**1 PRIEDAS**

**ABIOTINIO STRESO ĮTAKA MAISTUI DAIGINAMŲ LĘŠIŲ CHEMINEI SUDĖČIAI**

**Mantvilė KANDARAITĖ**

**Vadovė doc. dr. Živilė Tarasevičienė**

*Aleksandro Stulginskio universitetas, Agronomijos fakultetas, Žemės ūkio ir maisto mokslų institutas, el. paštas: zummi@asu.lt*

**Įvadas**

Pupinių augalų, sėklos ─ vienas iš svarbesnių maisto šaltinių pasaulyje (Prodanov ir kt.1998). Daigintos sėklos žmonių maistui nuo seno buvo paplitę Rytų šalyse (Kordušienė, 2010).

Populiariausios yra spindulinės pupuolės. Taip pat, populiarėja daiginami įvairūs lęšiai ir kt. Pupinių augalų daigintos sėklos itin švelnaus skonio, primenančios sunokusius žalius daržo žirnelius. Šios baltymingos sėklos, labai tinka papildyti vegetariškai besimaitinančių žmonių mitybą (Danilčenko, Jarienė, 2005). Jų suvartojimas pastaraisiais metais didėja, kadangi jų sudėtyje gausu bioaktyvių junginių ir antioksidantų. Taip pat daiginant pupinių augalų sėklas keičiasi jų cheminė sudėtis, baltymų kokybė, todėl organizmas gali lengviau juos pasisavinti (Tarzi ir kt, 2012). Daiguose yra nemaži kiekiai mineralinių medžiagių (kalcio, geležies, sieros, magnio, kalio, cinko ir kt.) ir įvairių vitaminų (B, C, E, H, K, PP). Nustatyta, kad vitamino C nedaigintose sėklose paprastai nebūna arba randama nedideliais kiekiais, tačiau prasidėjus dygimo procesui, vitamino C kiekis padidėja (Danilčenko, Jarienė, 2005). Fenoliniai junginiai ir flavonoidai svarbūs daugelio vaisių ir daržovių komponentai. Aplinkos veiksniai, kurie apsunkina augalų augimą ar ląstelių medžiagų apykaitos procesus – vadinami stresoriais. Jie gali būti abiotiniai (UV spinduliuotė, temperatūra, druskingumas ir kt.) ir biotiniai (augalai, gyvūnai, mikroorganizmai). Įvairūs abiotinio streso veiksniai gali lemti antrinių metabolitų, tokių polifenoliai, taip pat kitų junginių pasižyminčių antioksidacinėmis ir antimikrobinėmis savybėmis, sintezę (Ramakrishna ir Ravishankar, 2011).

***Tyrimo tikslas*** *–* nustatyti abiotinio streso įtaką maistui daigintų lęšių cheminės sudėties pokyčiams.

**Tyrimo metodai ir sąlygos**

Tyrimai atlikti 2016 – 2017 metais Aleksandro Stulginskio universiteto Maisto žaliavų, agronominių ir zootechninių tyrimų ir Agronomijos fakulteto Žemės ūkio ir maisto mokslų instituto Augalinių žaliavų kokybės tyrimų laboratorijoje.

Tyrimo objektas – maistui daigintos valgomųjų lęšių (*Lens culinaris* L.*)* sėklos.

Sėklos daigintos lenkų firmos „Bionature“, ø 20 cm 1 litro talpos daigintuvuose. Prieš eksperimento pradžią daigintuvai dezinfekuoti 70 % etilo spiritu.

Daiginimui imta po 100 g sėklų. Bandymas atliktas 3 pakartojimais. Sėklos daigintos 120 val. tamsoje 22 oC temperatūroje, vėdinamoje patalpoje. Tyrimo pradžioje sėklos buvo kruopščiai atrinktos, pašalintos suskaldytos, pažeistos bei turinčios nebūdingą spalvą ar su priemaišomis. Po to sėklos mirkytos 12 val. keturis kartus didesniame vandens kiekyje nei pačių sėklų tūris (santykis 1:4).

Sėklos daigintos 5 paras (120 valandas) – periodiškai kas 12 val drėkintos geriamu vandeniu. Po dviejų daiginimo parų sėkloms sudarytos abiotinio streso sąlygos: **temperatūrinis stresas** - dvi valandas sėklos laikytos 35  oC; 40 oC; 45 oC temperatūroje; **osmosinis stresas** - sėklos 24 valandas drėkintos 50 mM, 100 mM, 150 mM NaCl tirpalu; **oksidacinis stresas** - sėklos 24 valandas drėkintos 100 mM, 150 mM, 200 mM H2O2 (H2O2) tirpalu. Po to, grįžtama prie įprastinės daiginimo technologijos.

Penkias paras daigintose lęšių sėklose nustatyti šie cheminės sudėties rodikliai:

* sausųjų medžiagų kiekis (%) – (LST ISO 751:2000);
* baltymų kiekis (%) – Kjeldalio metodu (LST 1532:1998).
* vitamino C kiekis – mg 100 g-1( LST ISO 6557 – 2:2000);
* Flavonoidų kiekis spektrofotometriniu metodu, pagal Zhishen ir kt. (1999) .

Duomenų matematiniam – statistiniam įvertinimui atlikta vieno veiksnio dispersinė analizė (ANOVA). Skirtumų tarp vidurkių statistinis patikimumas įvertintas naudojant Fišerio LSD testą (p<0,05). Duomenys statistiškai apdoroti naudojantis programa STATISTICA 10.

**Tyrimų rezultatai ir jų analizė**

Lęšiai (*Lens culinaris* L.*)* yra vieni iš seniausiai Viduržemio jūros regione, naudojamų žmogaus mitybai produktų (Scippa ir kt, 2010).Sėklos yra puikus baltymų ir geležies šaltinis vegetarams, taip pat jose gausu virškinimui naudingų skaidulų. Daigintuose lęšiuose yra daug aminorūgščių, lengvai virškinamų baltymų, vitamino B (Danilčenko, Jarienė, 2005).

Pasak, Chavan ir Kadam (1989) maistinės vertės padidėjimas daigintose sėklose lydimas sausųjų medžiagų netekties. Sausųjų medžiagų netektis daiginamose sėklose susidaro dėl krakmolo ir sacharidų oksidacijos kvėpavimo proceso metu (Chavan, Kadam, 1989).Abiotinio streso įtaka sausųjų medžiagų kiekiui penkias paras daigintose lęšių sėklose pateikta 1 pav.

**1 pav**. Sausųjų medžiagų kiekis maistui daigintose lęšių sėklose (2018 m. Aleksandro Stulginskio universitetas)

*Fig. 1. The amount of dry matter in seeds for food (2018 Aleksandras Stulginskis University)*

 Esmingai didžiausias sausųjų medžiagų kiekis buvo nustatytas stresinių sąlygų nepaveiktose ir daiginimo metu 40 °C temperatūroje 2 valandas išlaikytose sėklose, atitinkamai 24,4 ir 24,7 % (1 pav.). Sausųjų medžiagų kiekio tyrimo rezultatai rodo, kad esmingai mažiausias šių medžiagų kiekis buvo 100 mm H2O2 tirpalu apdorotuose daigintuose lęšiuose (21,4 %), tačiau minėtų medžiagų kiekis esmingai didėjo, drėkinimui naudojant didesnės koncentracijos tirpalą. Eksperimento metu nustatyta, kad sausųjų medžiagų kiekį daigintose sėklose lemia skirtingi stresoriai. Daigintuose lęšiuose nustatytas baltymų kiekis pateiktas 2 pav.

**2 pav**. Baltymų kiekis maistui daigintose lęšių sėklose (2018 m. Aleksandro Stulginskio universitetas)

*Fig. 2. The amount of crude proteins in germinated seeds for food (2018 Aleksandras Stulginskis University)*

Sudarytas osmosinis stresas esmingai įtakojo baltymų kiekį daigintuose lęšiuose. Panaudotas 100 mM NaCl tirpalas esmingai didino baltymų kiekį juose. Šių medžiagų skirtumas 100 mM NaCl tirpalu apdorotuose ir stresorių nepaveiktuose lęšiuose sudarė 2,4 %. Kiti abiotiniai stresoriai esminės įtakos baltymų kiekiui daigintuose lęšiuose neturėjo. Baltymų kiekio padidėjimas gali būti siejamas su naujų baltymų sinteze sudygus sėkloms ir dėl cheminės sudėties pokyčių po kitų junginių sudedamųjų dalių skilimo (Bau ir kt., 1997). Taip pat baltymų kiekio padidėjimui įtakos gali turėti skirtingi stresoriai. Tyrėjai nurodo, kad baltymų kiekis sudaigintose sėklose didesnis, nei nedaiginose (Dogra ir kt., 2001; Sood ir kt., 2002; Urbano ir kt., 2005). Kiti autoriai nustatė sėklų daiginimo proceso metu baltymų kiekio mažėjimą (Kingas ir Puwastien, 1987; Torres ir kt., 2007). Baltymų kiekis daigintose sėklose priklauso ne tik nuo veislės, bet ir nuo daiginimo sąlygų (Dagnia ir kt., 1992; Urbano ir kt., 2005; Torres ir kt., 2007).

Puikus askorbo rūgšties šaltinis yra vaisiai ir daržovės, tačiau dėl sezoniškumo, nuostolių saugojimo, paruošimo ir apdorojimo metu jos kiekis maiste iš dalies ribotas (Loewus ir kt., 1987). Todėl daiginimas gali būti puikus sėklų perdirbimo būdas, užtikrinantis didelį vitamino C kiekį žaliavose. Nedaigintose sėklose vitamino C kiekiai yra labai maži, tačiau ženkliai padidėja daiginimo metu (Khattak ir kt. 2007). Abiotinio streso įtaka vitamino C sintezei lęšių sėklose pateikta 3 pav.

**3 pav.** Vitamino C kiekis maistui daigintose lęšių sėklose (2018 m. Aleksandro Stulginskio universitetas)

*Fig. 3. The amount of vitamin C in germinated seeds for food (2018 Aleksandras Stulginskis University)*

Vitaminas C dalyvauja angliavandenių bei baltymų apykaitoje, didina organizmo atsparumą įvairioms infekcinėms ligoms. Kai organizmas vitamino C gauna pakankamai mažėja kraujagyslių sienelių pralaidumas, lengviau pasisavinama geležis (Danilčenko, Jarienė, 2005).

Mūsų eksperimentas parodė, kad esmingai didžiausias vitamino C kiekis buvo sukauptas maistui daigintose lęšių sėklose, kurioms buvo sudarytas stresas150 H2O2 koncentracijos tirpalu – 16,67 mg100g-1. Mažiausias jo kiekis buvo, kai pasirinkta didžiausia šio tirpalo koncentracija (6,73 mg 100g-1). Skirtingas askorbo rūgšties kiekis pupinių augalų sėklose gali būti siejamas su brandos, klimato, apšvietimo sąlygomis, derliaus nuėmimo ir saugojimo būdais (Davey ir kt., 2000; Macrae ir kt., 1993).

Pasak, Lopez – Amoros ir kt. (2006) pastebėta, kad daigumas keičia kiekybinę ir kokybinę pupinių sėklų fenolių ir flavonoidų sudėtį, o pokyčiai priklauso nuo augalų rūšies ir daiginimo sąlygų. Šie pokyčiai daro įtaką funkcinėms pupinių augalų savybėms, kurios yra antioksidantų aktyvumo kitimo pasekmė. Abiotinio streso įtaka flavonoidų kiekiui daigintose lęšių sėklose pateikta 4 pav.

**4 pav**. Flavonoidų kiekis maistui daigintose lęšių sėklose (2018 m. Aleksandro Stulginskio universitetas)

*Fig. 4. The amount of flavonoids in germinated lentil seeds for food (2018 Aleksandras Stulginskis University)*

Esminiai didžiausias flavonoidų kiekis nustatytas didžiausios koncentracijos NaCl tirpalu laistytuose lęšiuose daiginimo metu, kuriuose lyginant su neapdorotais kontrolinio varianto lęšiais flavonoidų kiekis buvo 3,4 kartus didesnis. Daiginamus lęšius paveikus aukštesne nei optimali daiginimo temperatūra nustatyta, kad temperatūros didėjimas neigiamai veikė flavonoidų sintezę. Daiginamus lęšius palaikius 35 °C temperatūroje flavonoidų kiekis padidėjo 2,4 kartus, lyginant su jų kiekiu kontrolinio varianto lęšiuose, o temperatūrą padidinus iki 45 °C flavonoidų kiekis esmingai nesiskyrė nuo jų kiekio streso nepaveiktuose lęšiuose. Didžiausia vandenilio peroksido koncentracija teigiamai veikė flavonoidų sintezę sėklose (4 pav.).

**Išvados**

Eksperimento metu nustyta, kad optimaliausios abiotinio streso sąlygos, įvertinus visų cheminės sudėties rodiklių pasikeitimus, yra oksidacinis stresorius, nes veikiant mažiausia H2O2 tirpalo koncentracija minėtų medžiagų kiekiai nebuvo tokie dideli, bet drėkinimui naudojant didesnės koncentracijos tirpalus sausųjų medžiagų, baltymų ir flavonoidų kiekiai esmingai didėjo.

**Literatūra**

1. BAU, H. M.; VILLANME C.; NICOLOS, J. P., MEJEAN, L. 1997. Effect of germination on chemical composition, biochemical constitutes and antinutritional factors of soy bean (*Glycine* L.) seeds. *J. Sci. Food Agri.* 73(1), p. 1-9.
2. CHAVAN, J. K.; KADAM, S.S. 1989. Nutritional improvement of cereals by sprouting. *Critical Reviews in food Science and Nutrition*, vol. 28, p. 401 – 405.
3. DANILČENKO, H.; JARIENĖ, E. 2005. Sėklos, daigintos maistui. Akademija, 51 p.
4. DAGNIA, S.G.; PETTERSON, D.S.; BELL, V.; FLANAGAN, F.V. 1992. Germination alters the nutritional value of lupin seed. *J. Sci. Food. Agric*. 60 (4), p. 419–423.
5. DAVEY, M. W.; MONTAGU, M. U.; INZE, D.; SANMARTIN, M.; KANELLIS, A.; SMIRNOFF, N. 2000. Plant Lascorbic acid: chemistry, function, metabolism, Bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agri.* 80, p. 825–850*.*
6. DOGRA, J.; DHALIWAL, Y. S.; KALIA, M. 2001. Effect of soaking, germination, heating and roasting on the chemical composition and nutritional quality of Soybean and Its Utilization in Various Indian leavened products. *J. Sci. Food Technol.* 38 (5), p. 453-456.
7. KING, R. D.; PUWASTIEN, P. 1987. Effects of germination on the proximate composition and nutritional quality of Winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L*.*) seeds*. J. Sci. Food* 45(1), p. 106-108.
8. KHATTAK, A. B.; ZEB, A.; KHAN, M.; BIBI, N.; IHSANULLAH, I.; KHATTAK, M. S. 2007. Influence of germination techniques on sprout yield, biosynthesis of ascorbic acid and cooking ability, in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chem.* 103, p. 115-120.
9. KHATOON, N.; PRAKASH, J. 2006. Nutrient retention in microwave cooked germinated legumes. Food chemistry 97 (1), p. 115-121.
10. KORDUŠIENĖ, S. 2010. *Maistui daigintų sėklų džiovinimas ir šaldymo būdai bei mikrobiologinės taršos mažinimas*. daktaro disertacija: biomedicinos mokslai, agronomija (06 B). Akademija, (Kauno r.), 84 p.
11. LOEWUS, M. W.; NICK, J .A.; BEDGAR, D. L.; LOEWUS, F. A. 1987. Plant Physiol. 83 - 126 p.
12. LST ISO 751:2000. Vaisių ir daržovių gaminiai. Vandenyje netirpių sausųjų medžiagų nustatymas. Vilnius. Lietuvos standartizacijos departamentas. 3 p.
13. LST 1532:1998. Grūdai ir grūdų produktai, kombinuotieji pašarai ir jų žaliavos. Azoto kiekio nustatymas Kjeldalio metodu ir baltymų kiekio apskaičiavimas. Vilnius. Lietuvos standartizacijos departamentas, 6 p.
14. LOPEZ – AMORES, M. L.; HERMANDEZL, T.; ESTRELLA, I. 2006. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *J. Food Compos. Ana*. 19, p. 277-283.
15. PRODAVON. M; SIERR I.; VIDAL – VALVERDE C. 1998. Effect of the germination on the thiamine, riboflavin and niacin contents in legumes. *Food Res. Technol.* 205, p. 48–52.
16. RAMAKRISHNA, V.; RANI, P. J.; RAO, P. R. 2006. Anti-Nutritional factors during germination in Indian bean (*Dolichos lablab* L.) seeds*. J. Sci. Food* 1 (1), p. 6 – 1.
17. SCIPPA, G. S.; ROCCO, M.; IALICICCO, M.; TRUPIANO, D.; VISCOSI, V.; MICHELE, M. D.; ARENA, S.; CHIATANTE, D.; SCALONI, A. 2010. The proteome of lentil (*Lens culinaris* L.*)* seed: Discriminating between landraces. p. 497 – 506.
18. SOOD, M.; MALHOTRA, S. R.; SOOD, B. C. 2002. Effect of processing and cooking on proximate composition of chickpea varieties. *J. Sci. Food. Technol*. 39, p. 69–71.
19. TARZI, B. G.; GHARACHORLOO M.; BAHARINIA, M.; MORTAZAVI, S. A. T. 2012. *The Effect of Germination on Phenolic Content and Antioxidant Activity of Chickpea. p.* 1137–1143. PMCID: PMC3813166.
20. TORRES, A.; FRIAS, J.; GRANITO, M.; VIDAL – VALVERDE, C. 2007. Germinated *Cajanus cajan* seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. *Food Chem.* 101, p. 202-211.
21. URBANO, G.; JURADO, M. L.; FREJNAGEL, S.; VILLALVA, E. G.; PORRES, J. M.; FRIAS, J.; VALVERDE, V.; ARANDA, P. 2005. Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum* L.) protein and carbohyderate by *in vitro* and *in vivo* techniques. *Nutrition*. 21, p. 230-239.
22. ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals*. Food chem.* 64, p. 555- 559.

**Summary**

**CHEMICAL CONTENT OF LENTILS GERMINATED UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS**

Seed germination is one of the most effective processes for improving the quality of beans. The quality and amount of the seeds during germination changes. The most chemical content components of germinated seeds become more easily absorbed by human body. Moreover vitamins and some other compounds that can be considered useful as antioxidants are often also affected by germination. The object of the experiment is germinated edible lentils seeds (*Lens culinaris* L.). Amount of dry matter, vitamin C, crude proteins and flavonoids in the seeds were determined during the investigation. Seeds were germinated for 5 days (120 hours), periodically (every 12 hours) were watered with drinking water. After two days of germination, were made such conditions of abiotic stress:

* temperature stress - the seeds were kept at a temperature of 35°C, 40°C, 45°C for two hours;
* osmotic stress - the seeds were watered with 50 mM, 100 mM, 150 mM NaCl solution for 24 hours;
* oxidative stress - the seeds were watered with a solution of 100 mM, 150 mM, 200 mM H2O2 for 24 hours.

Thus, the highest amount of dry matter was determined in the seeds germinated without stress conditions and germinated at 40 ° C for 2 hours, 24.4 and 24.7 %, respectively. Only osmotic stress (100 mM NaCl solution) substantially affected the amount of crude proteins in germinated lentils. The difference of amount of crude proteins treated with 100 mM NaCl and in stress-free lentils was 2.4 %. Other abiotic stressors did not have a significant effect on the amount of crude proteins in germinated lentils. The highest vitamin C content was in germinated lentils exposed to stress under watering with 150 mM concentration H2O2 solution. The highest amount of flavonoids was determined in germinated lentils watered with NaCl solution of 150 mM concentration (3.4 times higher than the untreated control lentils).

**Keywords:** lentils, dry matter, crude proteins, flavonoids.