

EWELINA BRZozowska, ILONA GAŁĄZKA-CZARNECKA,
LUCJAN KRALA

WPLYW ROZPROSZONEGO PROMIENIOWANIA SŁONECZNEGO NA WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI KIEŁKÓW KONICZINY CZERWONEJ (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)

Streszczenie

Kiełki koniczyny czerwonej, mimo walorów żywieniowych i prozdrowotnych, nie są dotychczas doceniane. Celem badań było określenie wpływu rozproszonego promieniowania słonecznego podczas wzrostu kiełków koniczyny czerwonej na zawartość w nich kwasu L-askorbinowego, związków polifenolowych, aktywność przeciwutleniającą i właściwości sensoryczne. Wzrost kiełków w automatycznej kiełkownicy, o kontrolowanych parametrach mikroklimatu, prowadzono przez 8 dni, z dostępem oraz bez dostępu promieniowania rozproszonego. Stwierdzono, że promieniowanie to wpłynęło korzystnie na zawartość badanych związków oraz na zdolności przeciwutleniające kiełków. Ze względu na walory sensoryczne oraz potencjał przeciwutleniający kiełków uznano, że najkorzystniejszym terminem zbioru była piąta i szósta doba wzrostu. W tym czasie zawartość związków polifenolowych w kiełkach uprawianych z dostępem promieniowania rozproszonego wyniosła 2051 mg/100 g s.m., zawartość kwasu L-askorbinowego – 115 mg KA/100 g s.m., natomiast współczynnik IC_{50} – 37 mg/ml. Kiełki uprawiane z dostępem promieniowania charakteryzowały się świeżym, ogórkowo-groszkowym zapachem, jędrną teksturą oraz jasnozieloną barwą. Wykazano, że kiełki koniczyny czerwonej mogą być cennym składnikiem pożywienia oraz atrakcyjnym dodatkiem do wielu dań.

Słowa kluczowe: kiełki koniczyny czerwonej, polifenole, kwas L-askorbinowy, aktywność przeciwutleniająca, DPPH

Wprowadzenie

Dziko rosnąca koniczyna czerwona (*Trifolium pratense*) od dawna była stosowana w wielu krajach jako zioło lecznicze [2, 31]. Wykazuje ona silne właściwości przeciwutleniające, głównie ze względu na dużą zawartość polifenoli, w tym także

Mgr inż. E. Brzozowska, dr inż. I. Gałazka-Czarnecka, dr hab. inż. L. Krala, Instytut Chemicznej Technologii Żywności, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź. Kontakt: evelina.brzozowska@gmail.com

izoflawonów należących do grupy fitoestrogenów, takich jak: daidzeina, genisteina, formononetyna oraz biochanina A [23].

Związki polifenolowe wykazują wiele właściwości korzystnych dla zdrowia człowieka, m.in. łagodzenie zaburzeń menopauzy, hamowanie chorób sercowo-naczyniowych oraz obniżanie ryzyka niektórych chorób nowotworowych u osób, które spożywają produkty zawierające izoflawony oraz inne związki polifenolowe [28]. W działaniach tych istotna jest zdolność polifenoli do wygaszania wolnych rodników, odpowiedzialnych za procesy utleniania zachodzące w organizmie człowieka w warunkach stresu oksydacyjnego. Wolne rodniki generują powstawanie stanów zapalnych, będących przyczyną różnych chorób (m.in. miażdżycy, nowotworów, zmian zwyrodnieniowych) oraz procesów starzenia się. Organizm człowieka wykształcił system obrony przed szkodliwym działaniem wolnych rodników. Przeciwutleniacze endogenne, takie jak: glutation, katalaza czy dysmutaza ponadtlenkowa zapobiegają powstawaniu wolnych rodników tlenowych, hamują procesy łańcuchowych reakcji utleniania lipidów, a układ enzymów specyficznych wspomaga naprawę oksydacyjnych uszkodzeń powstałych w cząsteczkach DNA. Istotną rolę w hamowaniu procesów oksydacyjnych pełnią także przeciwutleniacze występujące w żywności. Należą do nich m.in. związki fenolowe, witamina C, uważana za najsilniejszy przeciwutleniacz w środowisku wodnym, oraz witamina E. Stosowanie przeciwutleniaczy powoduje nie tylko hamowanie niekorzystnych zmian w organizmie ludzkim, ale również wspomaga przedłużenie trwałości produktów spożywczych ulegających autooksydacji [1, 6, 12, 24, 25].

Zapotrzebowanie na skuteczne, silnie działające i jednocześnie bezpieczne dla człowieka naturalne przeciwutleniacze ciągle wrasta. W związku z tym stale poszukuje się nowych źródeł tych związków. Dotychczas koniczyna czerwona nie była doceniana pod tym względem, gdyż jako roślina pastewna nie jest atrakcyjnym urozmaiceniem diety człowieka. Alternatywnym źródłem związków przeciwutleniających w stosunku do całych roślin mogą być kielki koniczyny czerwonej. Istnieje zapotrzebowanie na kielki roślinne, które od dawna stosowane są w diecie człowieka [19]. Kielki są źródłem wielu cennych witamin, związków mineralnych, aminokwasów i mikroelementów [13, 31, 33].

W trakcie kiełkowania nasiona charakteryzują się intensywnym metabolizmem: wzrasta w nich zawartość witamin i mikroelementów, a usunięte zostają składniki przeciwżywniowe, np. inhibitory trypsyny, co sprawia, że kielki są bezpieczne dla człowieka [17, 18]. Podczas kiełkowania nasion aktywowane są w nich enzymy, m.in. amololityczne, proteolityczne, i lipolityczne. Ich aktywność korzystnie zmienia skład skielkowanych nasion. Skrobia, białka i tłuszcze są rozkładane, stając się źródłem energii oraz substratami do syntezy nowych substancji [13, 20]. Zawartość składników biologicznie aktywnych może zwiększać się w odpowiedniej fazie kiełkowania, nawet

wielokrotnie w ciągu kilku dni [16]. Dane literaturowe wskazują na zależność pomiędzy zawartością związków przeciwutleniających w kielkach a warunkami ich wzrostu, tj. umiejscowieniem nasion, temperaturą i wilgotnością [8]. Znaczący wpływ na kiełkowanie, wzrost i rozwój roślin oraz zawartość wtórnych metabolitów (m.in. polifenoli) ma światło, jego źródło, intensywność i długość fali [5, 7, 11, 16, 27]. Badania wielu autorów nad procesami zachodzącymi w kiełkujących nasionach dotyczą także znaczenia światła jako czynnika pośredniczącego w regulacji aktywności enzymów [11]. Brak jest natomiast informacji dotyczących wpływu rozproszonego światła słonecznego na zawartość związków polifenolowych oraz mających właściwości przeciwutleniające w kielkach koniczyny czerwonej podczas ich wzrostu.

Celem pracy było określenie wpływu rozproszonego światła słonecznego na zawartość związków polifenolowych, kwasu L-askorbinowego, aktywność przeciwutleniającą i właściwości sensoryczne w rosnących kielkach koniczyny czerwonej oraz ustalenie optymalnego dnia ich zbioru.

Material i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły kielki uzyskane z nasion koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense* L.) odmiany 'Rozeta', dostępne w specjalistycznych placówkach handlowych. Kiełkowanie nasion prowadzono do 8 dni w temp. 22 ± 2 °C, przy wilgotności względnej powietrza (RH) 96 ± 2 %, z wykorzystaniem zautomatyzowanych kielkownic firmy EasyGreen, z systemem filtracji powietrza. Temperaturę oraz wilgotność względną powietrza wewnątrz kielkownic monitorowano przy użyciu termohigrometrów pastylkowych iButton (typ DS 1923-F5), firmy Maxim Integrated. Kielki nawilżane były wodą wodociągową w postaci mgły, wytwarzanej i rozprowadzanej równomiernie wewnątrz kielkownic przez zintegrowany z nimi generator, uruchamiany według zadanego programu co 4 h na 15 min. Kiełkowanie nasion prowadzono w dwóch wariantach:

- 1 – z dostępem rozproszonego promieniowania słonecznego,
- 2 – w kielkownicach umieszczonych w zaciemnionych pomieszczeniu (bez dostępu do światła). Kielki analizowano od czwartego do ósmego dnia uprawy włącznie.

Oznaczano zawartość: suchej masy, kwasu L-askorbinowego, sumy związków polifenolowych, a także określano właściwości przeciwutleniające (test z rodnikiem DPPH, czyli 2,2-difenylo-1-pikrohydrazylem) oraz podstawowe cechy sensoryczne, to jest smak, zapach, barwę oraz teksturę. W celu przygotowania próbek do analiz chemicznych świeże kielki rozdrabniano w młynku laboratoryjnym firmy IKA, typ A11.

Oznaczenie zawartości suchej masy w kielkach wykonywano metodą grawimetryczną, według Polskiej Normy [21].

Zawartość kwasu L-askorbinowego (KA) oznaczano metodą Tillmansa [3]. W celu przygotowania próbek do analiz, rozdrobnione świeże kielki homogenizowano

w 2-procentowym roztworze kwasu szczawiowego, co zapewniało ochronę kielków przed degradacją KA w czasie wykonywania analizy. Homogenat sączono, następnie miareczkowano mianowanym roztworem odczynnika Tillmansa. Zawartość KA wyrażano w mg KA/100 g s.m. badanych kielków.

Do oznaczania ogólnej zawartości związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej kielków, wyrażonej jako zdolność do wygaszania wolnych rodników, używano etanolowych ekstraktów świeżych kielków (70 % v/v, stosunek masy analitu do czynnika ekstrahującego 1 : 6). Ekstrakcję prowadzono w wytrząsarce orbitalnej (model SK-0330-PRO, Scilogex) przez 1 h, w temp. 20 ± 2 °C. Uzyskane ekstrakty wirowano przez 10 min z prędkością obrotową 3500 rpm (wirówka Sorvall ST 16, Thermo Scientific).

Sumę związków polifenolowych w ekstraktach oznaczano zmodyfikowaną metodą Folina-Ciocalteu'a [26], przy użyciu odczynnika firmy Sigma-Aldrich. Krzywą wzorcową do obliczenia wyniku końcowego sporządzono z użyciem katechiny (Sigma-Aldrich). Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 725$ nm.

Aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z kielków oznaczano z użyciem 96-procentowego etanolowego roztworu syntetycznych rodników DPPH, o stężeniu $2 \cdot 10^{-4}$ mg/ml (Sigma Aldrich). Wyniki analiz aktywności przeciwutleniającej kielków wyrażano jako masę świeżych kielków przypadającą na 1 ml ekstraktu, która powodowała wygaszenie 50 % wolnych rodników DPPH. Tak zdefiniowaną jednostkę aktywności przeciwutleniającej nazywa się współczynnikiem IC_{50} [mg s.m./ml]. Analizę IC_{50} wykonywano zgodnie z metodą przedstawioną przez Yen i Chen [32]. Stopień redukcji DPPH [%] wyznaczano z równania:

$$\text{Reakcja rodnika DPPH [\%]} = \frac{A_0 - A_E}{A_0} \cdot 100,$$

gdzie:

A_0 – absorbancja próbki kontrolnej,

A_E – absorbancja badanego ekstraktu.

Następnie z zależności stopnia redukcji DPPH od ilości ekstraktu, na podstawie krzywej wzorcowej, określano jego dawkę powodującą 50-procentową redukcję DPPH w warunkach wykonywania analizy.

Ocena cech sensorycznych dotyczyła smaku, zapachu, barwy oraz tekstury kielków. Wykonywano ją zgodnie z zaleceniami normy ISO [22] w specjalistycznej Pracowni Sensorycznej przez przeszkolony sześciuosobowy zespół oceniający, z zastosowaniem pięciopunktowej metody skalowania. Kryteria ocen punktowych cech sensorycznych kielków przedstawiono w tab. 1.

W każdym terminie badań analizowano po sześć prób. W celu ustalenia istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi parametrów kielków nasion koniczyny czerwono-

nej różnicowanymi warunkami ich wzrostu, wykonano jednoczynnikową analizę wariancji oraz test istotności różnic NIR, na poziomie istotności $p = 0,05$. Obliczenia wykonano w programie Statistica 10.

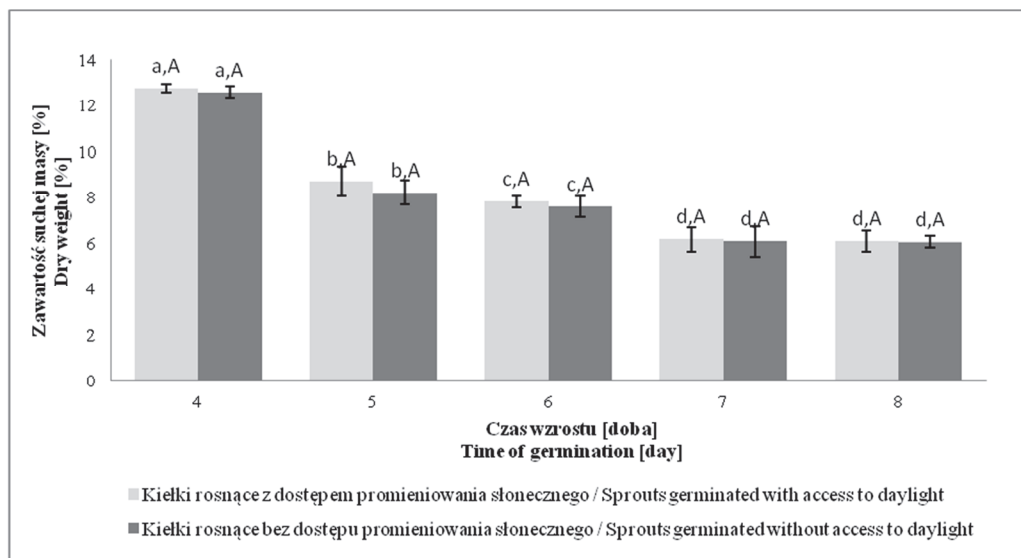
Tabela 1. Skala ocen cech sensorycznych kiełków koniczyny czerwonej.
Table 1. Assessment scale for sensory characteristics of red clover sprouts.

Ocena Score	Cecha / Characteristic			
	Barwa / Colour	Tekstura / Texture	Smak / Taste	Zapach / Smell
5	Jasnozielone liście, biało-kremowe łodyżki Light green leaves, creamy-white stems	Bardzo jędrne, zwarta konsystencja Very firm, compact consistency	Groszkowy, wyrazisty typowy dla odmiany Pea, expressive, typical for this variety	Świeży, ogórkowo-groszkowy, typowy dla odmiany Fresh cucumber and pea, typical for variety
4	Liście jasnozielone do ciemnozielonych, kremowe łodyżki Light to dark green leaves, creamy stems	Jędrne, zwarta konsystencja Firm, compact consistency	Groszkowy, mniej wyrazisty, typowy dla odmiany Pea, less expressive, typical for this variety	Ogórkowo-groszkowy, słabszy, typowy dla odmiany Cucumber and pea, weaker, typical for this variety
3	Żółtozielone liście, kremowe łodyżki Yellow-green leaves, creamy stems	Mniejsza jędrność, lekko wiotka Less firm, lightly flaccid	Groszkowy, lekko zmieniony, słabszy Pea, lightly modified, weaker	Lekko groszkowy, zmieniony Lightly like pea, changed
2	Żółtozielone liście, lekkobrazowe łodyżki Yellow-green leaves, lightly brown stems	Lekko lepka, wiotka Lightly sticky, flaccid	Lekko groszkowy, zmieniony Lightly pea, changed	Zmieniony, wyczuwalny kwaśny zapach Changed, perceptible sour smell
1	Żółtozielone i żółto-brązowe liście, brązowe łodyżki Yellow-green and yellow-brown leaves, brown stems	Lepka, bardzo zmieniona, niezachęcająca Sticky, highly changed, repulsive	Nietypowy dla odmiany, lekko kwaśny, mdły, niezachęcający Atypical for this variety, lightly sour, bland, repulsive	Nietypowy dla odmiany, gnilny Atypical for this variety, putrefactive

Wyniki badań i dyskusja

Zawartość suchej masy w kiełkach koniczyny czerwonej stopniowo zmniejszała się wraz z ich wzrostem (rys. 1). Od 4. do 6. dnia wzrostu zawartość suchej masy w kiełkach i nasionach koniczyny czerwonej zmniejszyła się z 13 do 8 %, po czym w kolejnych dwóch dniach ustabilizowała się na poziomie około 6 %. Nie stwierdzono statystycznie istotnych ($p \leq 0,05$) różnic pod względem zawartości suchej masy

w kielkach koniczyzny czerwonej uprawianych z dostępem rozproszonego promieniowania słonecznego oraz bez dostępu światła (rys. 1). Oznacza to, że promieniowanie słoneczne nie wywierało znaczącego wpływu na ogólną zawartość suchej masy w kielkach. Podobny rezultat uzyskali Świeca i wsp. [30], badając podczas kiełkowania nasiona soczewicy [30].



Objaśnienia: / Explanatory notes:

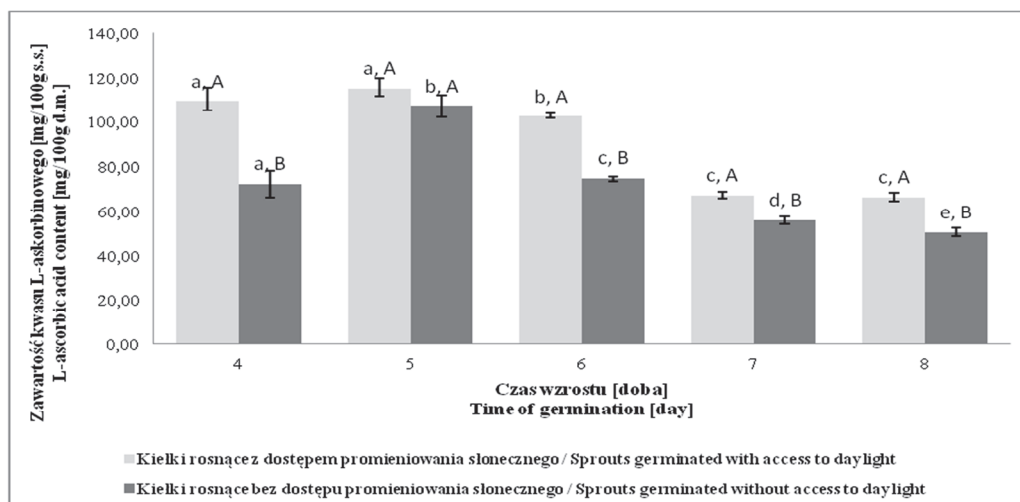
Wartości średnie oznaczone różnymi małymi literami dla każdego rodzaju uprawy oraz wartości średnie oznaczone dużą literą w danym dniu uprawy różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$). / Mean values denoted by different small letters for each germinating variety, and mean values denoted by capital letter on given germination day differ statistically significantly ($p \leq 0.05$).

Rys. 1. Zawartość suchej masy w kielkach koniczyzny czerwonej rosnących z dostępem rozproszonego promieniowania słonecznego oraz bez jego dostępu.

Fig. 1. Content of dry weight in red clover sprouts germinating in the presence and in the absence of diffuse solar radiation.

Do 5. dnia uprawy obserwowano wzrost zawartości kwasu L-askorbinowego w kielkach koniczyzny czerwonej (rys. 2). W następnych dniach eksperymentu zawartość KA w analizowanych kielkach zmniejszała się. Porównując zawartość KA w kielkach koniczyzny czerwonej rosnących z dostępem rozproszonego promieniowania słonecznego oraz bez światła, można stwierdzić, że w pierwszym przypadku jego zawartość utrzymywała się na wyższym poziomie (rys. 2), a różnice były statystycznie istotne ($p \leq 0,05$). W kielkach koniczyzny czerwonej uprawianej z dostępem światła rozproszonego zawartość KA wynosiła, w zależności od czasu wzrostu, 109 ÷

66 mg/100 g s.m., natomiast w kiełkach wzrastających bez dostępu światła – 115 ± 50 mg/100 g s.m. W obu wariantach kiełkowania (z dostępem i bez dostępu światła) największą zawartością KA, wynoszącą 115 i 107 mg/100 g s.m., odznaczały się kiełki w piątej dobie wzrostu, jednak różnice nie były statystycznie istotne ($p \leq 0,05$). W szóstej dobie wzrostu różnica zawartości KA w porównywanych kiełkach koniczyny czerwonej wynosiła już 30 %. Mniej KA zawierały kiełki uprawiane w zaciemnionym pomieszczeniu. Podsumowując tę część badań można stwierdzić, że dostęp rozproszonego promieniowania słonecznego do upraw wpłynął stymulująco na syntezę kwasu L-askorbinowego w kiełkach koniczyny czerwonej. Jest to korzystne ze względu na aspekt żywieniowy oraz aktywność biologiczną – KA decyduje bowiem o właściwościach przeciwutleniających [24, 25]. Podobną zależność wykazali Khattak i wsp. [10], analizując warunki wzrostu kiełków ciecierzycy.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

wartości średnie oznaczone różnymi małymi literami dla każdego rodzaju uprawy oraz wartości średnie oznaczone różnymi dużymi literami w danym dniu uprawy różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / values denoted by the same small letters for each germinating variety and mean values denoted by capital letters on given germination day differ statistically significantly ($p \leq 0.05$).

Rys. 2. Zawartość kwasu L-askorbinowego w kiełkach koniczyny czerwonej rosnących z dostępem rozproszonego promieniowania słonecznego oraz bez jego dostępu.

Fig. 2. Content of L-ascorbic acid in red clover sprouts germinating in the presence and in the absence of diffuse solar radiation.

Zapotrzebowanie organizmu dorosłego człowieka na witaminę C wynosi co najmniej 1 mg/kg masy ciała, a dzieci – 2 mg/kg masy ciała [15]. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki badań, można stwierdzić, że porcja 100 g świeżych kiełków koniczyny

czerwonej mogłaby pokryć 15÷20 % dziennego zapotrzebowania organizmu dorosłego człowieka na witaminę C (w postaci kwasu L-askorbinowego).

Zawartość związków polifenolowych w kiełkach koniczyny czerwonej, rosnących z dostępem promieniowania rozproszonego, wynosiła od 2028 do 2668 mg/100 g s.m. i była statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) większa niż w kiełkach rosnących w ciemności (tab. 2). W tym drugim przypadku ogólna zawartość związków polifenolowych wynosiła 1070 ÷ 2146 mg/100 g s.m. Dowiedziano zatem, że korzystniejszy był wzrost kiełków z udziałem promieniowania słonecznego. W tych warunkach następuje przyspieszenie fotosyntezy oraz szlaku malonyloCoA, co jest związane z syntezą związków fenolowych [11].

Tabela 2. Zawartość związków fenolowych w ekstraktach z kiełków koniczyny czerwonej rosnących z dostępem promieniowania słonecznego oraz bez jego dostępu.

Table 2. Content of total phenolic compounds in extracts of red clover sprouts germinating in the presence and in the absence of solar radiation.

Czas wzrostu [doba] Time of germination [day]	Związki polifenolowe ogółem [mg/100 g s.m.] Total phenolics [mg/100 g d.m.]	
	Warunki wzrostu / Conditions of germination	
	Kiełki rosnące z dostępem promieniowania słonecznego Sprouts germinating in the presence of solar radiation	Kiełki rosnące bez dostępu do promieniowania słonecznego Sprouts germinating in the absence of solar radiation
4	1838,91 ^{a,A} ± 37,02	1684,00 ^{a,B} ± 59,40
5	2028,06 ^{b,A} ± 69,36	1540,38 ^{b,B} ± 22,33
6	2051,60 ^{b,A} ± 88,64	1070,33 ^{c,B} ± 31,53
7	2336,89 ^{c,A} ± 83,52	2131,75 ^{d,B} ± 73,75
8	2634,40 ^{d,A} ± 92,13	1872,40 ^{e,B} ± 89,18

Objaśnienia: / Explanatory notes:

w tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / table shows mean values and standard deviations; wartości średnie oznaczone różnymi małymi literami w kolumnie oraz dużymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / mean values denoted by different small letters in column and by capital letters in rows differ statistically significantly ($p \leq 0.05$).

W piątej i szóstej dobie eksperymentu nie zaobserwowano statystycznie istotnych ($p \leq 0,05$) różnic zawartości związków polifenolowych w ekstraktach kiełków koniczyny czerwonej, determinowanych dostępem promieniowania słonecznego i jego brakiem w uprawie roślin. Zawartość ta wynosiła około 2030 mg/100 g s.m. Najwięcej polifenoli oznaczono w kiełkach w ósmej dobie wzrostu z dostępem promieniowania słonecznego. W porównywanych warunkach wzrostu można zauważyć, że ogólna zawartość związków polifenolowych w kiełkach sukcesywnie wzrastała. Przy czym

w warunkach dostępu do rozproszonego światła słonecznego charakter tych zmian był bardziej równomierny. Efekt zwiększania zawartości polifenoli w trakcie wzrostu kiełków wykazali López-Cervantes i wsp. [14] podczas badania kiełkujących nasion brokułu oraz Fernandez-Orozco i wsp. [4], którzy badali kiełki soi.

Stosowany w metodzie odczynnik Folina-Ciocalteu'a reaguje nie tylko z polifenolami, ale również z innymi związkami zawartymi w układzie biologicznym, np. z witaminą C, aminokwasami, białkami, kwasami organicznymi [9]. Podczas wzrostu kiełków następują w nich przemiany biochemiczne prowadzące do syntezy zróżnicowanych związków [13], które wchodzą w reakcje z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a i wpływają na zawyżenie wyniku oznaczenia. Wyjaśnienie tego zagadnienia wymaga kontynuowania prac badawczych z zastosowaniem dokładniejszych i selektywniejszych metod badawczych, np. wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Kiełki koniczyny czerwonej w 8. dobie wzrostu charakteryzowały się czterokrotnie większą zawartością związków polifenolowych w stosunku do kiełków soi [13, 14] oraz dwukrotnie – do kiełków fasoli mung [13].

Po przeanalizowaniu zdolności wygaszania wolnych rodników stwierdzono, że kiełki koniczyny czerwonej wykazywały najsilniejsze właściwości przeciwutleniające w 5. oraz 6. dobie wzrostu, a różnice nie były statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) – tab. 3. W celu zredukowania ilości wolnych rodników o 50 % należało użyć 37 mg/ml ekstraktu kiełków pochodzących z 6. doby uprawy naświetlanej światłem rozproszonym lub 44 mg/ml ekstraktu pięciodniowych kiełków koniczyny czerwonej uzyskanych w drugim wariantcie doświadczenia. Po siódmej i ósmej dobie wzrostu kiełków ich zdolność przeciwutleniająca była mniejsza, o czym świadczyła konieczność użycia do redukcji wolnych rodników coraz większych ilości ekstraktu z analizowanych kiełków. Dowodzi to, że czas wzrostu kiełków koniczyny czerwonej nie powinien przekraczać 6 dób. Przez cały okres prowadzenia eksperymentu wyższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się kiełki uprawiane z dostępem promieniowania słonecznego – różnice były statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów roślinnych jest w dużej mierze związana z zawartością w nich związków polifenolowych. Jednak porównując wyniki analiz zawartości związków polifenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej po 6. dobie uprawy kiełków koniczyny czerwonej można stwierdzić, że zależność ta była odwrotnie proporcjonalna. Również te dane pozwalają przypuszczać, że wyniki analiz z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a w ciągu 7. i 8. doby były zawyżone i mogły być spowodowane reakcją tego odczynnika z innymi związkami.

Wyniki oceny sensorycznej kiełków zobrazowano na wykresach radarowych (rys. 3). Krańce wykresów odpowiadają kolejnym dniom wzrostu kiełków. Wykazano, że kiełki rosnące w warunkach dostępu promieniowania rozproszonego charakteryzowały się korzystniejszymi cechami sensorycznymi niż nasiona kiełkujące w ciemności.

Największą różnicę zaobserwowano w przypadku barwy. Kielki rosnące bez dostępu światła rozproszonego miały wyraźnie mniej intensywne, żółtozielone zabarwienie niż kielki rosnące z udziałem światła. Stwierdzono również istotne ($p \leq 0,05$) różnice smaku i zapachu. Kielki uprawiane z dostępem rozproszonego promieniowania słonecznego cechował wyrazisty, groszkowy smak i intensywny, świeży, ogórkowo-groszkowy zapach. Kielki uprawiane bez dostępu światła cechowały się podobnymi nutami smakowo-zapachowymi, jednak zdecydowanie mniej intensywnymi. Najmniejsze różnice dotyczyły tekstury.

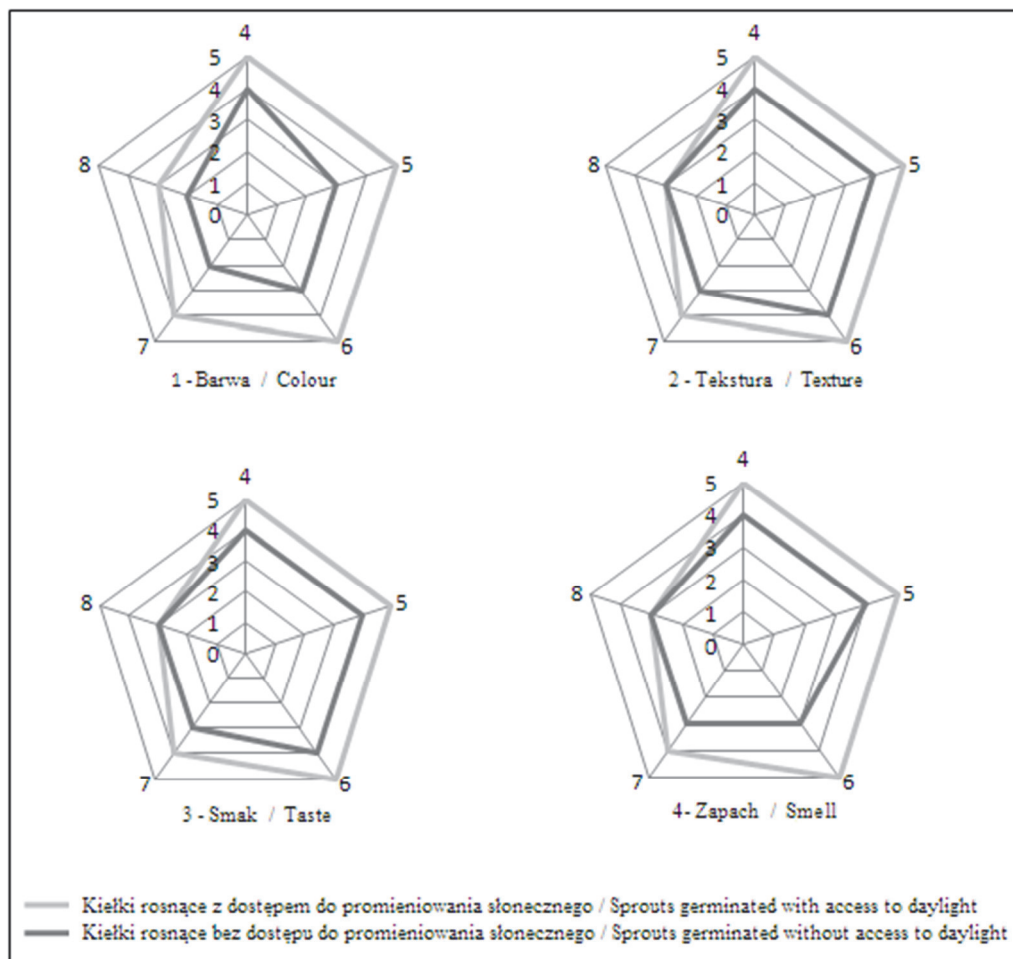
Tabela 3. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów kielków koniczyny czerwonej, rosnących z dostępem rozproszonego promieniowania słonecznego oraz bez jego dostępu.

Table 3. Antioxidant activity of extracts from red clover sprouts germinated with access to diffused daylight and without access to daylight

Czas wzrostu [doba] Time of germination [day]	Współczynnik IC ₅₀ [mg/ml] IC ₅₀ coefficient [mg/ml]	
	Warunki wzrostu / Conditions of germination	
	Kielki rosnące z dostępem promieniowania słonecznego Sprouts germinating in the presence of solar radiation	Kielki rosnące bez dostępu promieniowania słonecznego Sprouts germinating in the absence of solar radiation
4	44,69 ^{a,A} ± 1,50	57,91 ^{a,B} ± 1,81
5	37,28 ^{b,A} ± 0,64	42,83 ^{b,B} ± 1,48
6	37,27 ^{b,A} ± 1,77	43,99 ^{b,B} ± 1,18
7	50,14 ^{c,A} ± 2,04	54,10 ^{c,B} ± 2,15
8	63,39 ^{d,A} ± 2,20	69,37 ^{d,B} ± 2,70

Objaśnienia jak pod Tab. 2 / Explanatory notes as in Tab. 2.

Zarówno kielki rosnące z dostępem promieniowania słonecznego, jak i w ciemności, w pierwszych trzech dobach prowadzenia eksperymentu były zwarte i jędrne. W ciągu 7. i 8. doby obserwowano stopniowe zmniejszanie ich jędrności. Wprawdzie już w czwartym dniu wzrostu kielki koniczyny były akceptowane pod względem cech sensorycznych, jednak były one jeszcze stosunkowo niewielkie (ich długość wynosiła 2 - 2,5 cm). Nie miały także w pełni ukształtowanego, intensywnego, charakterystycznego smaku i zapachu oraz wyrazistej smakowości. Kielki uzyskały te cechy dopiero w piątej dobie wzrostu. Ponadto najsilniejszą aktywność przeciwutleniającą osiągnęły kielki w piątej oraz szóstej dobie wzrostu. Zatem był to optymalny czas ich zbioru.



Rys. 3. Zmiany właściwości sensorycznych kiełków koniczyny czerwonej rosnących z dostępem rozproszonego promieniowania słonecznego oraz bez jego dostępu.

Fig. 3. Changes in sensory properties of red clover sprouts germinating in the presence and in the absence of diffuse solar radiation.

Wnioski

1. Dostęp do rozproszonego promieniowania słonecznego podczas kiełkowania nasion koniczyny czerwonej korzystnie wpływa na zawartość w nich kwasu L-askorbinowego, związków polifenolowych, aktywność przeciwutleniającą oraz walory sensoryczne uzyskanych kiełków.
2. Ze względu na walory sensoryczne oraz potencjał przeciwutleniający najkorzystniejszym terminem zbioru kiełków jest 5. i 6. doba ich wzrostu.

3. Z uwagi na wymienione właściwości kiełki nasion koniczyny czerwonej mogą być cennym składnikiem pożywienia oraz atrakcyjnym dodatkiem do wielu dań.
4. Wyniki dotyczące zawartości związków o charakterze przeciwutleniającym w kiełkach koniczyny czerwonej wymagają dalszych, szczegółowych weryfikacji, co pozwoli na określenie wpływu oznaczanych związków na zmiany aktywności przeciwutleniającej badanych kiełków

Literatura

- [1] Augustyniak A., Skrzydlewska E.: Zdolności antyoksydacyjne w starzejącym się organizmie. *Post.Hig. Med. Dośw.*, 2004, **58**, 194-201.
- [2] Booth N.L., Overk C.R., Yao P., Totura S., Deng Y., Hedayat A.S., Bolton J.L., Pauli G.F., Farnsworth R.: Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*) isoflavones and estrogenic activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 1277-1282.
- [3] Burguieres E., Mccue P., Kwon Y.I., Shetty K.: Effect of vitamin C and folic acid on seed vigour response and phenolic-linked antioxidant activity. *Bioresource Technol.*, 2007, **98**, 1393-1404.
- [4] Fernandez-Orozco R., Frias J., Zielinski H., Piskula M.K., Kozłowska H., Vidal-Valverde C.: Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vignaradiata* cv. emerald, *Glycine max* cv. and *Glycine max* cv. merit. *Food Chem.*, 2008, **111**, 622-630.
- [5] Gosh D.: Germination and dormancy of seeds. *Competition Science Vision*, 2006, **9 (11)**, 1225.
- [6] Grajek W.: Rola przeciwutleniaczy w zmniejszeniu ryzyka wystąpienia nowotworów i chorób układu krążenia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **1 (38)**, 3-11.
- [7] Heldt H.W.: *Plant Biochemistry*. Ed. by Elsevier Academic Press. Amsterdam 2005.
- [8] Jung K., Richter J., Kabrodt K., Lücke I.M., Schellenberg I., Herrling T.: The antioxidative power AP – A new quantitative time dependent (2D) parameter for the determination of the antioxidant capacity and reactivity of different plants. *Spectrochim. Acta A*, 2006, **63**, 846-850.
- [9] Kalisz S., Kurowska M.: Zmiany zawartości związków fenolowych i witaminy C w sokach i półkoncentratkach truskawkowych podczas ich przechowywania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **2 (43) Supl.**, 62-71.
- [10] Khattak A.B., Zeb A., Khan M., Bibi N., Ihsanullah, Khattak M.S.: Influence of germination techniques on sprout yield, biosynthesis of ascorbic acid and cooking ability, in chickpea (*Cicerarietinum* L.). *Food Chem.*, 2007, **103**, 115-120.
- [11] Kim E.H., Kim S.H., Chung J.I., Chi H.Y., Kim J.A., Chung I.M.: Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) *Merill*) and sprouts grown under different conditions. *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, **222**, 201-208.
- [12] Kołodziej B., Drożdżal K.: Właściwości przeciwutleniające kwiatów i owoców bzu czarnego pozyskanego ze stanu naturalnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **4 (77)**, 36-44.
- [13] Lewicki P.: Kiełki nasion jako źródło cennych składników odżywczych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **6 (73)**, 18-33.
- [14] López-Cervantes J., Tirado-Noriega L.G., Sanchez-Machado D.I., Campas-Baypoli O.N., Cantu-Soto E.U., Nunez-Gastelum J.A.: Biochemical composition of broccoli seeds and sprouts at different stages of seedling development. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2013, **48**, 2267-2275.
- [15] Maćkowiak K., Torliński L.: Współczesne poglądy na rolę witaminy C w fizjologii i patologii człowieka. *Nowiny Lekarskie*, 2007, **76 (4)**, 349-356.
- [16] Michalczyk M.: Wpływ warunków przechowywania na jakość wybranych dostępnych w obrocie handlowym, mało przetworzonych produktów warzywnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **3 (58)**, 96-107.

- [17] Michalczyk M., Kowalińska J.: Zanieczyszczenie mikrobiologiczne kiełkowanych nasion dostępnych w handlu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **3 (64)**, 32-69.
- [18] Mwikya S.M., Camp J.V., Rodriguez R., Huyghebaert A.: Effects of sprouting on nutrient and antinutrient composition of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var *Rose coco*). *Eur. Food Res. Technol.*, 2001, **212**, 188-191.
- [19] Park J.H., Jeong H.J., De Lumen B.O.: Contents and bioactivities of lunasin, Bowman-Birk inhibitor, and isoflavones in soybean seed. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 7686-7690.
- [20] Piesiewicz H., Mielczar M.: Kielki w żywieniu człowieka. *Przegl. Piek. Cuk.*, 2001, **3**, 10-14.
- [21] PN-90/A-75101/03. Oznaczanie zawartości suchej masy metodą wagową.
- [22] PN-ISO 4121:1998 Analiza sensoryczna. Metodologia. Ocena produktów żywnościowych przy użyciu metod skalowania.
- [23] Ramos G.P., Dias P.M., Morais C.B., Froehlich P.E., Dall'Agnol M., Zuanazzi J.A.: LC determination of four isoflavone aglycones in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Chromatographia*, 2008, **67 (1-2)**, 125-129.
- [24] Rutkowski M., Matuszewski T., Kędziora J., Paradowski M., Kłos K., Zakrzewski A.: Witaminy E, A i C jako antyoksydanty. *Pol. Merk. Lek.*, 2010, **29**, 377-381.
- [25] Sierżant K., Pyrkosz-Biardzka K., Gabrielska J.: Właściwości przeciwutleniające naturalnych ekstraktów polifenolowych z wybranych roślin w układach modelowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **6 (85)**, 41-53.
- [26] Singleton V.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, **16**, 144-158.
- [27] Sun-Joo L., Jung-Kuk A., Tran-Dang K., Se-Cheol Ch., Sun-Lim K., Hee-Myong R., Hong-Keun S., Ill-Min Ch.: Comparison of isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) sprouts grown under two different light conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 9415-9421.
- [28] Surh J., Kim M.J., Koh E., Kim Y-K. L., Kwon H.: Estimated intakes of isoflavones and coumestrol in Korean population. *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, 2006, **57(5/6)**, 325-344.
- [29] Świeca M., Gawlik-Dziki U., Dziki D., Baraniak B.: Kielki brokuła jako źródło potencjalnie bio-przyswajalnych antyoksydantów. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2012, **(45) 3**, 488-493.
- [30] Świeca M., Gawlik-Dziki U., Kowalczyk D., Złotek U.: Impact of germination time and type of illumination on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of *Lens culinaris* sprouts. *Sci. Hort.*, 2012, **140**, 87-95.
- [31] Thompson C.J., Pitter M.H., Ernst E.: *Trifolium pratense* isoflavones in the treatment of menopausal hot flashes. *Phytomedicine*, 2007, **14**, 153-159.
- [32] Yen G.C., Chen H.Y.: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 27-32.
- [33] Zieliński H., Frasz J., Piskula M. A., Kozłowska H.: Witamin B₁ and B₂, dietary fiber and minerals content of *Cruciferae* sprouts. *Eur. Food Res. Technol.*, 2005, **221**, 78-83.

EFFECT OF DIFFUSE SOLAR RADIATION ON SELECTED PROPERTIES OF RED COVER SPROUTS (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)

Summary

So far, red clover sprouts have been underestimated in spite of their dietary and pro-health values. The objective of the study was to determine the effect of diffuse solar radiation on the content of L-ascorbic acid and polyphenolic compounds in the germinating red clover sprouts as well as on their antioxidant activity and sensory properties. During a period of 8 days, the sprouts germinated in an automatic sprouter

with monitored microclimate parameters, in the presence and in the absence of the diffuse solar radiation. It was found that the diffuse solar radiation had a positive effect on the content of the compounds analyzed as well as on the antioxidant properties of the sprouts. Considering the sensory qualities and antioxidant potential of the sprouts, the 5th and 6th day of sprout germination was deemed to be the most beneficial for harvesting them. On those two days, the content of polyphenolic compounds in the sprouts grown in the presence of diffuse solar radiation was 2051 mg/100 g d.m, the content of L-ascorbic acid 115 mg KA/100g d.m, and the IC₅₀ coefficient 37 mg / ml. The sprouts germinating in the presence of solar radiation were characterized by a fresh, cucumber and pea fragrance, firm texture, and light green colour. It was proved that the red clover sprouts could be a valuable component of food and an appealing addition to many dishes.

Key words: red clover sprouts, polyphenols, L-ascorbic acid, antioxidant activity, DPPH 