokoferolu, którego ilość stanowiła 23% wszystkich analizowanych tokoferoli. Pozostałe 13% stanowiła w nasionach rzepaku pula tokoferoli wnoszona przez β -T i δ -T. W trakcie kiełkowania zawartość α -T wzrastała aż do 4 dnia kiełkowania, osiągając po tym czasie stabilny poziom obserwowany do

Tabela 1
Średnia zawartość wody, białka, popiołu, tłuszczu i węglowodanów (%) w liofilizowanych nasionach i 4-dniowych nadających się do spożycia kielkach rzepaku. — *The mean content of water, protein, ash, fat and carbohydrates (%) in lyophilized rapeseeds and ready for consumption lyophilized rapeseed sprouts collected after 4-day of germination*

Material — Material	Woda Water	Białko całkowite Total protein	Surowy popiół Crude ash	Tłuszcz Fat	Węglowodany Carbohydrates
Nasiona rzepaku — <i>Rapeseeds</i>	3,8 ± 0,1	21,6 ± 0,5	3,7 ± 0,1	42,9 ± 0,6	28,1 ± 0,9
Kielki rzepaku — <i>Rapeseed sprouts</i>	4,6 ± 0,4	20,8 ± 0,3	3,8 ± 0,5	32,6 ± 2,1	38,3 ± 2,7

Tabela 2
Zawartość tokoferoli (α -T, β -T, γ -T, δ -T) w czasie kiełkowania nasion rzepaku [$\mu\text{g}/\text{g}$ s.m.]
The content of tocopherols (α -T, β -T, γ -T, δ -T) during germination of rapeseeds [$\mu\text{g}/\text{g}$ s.m.]

Rzepak <i>Rapeseed</i>	Dzień kiełkowania — <i>Day of germination</i>							
	0	1	2	3	4	5	6	7
α -T	30,5	51,3 ± 5,7	24,9 ± 3,1	57,0 ± 5,5	104,4 ± 5,0	110,5 ± 2,7	115,1 ± 3,3	119,2 ± 4,9
β -T	11,5	17,6 ± 1,6	10,3 ± 0,9	40,2 ± 3,4	43,2 ± 5,1	48,5 ± 4,7	56,4 ± 6,3	59,7 ± 4,2
γ -T	84,7	117,3 ± 14,6	51,9 ± 7,9	53,6 ± 2,5	148,9 ± 10,5	82,5 ± 8,4	55,7 ± 4,2	90,8 ± 7,3
δ -T	5,5	6,8 ± 1,2	3,4 ± 0,6	13,1 ± 1,0	15,0 ± 2,1	12,7 ± 0,3	12,4 ± 0,8	11,8 ± 0,8

* Dane przedstawiają średnią z trzech powtórzeń procesu kiełkowania
Data show the mean from three replications of germination

końca procesu. Poziom γ -T wykazywał w czasie kiełkowania zmienne wartości bez wyraźnych tendencji do wzrostu czy spadku. Ponieważ najbardziej aktywną formą witaminy E jest α -tokoferol, to obserwowany wzrost zawartości tego związku podczas kiełkowania jest zjawiskiem pozytywnym. Podobny wzrost poziomu α -tokoferolu był obserwowany podczas kiełkowania ziaren pszenicy (Yang i in. 2001). Przyjmując, że aktywność pozostałych tokoferoli jest mniejsza, to całkowitą ich aktywność w kielkach przedstawiono w dalszej części pracy w międzynarodowych jednostkach witaminy E, stosując następujące mnożniki aktywności witaminy E dla poszczególnych tokoferoli: 1,0 dla α -T, 0,4 dla β -T, 0,1 dla γ -T i 0,01 dla δ -T (Mc Laughlin i Weihrauch 1979).

Zawartość poszczególnych związków biologicznie aktywnych w nasionach i kielkach rzepaku przedstawiono w tabeli 3. Badane nasiona rzepaku nie zawierały kwasu askorbinowego, natomiast w czasie kiełkowania jego zawartość wzrastała gwałtownie do 4 dnia procesu, osiągając po tym czasie stabilny poziom aż do 7 dnia kiełkowania. Wzrost zawartości witaminy C w kielkach jest zjawiskiem szczególnym, albowiem wzrastała ona w takim stopniu, który nie był obserwowany w stosunku do innych witamin. Stąd też kielki rzepaku reprezentują bogate źródło witaminy C, porównywalne z innymi kielkami (soja, soczewica, fasola mung), które znajdują się w sprzedaży (Piesiewicz i Mielcarz 2001). Zawartość witaminy E w badanych kielkach również wzrastała do 4 dnia kiełkowania, nie wykazując dalszych zmian po tym czasie, jednakże jej wzrost nie był tak intensywny jak w przypadku witaminy C. Do 4 dnia kiełkowania wzrastał także o 59% poziom związków fenolowych ogółem. Obserwowane zmiany zawartości witaminy C i E oraz związków fenolowych wskazują, że optymalnym czasem kiełkowania, który pozwala uzyskać jadalne kielki bogate w te składniki jest 4 dniowy cykl kiełkowania.

Badając zachowanie się innych związków biologicznie aktywnych w procesie kiełkowania, stwierdzono spadek zawartości zredukowanego glutationu, heksafosforanów inozytolu oraz białek rozpuszczalnych. Zawartość glutationu ulegała do 4 dnia kiełkowania prawie 4-krotnej redukcji w porównaniu do jego zawartości w nasionach. Potwierdza to z jednej strony fakt, że związek ten jest inhibitorem kiełkowania, z drugiej natomiast wskazuje na kielki jako na źródło tego związku porównywalnego z warzywami i owocami (Valencia i in. 2001). Zawartość białka rozpuszczalnego i heksafosforanów inozytolu obniżała się w sposób liniowy wraz z wydłużaniem czasu kiełkowania ($R^2 = 0,96$ i $R^2 = 0,94$). Fakt spadku zawartości heksafosforanów inozytolu w procesie kiełkowania jest zjawiskiem korzystnym, albowiem związek ten rozpada się do niższych form oraz wolnego inozytolu i kwasu fosforowego uwalniając jednocześnie uprzednio związane kationy Ca, Mg i K. Kwas fosforowy służy do syntezy nukleotydów, kwasów nukleinowych, fosfolipidów i wielu innych związków. Uwolniony inozytol i niższe formy obecne w kielkach zwiększają ich wartość odżywczą. Rozpad kwasu fitynowego poprawia przyswajalność kationów ziem alkalicznych, a pozytywne zmiany zawartości

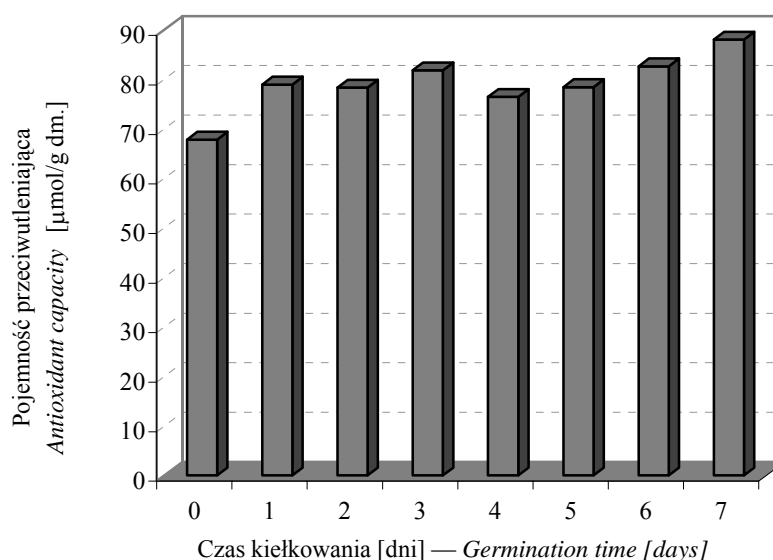
Tabela 3

Zawartość związków biologicznie aktywnych w kielkach rzepaku
The content of bioactive compounds in the course of germination of rapeseed

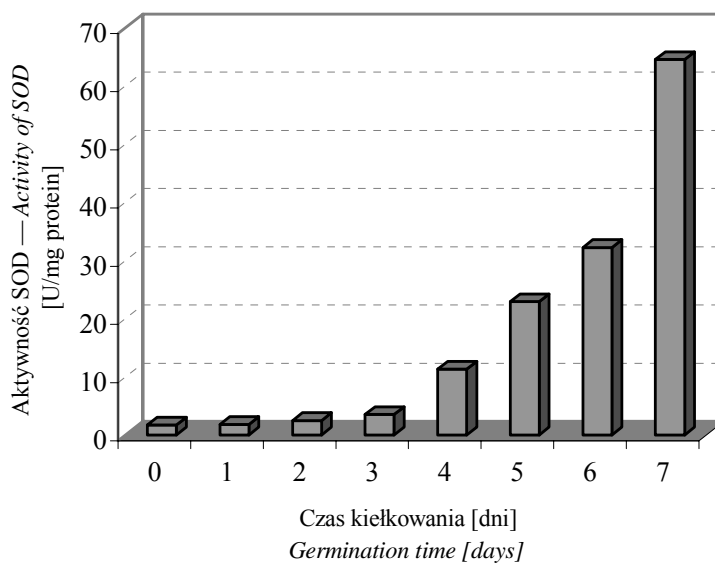
Czas kielkowania <i>Germination time</i> [dni]	Kwas askorbinowy <i>Ascorbic acid</i> [μmol/g dm.]	Witamina E <i>Vitamin E</i> [IU/kg dm.]	Związki fenolowe ogółem <i>Total phenolic compounds</i> [mg/g dm.]	Glutation <i>Glutathione</i> [μmol/g dm.]	Heksaosforan inozytolu <i>Inositol hexaphosphate</i> [μmol/g dm.]	Białko rozpuszczalne <i>Soluble proteins</i> [mg/g dm.]
0	43,6	43,6	5,10 ± 0,10	1,62 ± 0,15	38,25 ± 0,07	166,3 ± 9,2
1	0,70 ± 0,21	70,1	5,38 ± 0,10	1,84 ± 0,09	34,10 ± 2,16	164,6 ± 25,0
2	4,58 ± 2,17	34,3	6,18 ± 0,34	1,26 ± 0,58	31,93 ± 0,69	127,3 ± 7,0
3	10,54 ± 2,51	78,6	7,37 ± 0,49	0,41 ± 0,17	29,90 ± 0,78	102,8 ± 12,3
4	18,33 ± 2,95	136,7	8,11 ± 0,30	0,45 ± 0,02	19,43 ± 1,53	77,3 ± 4,7
5	20,76 ± 0,49	138,3	8,36 ± 0,48	0,41 ± 0,06	9,00 ± 1,01	55,6 ± 11,7
6	23,52 ± 1,85	143,4	8,40 ± 0,44	0,49 ± 0,09	4,57 ± 0,40	51,0 ± 3,6
7	21,89 ± 1,77	152,3	8,80 ± 0,32	0,38 ± 0,08	1,43 ± 0,32	50,0 ± 7,1

* Wartości stanowią średnią z trzech procesów kielkowania — *Values are means of three germinations*

analizowanych związków biologicznie aktywnych w procesie kiełkowania znalazły swoje odzwierciedlenie we wzroście ich całkowitej pojemności przeciwutleniającej, która w kielkach była wyższa od wartości ustalonej dla wyjściowych nasion (rys. 1). Zmiany całkowitej pojemności przeciwutleniającej były dodatnio skorelowane ze zmianami zawartości związków fenolowych, kwasu askorbinowego i aktywności witaminy E w kielkach, a obliczone współczynniki korelacji dla tych związków wynosiły odpowiednio 0,42, 0,62 oraz 0,58. W trakcie procesu kiełkowania rosła również zdolność kielków do wymiatania anionodnika ponadtlenkowego, co należy wiązać z działaniem dysmutazy ponadtlenkowej obecnej w tym materiale, jak również ze zdolnością analizowanych związków biologicznie aktywnych do wymiatania anionodnika ponadtlenkowego na drodze innej niż enzymatyczna dysmutacja (rys. 2). W oparciu o uzyskane wyniki można uznać, że skiełkowane nasiona rzepaku mogą stanowić cenne uzupełnienie diet prozdrowotnych, na które wzrasta zapotrzebowanie.



Rys. 1. Zmiany całkowitej pojemności przeciwutleniającej (TAS) w czasie kiełkowania nasion rzepaku
Changes in the total antioxidant capacity (TAS) of rapeseed in the course of germination



Rys. 2. Zmiany aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w czasie kiełkowania nasion rzepaku
Changes in superoxide dismutase (SOD) — like activity of rapeseed in the course of germination

Wnioski

1. Kiełki nasion rzepaku są bogatym źródłem ważnych dla zdrowia związków biologicznie aktywnych o właściwościach przeciwutleniających, takich jak witamina E i C, glutation oraz związki fenolowe.
2. Największe nagromadzenie związków bioaktywnych zaobserwowano po 4 dniach kiełkowania, kiedy kiełki były zdatne do spożycia.

Conclusions

1. Rapeseed sprouts are a rich source of bioactive compounds with antioxidant properties such as vitamin E and C, glutathione and phenolic compounds.
2. The optimal accumulation of bioactive compounds was found after the fourth day of germination, when sprouts were ready for consumption.

Literatura

- Bewley J.D., Black M. 1985. Seeds – physiology of development and germination. Plenum Press, New York and London.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Kozłowska H., Zieliński H., Buciuński A., Piskula M.K. 2002. Wykorzystanie nasion rzepaku do produkcji kielków jadalnych. *Rośliny Oleiste*, XXIII (1): 165-173.
- Mc Laughlin P.J., Weihrach J.L. 1979. Vitamin E content of foods. *J. Am. Dietet. Assoc.*, 75: 647-651.
- Meredith P., Pomeranz Y. 1983. Sprouted grain. *Advances in Cereal Science and Technology*. 7: 239.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A. 1996. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 2: 161-171.
- Okamoto K., Akazawa T. 1980. Biosynthesis and excretion of hydrolases in germinating cereal seed. *Plant Cell Physiol.*, 21(4): 201.
- Oruna-Concha M.J., Gonzalez-Castro M.J., Lopez-Hernandez J., Simal-Lozano J. 1998. Monitoring of the vitamin C content of frozen green beans and padron peppers by HPLC. *J. Sci. Food Agric.*, 76: 477-480.
- Paterson D.M., Qureshi A.A. 1993. Genotype and environment effects on barley and oats. *Cereal Chem.*, 70 (2): 157-162.
- Piesiewicz H., Mielczak M. 2001. Kielki w żywieniu człowieka. *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*: 10-14.
- Sandberg A.S., Ahderinne R. 1986. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates in food and intestinal contents. *J. Food Sci.*, 51: 547-550.
- Shahidi F., Naczek M. 1995. Methods of analysis and quantification of phenolic compounds. In: Shahidi F., Naczek M. (eds) *Food Phenolic: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Lancaster/ Pennsylvania: Technomic Publishing Company: 287-293.
- Tietze F. 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.*, 27: 502-522.
- Valencia E., Marin A., Hardy G. 2001. Glutathione – Nutritional and pharmacological viewpoints: part IV. *Nutrition*, 17: 783-784.
- Yang F., Basu T.K., Oraikul B. 2001. Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *Inter. J. Food Sci. Nutr.*, 52: 319-330.