

WPŁYW MIKRONIZACJI NA AKTYWNOŚĆ NEUROTOKSYN ŁĘDŹWIANU SIEWNEGO OZNACZANYCH Z ZASTOSOWANIEM METODY WSKAŹNIKA PURPURY BROMOKREZOŁOWEJ (BCPI)

Streszczenie

Zbadano wpływ promieniowania mikrofalowego na aktywność neurotoksyny lędźwianu siewnego oznaczanej jako kwas β -N-oxalyl-L- α - β -diaminopropionowy - BOAA). Zweryfikowano hipotezę wskazującą na możliwość zastosowania wskaźnika purpury bromokrezolowej (BCPI) jako sposobu oceny aktywności tej neurotoksyny. Próby lędźwianu siewnego odmiany Krab (o masie 50g), które zastosowano w badaniach, przygotowano każdorazowo poprzez naświetlenie nie rozdrobionych nasion w komorze roboczej kuchenki mikrofalowej. Zastosowano dziesięć wariantów intensywności ogrzewania, w których każdemu z trzech poziomów mocy promieniowania /350, 500 lub 650 W/ odpowiadały trzy czasy ogrzewania /60, 120 lub 180 s/, zaś jedną z prób pozostawiono bez obróbki termicznej.

Duża współzależność wyników uzyskanych metodami BCPI i BOAA (współczynnik korelacji $r = 0,89$), oraz wysokie współczynniki dopasowania (R^2) równań regresji $BOAA = f(BCPI)$ do danych doświadczalnych wskazują na znaczącą wiarygodność operacji wzajemnego przeliczania wyników uzyskanych tymi metodami dla mikronizowanych nasion lędźwianu siewnego.

Słowa kluczowe : lędźwian siewny, neurotoksyna, wskaźnik purpury bromokrezolowej, równanie regresji

Wstęp

Aktywność neurotoksyny BOAA (kwasu β -N-oxalyl-L- α - β -diaminopropionowego) stanowi jeden z ważniejszych czynników przeciżywnościowych ograniczających wykorzystanie nasion lędźwianu siewnego jako składnika pożywienia lub paszy. Skutecznym sposobem wyeliminowania lub ograniczenia oddziaływania tej neurotoksyny na organizm konsumenta są różne formy i sposoby ogrzewania nasion, które ponadto przyczyniają się do istotnego wzrostu przyswajalności składników pokarmowych oraz poprawy reologicznych właściwości produktu [Grela i wsp. 1997]. Dlatego linie technologiczne mikrofalowego ogrzewania, łącząc w sobie niewielkie wymagania techniczno-technologiczne ze skutecznością i wysoką wydajnością, mogą stanowić jedną z ważniejszych, przemysłowych form obróbki termicznej nasion lędźwianu siewnego.

Proces mikronizacji prowadzony w praktyce produkcyjnej przemysłowego przetwórstwa nasion, podlega często zakłóceniom pozostającym poza kontrolą personelu obsługującego linię, co przyczynia się do zaburzenia parametrów procesu produkcyjnego i może skutkować obniżeniem wartości odżywczej uzyskiwanych produktów. Dlatego utrzymanie odpowiedniej jakości przetworów otrzymywanych z nasion lędźwianu siewnego wymaga właściwego doboru intensywności ogrzewania, który powinien być wspomagany odpowiednim systemem kontroli jakości uzyskiwanych produktów. Wykorzystanie w tym celu dotychczas stosowanych metod, których działanie oparte jest najczęściej na określeniu aktywności wybranych czynników przeciżywnościowych (tj. np. neurotoksycznego – BOAA), z powodu dużej komplikacji procedury analitycznej oraz znacznej czasochłonności, napotyka na duże trudności [Briggs i wsp. 1983].

Cel badań

Celem podjętych badań było sprawdzenie przydatności wskaźnika purpury bromokrezolowej (BCPI), jako nowego sposobu oceny dezaktywacji neurotoksyny (BOAA) w mikronizowanych nasionach lędźwianu siewnego.

Materiały i metody

Do badań przygotowano nasiona lędźwianu siewnego odmiany Krab. Masa tysiąca nasion (MTN) wynosiła 180,40 g.

Odpowiada to grupie średnionasiennej zgodnie z powszechnie przyjętym zaszeregowaniem tych nasion [Dziamba 1997]. Część nasion wyodrębniono i pozostawiono bez obróbki termicznej nazywając je surowymi.

Próby surowych nasion zawierały (średnio) 87,91% suchej masy, oraz (w przeliczeniu na nią) 26,90% białka ogólnego i 1,32% tłuszczu surowego. Masę tysiąca nasion, zawartość białka ogólnego, tłuszczu surowego oraz suchą masę oznaczono zgodnie z zalecanymi w Polsce normami, przeprowadzając dla każdego z tych badań trzy niezależne powtórzenia.

Pozostałe nasiona podzielono na 9 prób o masie 50g każda, przeniesiono do szklanych menzurek o objętości 250 mL, aby następnie (oddzielnie, każdą z nich) umieścić w środku geometrycznym komory roboczej kuchenki mikrofalowej Whirpool – Vip 20 i poddać mikronizacji promieniowaniem elektromagnetycznym o częstotliwości 2450 (± 50) MHz w warunkach jednego z dziewięciu wariantów intensywności ogrzewania, w których każdemu z trzech poziomów mocy promieniowania (350, 500 lub 650 W) odpowiadają trzy czasy obróbki termicznej (60, 120 lub 180 s). Dla każdej z tych prób przeprowadzono (w trzech niezależnych powtórzeniach) badania: aktywności neurotoksyny (BOAA) [Briggs i wsp. 1983], oraz wskaźnika purpury bromokrezolowej (BCPI) [Szmigielski 2004]. Wyniki analiz opracowano statystycznie obliczając współczynniki korelacji pomiędzy badanymi cechami (ocena współzależności metod BOAA i BCPI). Algorytm umożliwiający wzajemne przeliczenie wyników (regresja $BOAA = f(BCPI)$) opracowano wykorzystując oprogramowanie komputerowe Microsoft Graph. Weryfikację poprawności tego równania dokonano metodą najmniejszych kwadratów uzyskując współczynnik determinacji (dopasowania - R^2).

Wyniki i dyskusja

Aktywność neurotoksyn w surowych nasionach lędźwianu siewnego (polskiej odmiany Krab tabela 1) kształtowała się na stosunkowo niskim poziomie (2,59 mg/g_{s.m.} – tj. ok. 0,26%) i była zbliżona do wyników uzyskanych przez Briggs'a i wsp. (0,64 - 2,01 mg/g_{s.m.} tj. ok. 0,064 – 0,20%) (1983) oraz Desphande'a i Campbell'a (średnio 2,95 mg/g tj. ok. 0,30%) (1992), dla odmian uprawianych w Kanadzie, a także Greli i wsp. (1997) w badaniu drobnonasiennej, polskiej odmiany o nieznanym nazwie (0,90 mg/g_{s.m.} tj. 0,09%).

Tab. 1. Aktywność neurotoksyn (BOAA)[mg/g_{s.m.}] mikronizowanych prób nasion lędźwianu siewnego odmiany Krab

Table 1. Neurotoxin activity (BOAA) (mg/g DM) in samples of everlasting pea seeds

Rodzaj obróbki termicznej	Parametry obróbki termicznej			
	Moc promieniowania [W]	Czas obróbki termicznej [s]		
Mikronizacja		60	120	180
	350	2,15 ± 0,25 (11,63)	1,41 ± 0,23 (16,31)	1,20 ± 0,12 (10,00)
	500	1,86 ± 0,28 (15,05)	1,20 ± 0,19 (15,83)	0,82 ± 0,23 (28,05)
	650	1,52 ± 0,31 (20,39)	0,97 ± 0,15 (15,46)	0,75 ± 0,24 (32,00)
Kontrola	2,59 ± 0,16 (6,18)			

W nawiasach - (), zamieszczono współczynniki zmienności uzyskanych wyników [% średniej]

Na tak niski poziom aktywności neurotoksyn w nasionach lędźwianu siewnego odmiany Krab wpłynęła zapewne jej właściwa selekcja na etapie hodowli, a także prawdopodobnie, czynniki klimatyczne i agrotechniczne w czasie wegetacji roślin oraz dojrzewania nasion.

Wyniki, dotyczące aktywności neurotoksyn w surowych nasionach lędźwianu siewnego pochodzących z upraw w strefie klimatu umiarkowanego, są średnio co najmniej dwukrotnie mniejsze w porównaniu do najwyższego rejestrowanego poziomu tego czynnika przeciwżywniowego w światowej populacji (np. 5,89 mg/g_{s.m.} dla niektórych odmian syryjskich - Aletor i wsp. 1994). Należy zauważyć, że kliniczne objawy chorobowe zwane latoryzmem powoduje monotonna dieta, zawierająca w głównej mierze produkty żywnościowe, o zawartości BOAA szacowanej na co najmniej 0,1% (Roy i Narasinga Rao 1968 - za Quereshi i wsp. 1977).

Mikronizacja prób spowodowała obniżenie aktywności neurotoksyn, tym skuteczniejsze im większa była intensywność ogrzewania nasion (tabela 1). Przy czym wariant o największej intensywności obróbki termicznej (650W przez 180s) spowodował największy, 71% spadek aktywności BOAA, co wskazuje na dużą skuteczność obróbki mikrofalowej w porównaniu do ekstruzji (spadek aktywności neurotoksycznej o ok. 36% - Grela i wsp. 1997) lub autoklawowania (spadek aktywności neurotoksycznej o ok. 55% na skutek 120 minutowej obróbki termicznej w temperaturze 121°C - Rotter i wsp. 1990).

Należy jednak zauważyć, że wraz z obniżeniem poziomu neurotoksyczności prób wywołanym wzrastającą intensywnością ogrzewania nasion i spadkiem wartości mierzonej, obniżeniu ulega precyzja oznaczeń wykonanych metodą BOAA, co uwidacznia się poprzez zwiększenie współczynnika zmienności pomiarów (od 6,18% dla oznaczeń dotyczących próby surowej do 32% w badaniu prób o maksymalnej intensywności obróbki termicznej - tabela 1).

Tabela 2. Wskaźnik purpury bromokrezolowej (BCPI) mikronizowanych prób nasion łądzwianu siewnego odmiany Krab [mg/g_{białka w s.m.}]

Table 2. Bromocresol purple index (BCPI) of micronized everlasting pea seed samples (mg/g protein in DM)

Rodzaj obróbki termicznej	Parametry obróbki termicznej			
	Moc promieniowania [W]	Czas obróbki termicznej [s]		
			60	120
Mikronizacja	350	51,19 ± 8,25 (16,12)	60,93 ± 8,29 (13,61)	68,76 ± 4,28 (6,22)
	500	77,57 ± 12,01 (15,48)	92,79 ± 11,19 (12,06)	101,39 ± 19,58 (19,31)
	650	88,44 ± 12,86 (14,54)	97,27 ± 10,21 (10,50)	116,80 ± 15,04 (12,88)
Kontrola		48,93 ± 3,16 (6,46)		

W nawiasach - (), zamieszczono współczynniki zmienności uzyskanych wyników [% średniej]

Mikronizacja nasion łądzwianu siewnego spowodowała zwiększenie wartości BCPI w miarę wzrostu intensywności ogrzewania nasion, przy czym, w odróżnieniu od oznaczeń wykonanych metodą BOAA, wyniki charakteryzują się zbliżoną, stosunkowo wysoką precyzją (współczynniki zmienności, zarówno w odniesieniu do próby surowej, jak i prób intensywnie ogrzewanych, kształtują się na podobnym, poziomie, nie przekraczając 20% – tabela 2).

Wysoki współczynnik korelacji pomiędzy danymi doświadczalnymi (uzyskanymi poprzez zastosowanie metod BCPI i BOAA) wskazuje na dużą ich współzależność (tab. 1), oraz uzasadnia wzajemne przeliczanie wyników tych analiz.

Podobne wyniki (tj. wysokie współczynniki korelacji pomiędzy BCPI oraz innymi metodami analitycznymi) uzyskali również: Szmigielski [2004], Szmigielski [2002], Szmigielski i Matyka [2002] oraz Szmigielski i Matyka [2004], w badaniach aktywności antytrypsynowej (TIA), współczynnika dyspersji białka (PDI) i wskaźnika czerwieni krezolowej dla nasion soi fasoli i łądzwianu siewnego.

Hipotetyczne równania regresji (tabela 3) charakteryzują się wysokimi współczynnikami determinacji (zbliżonymi do 80% – tabela 3) co wskazuje na dużą wiarygodność operacji wzajemnego przeliczania wyników uzyskanych metodami BCPI i BOAA. Umożliwia to zastąpienie pracochłonnej i czasochłonnej metody BOAA przez prosty i zarazem szybki test BCPI

Tab. 3. Aktywność neurotoksyny BOAA w funkcji wskaźnika purpury bromokrezolowej BCPI (dla mikronizowanych nasion łądzwianu siewnego odmiany Krab)
 Table 3. Neurotoxin activity BOAA in function of bromocresol purple index BCPI got micronized seeds of everlasting pea, Krab cultivar

Zmienna zależna	Zmienna niezależna	Współczynnik korelacji (r)	Typ równania	Postać równania	Współczynnik determinacji (R ²) [%]
BOAA	BCPI	0,89	Logarytmiczne	$BOAA = -0,7352\ln(BCPI) + 2,56$	81,52
			Wykładnicze	$BOAA = 2,6132e^{-0,1211(BCPI)}$	81,11
			Wielomiane	$BOAA = 0,0109(BCPI)^2 - 0,2922(BCPI) + 2,63$	78,24
			Potęgowe	$BOAA = 2,7978(BCPI)^{-0,486}$	76,62
			Linijowe	$BOAA = -0,1722(BCPI) + 2,39$	76,28

Bibliografia

Aletor V.A., El-Moneim A.A., Goodchild A.V., 1994: Evaluation of the seeds of selected lines of three *Lathyrus* spp β - N – Oxalylamino – L – alanine (BOAA), tannins, trypsin inhibitor activity and certain in – vitro characteristics. *J. Sci. Food Agric.* 65, 143-151.

Briggs C. J., Parreno N., Campbell C. G., 1983: Phytochemical assessment of *Lathyrus* species for the neurotoxic agent β -N-oxalyl-L- α β diaminopropionic acid. *Planta Med.* 47, 188-190.

Desphande S.S., Campbell C.G., 1992: Genotype variation in BOAA, condensed tannins, phenolics and enzyme inhibitors of grass pea (*Lathyrus sativus*). *Can. J. Plant Sci.*, 72, 1037-1047

Dziamba Sz. 1997: Biologia i agrotechnika łądzwianu siewnego. *Mat.Konf. Międzynarodowego Sympozjum Naukowego: Lublin-Radom 9 - 10.06.1997- Lathyrus sativus - cultivation and nutritive value in animals and humans.* 27-33.

Grela E. R., Truchliński J., Rzedzicki Z., Pallauf J., Winiarska A., 1997: Wpływ ekstruzji na zawartość czynników przeciwżywniowych w nasionach łądzwianu siewnego. *Mat.Konf. Międzynarodowego Sympozjum Naukowego Lublin-Radom 9 - 10.06.1997: Lathyrus sativus - cultivation and nutritive value in animals and humans.* 80-85.

Rotter R.G., Marquardt R.R., Low R.K-C., Briggs C.J., 1990: Influence of autoclaving on the effects of *Lathyrus sativus* fed to chicks. *Can. J. Anim. Sci.*, 70, 739-741.

Szmigielski M., 2002: Zastosowanie wybranych metod analitycznych do oceny skuteczności obróbki termicznej nasion soi. *Biul. Nauk. Przem. Pasz*, 41(1/4), 81-97.

Szmigielski M., 2004: Bromocresole Purple Index in estimating the influence of microwave processing on trypsin inhibitor activity of soybeans. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 13/54(1), 33-37.

Szmigielski M., Matyka S., 2002: Porównanie wybranych testów stosowanych do oceny skuteczności obróbki termicznej nasion fasoli. *Inż. Rol.*, 37(4), 323-330.

Szmigielski M., Matyka S., 2004: Comparison of selected methods applied for the evaluation of thermal processing efficiency of chickling vetch seed. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 13/54(3), 243-248.

Quereshi M. Y., Pilbeam D. J., Evans C.S., Bell E. A., 1977: The neurotoxin, α - amino - β - oxalylaminopropionic acid in legume seeds. *Phytochemistry*, 16, 477- 479.

EFFECT OF MICRONIZATION ON THE ACTIVITY OF EVERLASTING PEA NEUROTOXIN DETERMINED BY USING OF BROMOCRESOL PURPLE INDEX (BCPI)

Summary

Effect of microwave radiation on the activity of ever-lasting pea (*Lathyrus latifolius*) neurotoxin, designated as β -N-oxalyl-L α - β diaminopropionic acid (BOAA), was studied. A hypothesis suggesting the possibility of using bromocresol purple index (BCPI) as a method to evaluate the activity of this toxin was verified. Samples of the everlasting pea, Krab cultivar, 50 g in weight, used in tests were prepared each time by irradiation of whole seeds inside a chamber of microwave oven. Ten variants of heating intensity were applied: at each of three radiation power levels (350, 500, 650 W), three times of heating were used (60, 120, 180 s), whereas one sample left without any heat treatment. Strong interrelation of the results obtained by BCPI and BOAA methods (correlation coefficient $r=0.89$) as well as high matching coefficients (R^2) and regression equations $BOAA=f(BCPI)$ to experimental data, showed a significant reliability of methods for micronized everlasting pea seeds.

Key words: everlasting pea, neurotoxin, bromocresol purple index, regression equation

Recenzent-Barbara Klocek