



## 1. WSTĘP

Celem tej publikacji jest zbadanie zmiany liczby wolnych rodników w pszenicy jarej odmiany Jasna poddanej wygrzewaniu w temperaturze 200°C oraz wpływu naświetlania światłem lasera He–Ne na wzrost liczby wolnych rodników w próbkach tej pszenicy zakażonych grzybami pleśniowymi. Technika obróbki termicznej ziarna zbóż prezentowana w tym artykule – nazywana prażeniem – jest zabiegiem termicznym prowadzącym do zmian w wyglądzie, smaku, zapachu i składzie chemicznym prażonego ziarna. Podczas wygrzewania w wysokiej temperaturze 200-220°C następuje modyfikacja białek, które zmieniają swe wartości odżywcze wskutek nieodwracalnych zmian, zachodzących zwłaszcza w aminokwasach: lizynie, histydynie, treoninie i aminokwasach siarkowych [1]. Podczas procesu obróbki termicznej badanych próbek pszenicy powstają stabilne wolne rodniki, które nawet po 5 dniach od chwili wygrzania obecne są w próbkach, w ilościach nie mniejszych niż bezpośrednio po wygrzaniu. Znaczny wzrost liczby wolnych rodników w badanych próbkach wskazuje na to, że termiczna obróbka ziarna przyczynia się do zwiększenia o 1 rząd wielkości (w stosunku do liczby rodników w tkankach żywych organizmów) liczby wolnych rodników we wszelkiego rodzaju prażonych lub pieczonych ziarnach. W artykule opisano także wstępne wyniki badania wpływu światła lasera na modyfikację redukcji skażenia ziarna pszenicy zakażonego pleśniami grzybowymi, takimi jak: *Aspergillus sp.*, *Mucor*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger*. Badanie próbek zakażonych grzybami wykazało, że w przypadku stosowanej dawki światła lasera wystąpiło nieznaczne zmniejszenie liczby wolnych rodników po naświetlaniu. Wynik ten w porównaniu z poprzednimi pracami [2] i [3] wskazuje na to, że istnieje optymalna dawka, powyżej której następuje efekt przeciwny do spodziewanego, czyli wzrost liczby wolnych rodników.

## 2. MATERIAŁ I METODYKA

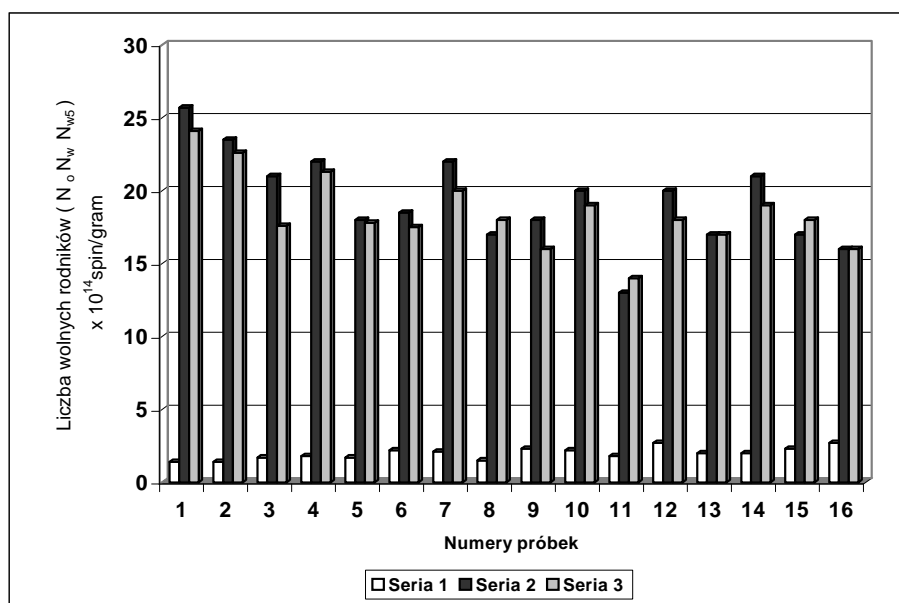
Widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) rejestrowano w 16 próbkach kontrolnych ziaren pszenicy jarej odmiany Jasna o wilgotno-

ści 10%. Próbki poddano następnie wygrzewaniu w temperaturze 200°C w czasie 1h. Do wygrzewania użyto pieca rezystancyjnego z regulacją i stabilizacją temperatury (dokładność  $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Zarejestrowano także sygnały EPR dla nasion tej samej odmiany pszenicy zakażonej wcześniej grzybami patogennymi, takimi jak: *Aspergillus sp.*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.*, i *Mucor*. Nasiona obtoczono gęstymi zawiesinami trzytygodniowej hodowli grzybów pleśniowych na podłożu stałym Sabourauda, a następnie suszono na powietrzu w płytkach Petriego. Próbki zakażone grzybami poddano naświetlaniu wiązką lasera He-Ne o długości fali  $\lambda = 632,8$  nm i powierzchniowej gęstości mocy  $56$  mW/cm<sup>2</sup> z odległości 288 cm w czasie 3 s, dawka  $1,68 \cdot 10^{-1}$  J/cm<sup>2</sup>. Badania przeprowadzono spektrometrem EPR typu SE/X – 2544 (Radiopan) z wnęką rezonansową typu CX – 101 TE<sub>102</sub>.

Warunki pomiaru: wysoka częstość 9,4÷9,5 GHz, moc mikrofalowa ~15 mW, częstość modulacji 100 kHz o amplitudzie 0,4 mT, stała czasowa 1 s i przemieszczenie 20 mT/4 min. W pomiarach EPR stosowano mikrofałę o długości 3 cm w polu magnetycznym około 340 mT. Do wyznaczenia koncentracji wolnych rodników użyto jako wzorca *Weak pitch EPR sample* (904450-02,  $3,3 \times 10^{-4}$  % pitch in KCl), zgodnie z „Instrukcją Technik EPR” firmy Varian. Oznaczenia wykonano dla ziaren kontrolnych, wygrzanych oraz dla ziaren zakażonych jednym z pięciu rodzajów grzybów, a obliczoną liczbę niesparowanych elektronów podano w odniesieniu do jednego grama ziarna. Widmo EPR rejestrowano w temperaturze pokojowej.

### 3. WYNIKI

Sygnały EPR z badanych próbek ziaren pszenicy jarej odmiany Jasna, wygrzanych w piecu w temperaturze 200°C w czasie 1h, wykazują taki sam kształt (kształt Lorentza) i parametry przed i po wygrzaniu (Ryc. 3). Szerokość linii  $\Delta B_{pp} = 0,78$  mT, natomiast czynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$  zmienia swoją wartość po wygrzaniu, od 2,0040 do 2,0047. Intensywność sygnału EPR wzrasta bezpośrednio po wygrzaniu, lecz po pięciu dniach następuje niewielki spadek liczby wolnych rodników. Błąd

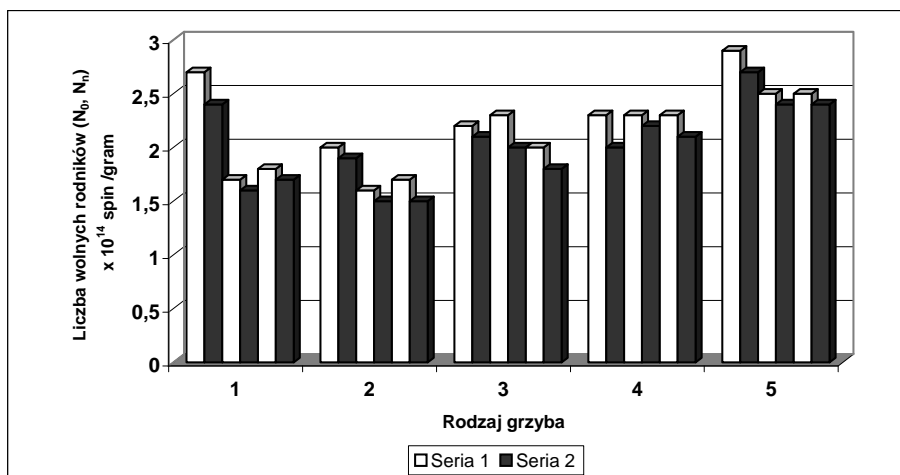


Ryc. 1. Histogram wyniku pomiarów wzrostu liczby wolnych rodników w wyniku wygrzewania ziaren pszenicy jarej odmiany Jasna w temperaturze 200°C oraz 5 dni po wygrzaniu. Zmiany czynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g$  wynosiły od 2,0040–2,0047. Liczba wolnych rodników  $N$  ( $\times 10^{14}$  spin/gram). Błąd metody 20%

Serie 1 -  $N_0$  – Liczba wolnych rodników w kontroli, średnio  $(1.98 \pm 0.39) \times 10^{14}$  spin/gram;  
 Serie 2 -  $N_w$  – Liczba wolnych rodników zaraz po wygrzaniu,  
 średnio  $(19,37 \pm 3,07) (\times 10^{14})$  spin/gram;  
 Serie 3 -  $N_{w5}$  – Liczba wolnych rodników 5 dni po wygrzaniu,  
 średnio  $(18,49 \pm 2,54) (\times 10^{14})$  spin/gram

Histogram of the results of measurements of the free radicals increase after heating of summer wheat grains brand Jasna at 200°C, and after 5 days from heating. The  $g$  – factor was in the range 2.0040–2.0047. The number of free radicals is  $N$  ( $\times 10^{14}$  spin/gram). The measurement errors are 20%

Serie 1 –  $N_0$  – The number of free radicals in the control sample,  
 on an average  $(1.98 \pm 0.39) \times 10^{14}$  spin/gram;  
 Serie 2 –  $N_w$  – The number of free radicals after heating,  
 on an average  $(19,37 \pm 3,07) \times 10^{14}$  spin/gram;  
 Serie 3 –  $N_{w5}$  – The number of free radicals 5 days after heating,  
 on an average  $(18,49 \pm 2,54) \times 10^{14}$  spin/gram



Ryc. 2. Histogram wyniku pomiarów zmniejszenia liczby wolnych rodników w wyniku naświetlania ziaren pszenicy jarej odmiany Jasna laserem He-Ne przez 3 s. Zmiany czynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g$  wynosiły od 2,0038–2,0048. Liczba wolnych rodników  $N$  ( $\times 10^{14}$  spin/gram). Błąd metody 20%

1 - *Aspergillus sp.*, 2 - *Aspergillus niger.*, 3 - *Penicillium sp.*, 4 - *Fusarium sp.*,  
5 - *Mucor*;

1.  $1.98 \pm 0.45$ , 2.  $1.7 \pm 0.21$ , 3.  $2.03 \pm 0.16$ , 4.  $2.20 \pm 0.13$ , 5.  $2.56 \pm 0.17$ ;

Seria 1 -  $N_0$  – Liczba wolnych rodników w kontroli;

Seria 2 -  $N_n$  – Liczba wolnych rodników 60 s po naświetlaniu

Histogram showing the results of measurements of the free radicals lowering after in irradiation by He-Ne laser for 3s in the summer wheat Jasna grains. The  $g$  – factor was in the range 2.0038–2.0048. The number of free radicals is  $N$  ( $\times 10^{14}$  spin/gram). The measurement errors are 20%

1 - *Aspergillus sp.*, 2 - *Aspergillus niger.*, 3 - *Penicillium sp.*, 4 - *Fusarium sp.*, 5 - *Mucor*.;

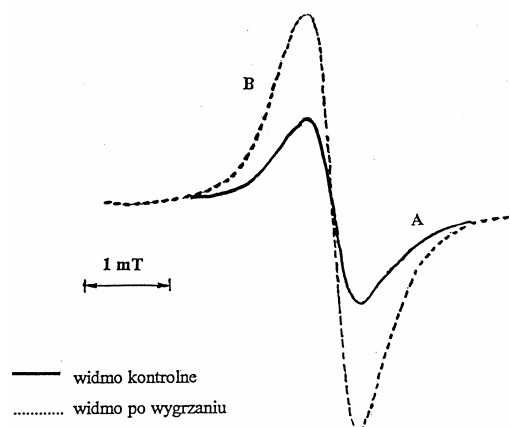
1.  $1.98 \pm 0.45$ , 2.  $1.7 \pm 0.21$ , 3.  $2.03 \pm 0.16$ , 4.  $2.20 \pm 0.13$ , 5.  $2.56 \pm 0.17$ ;

Serie 1 -  $N_0$  – The number of free radicals in the control sample;

Serie 2 -  $N_n$  – The number of free radicals 60 s after exposure to the laser light

metody pomiarowej wynosił 20%. Przy pomocy testu t-Studenta stwierdzono istotność różnic (współczynnik korelacji  $p = 1,3 \cdot 10^{-4}$ ) między liczbą wolnych rodników kontroli przed wygrzaniem oraz 3 min po wygrzaniu, a także liczbą wolnych rodników w tych próbkach 5 dni po wygrzaniu (Ryc. 1). Przeprowadzono również badania wpływu wilgotności próbek na poziom

sygnału EPR. Po wysuszeniu próbek pszenicy przez jedną godzinę w temperaturze 130°C, stwierdzono taki wzrost intensywności sygnału, że średnio około 20% wzrostu liczby wolnych rodników można przypisać odwodnieniu próbki.



Ryc. 3. Wybrane widma EPR zarejestrowane w próbkach ziaren poddanych działaniu temperatury 200°C;

- A. liczba wolnych rodników  $N$  jest rzędu  $10^{14}$  spin/gram;
- B. liczba wolnych rodników  $N$  jest rzędu  $10^{15}$  spin/gram

Selected EPR signals, recorded from summer wheat samples exposed to the temperature 200°C;

- A. Free radicals quantity ranks about  $10^{14}$  spin/gram;
- B. Free radicals quantity ranks about  $10^{15}$  spin/gram

Pozostałe 80% wzrostu sygnału EPR należałoby przypisać działaniu temperatury 200°C, nieodwracalnym zmianom, jakie zachodzą w strukturze ziaren. W próbkach tej samej odmiany pszenicy, naświetlanych przez 3 s, lecz wcześniej zakażonych grzybami (scharakteryzowanymi w publikacjach [4–16]) takimi jak *Aspergillus sp.*, i *Penicillium sp.*, szerokość linii rezonansowej  $\Delta B_{pp} = 0,62$  mT. W pozostałych próbkach – *Mucor*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger*. – szerokości linii wynosiły  $\Delta B_{pp} = 0,79$  mT, natomiast czynnik  $g$  wraz ze wzrostem liczby wolnych rodników zmienia swoją wartość od 2,0040 do 2,0045. Należy też odnotować redukcję liczby wolnych rodników po naświetlaniu próbek światłem lasera (Ryc. 2.). Badanie próbek

zakażonych grzybami wykazało, że w przypadku stosowanej dawki światła lasera wystąpiło niewielkie (nieistotne  $p = 0,27$ ) zmniejszenie liczby wolnych rodników 60 s po naświetlaniu, co stwierdzono testem t-Studenta. Wynik ten w porównaniu z publikacjami [2] i [3] wskazuje na to, że istnieje optymalna dawka, powyżej której następuje efekt przeciwny do spodziewanego, czyli wzrost liczby wolnych rodników.

#### 4. DYSKUSJA

Ziarna zbóż zawierają zarówno albuminy i globuliny, jak też prolaminy i glutaliny, a także frakcje tzw. białek resztkowych, które z trudnością ekstrahują się z mąki. Najlepiej poznanymi białkami pszenicy są białka glutenowe, a gluten stanowi ok. 80% białka zawartego w ziarnie. Dzięki znacznej zawartości glutaminianu (aminokwasu białek zapasowych) i proliny łańcuchy białek glutenowych przyjmują nietypowe kształty. Sprężystość glutenu umożliwia tworzenie rozciągliwej struktury ciasta, przez co następuje zatrzymywanie gazów pochodzących z fermentacji, co jest szczególnie ważne dla przemysłu piekarskiego [17]. Prażenie jest zabiegiem termicznym prowadzącym do zmian w wyglądzie, smaku, zapachu i składzie chemicznym prażonego ziarna. Podczas wygrzewania w wysokiej temperaturze 200-220°C białka tracą swe wartości odżywcze wskutek nieodwracalnych zmian, zwłaszcza w aminokwasach: lizynie, histydynie, treoninie i aminokwasach siarkowych [1].

Podczas wygrzewania wzrasta energia cząsteczek. Powstają wtedy jony, które zderzają się i reagują z normalnymi cząsteczkami, a wzbudzone cząsteczki ulegają spontanicznej dysocjacji, co prowadzi do powstania układu stabilnych cząsteczek i niestabilnych wolnych rodników [18]. Hydroksyloxy rodnik  $O\cdot H$  powstający podczas wygrzewania jest rodnikiem krótkożyciowym ( $10^{-8}s$ ), lecz bardzo aktywnym, powodującym kaskadową peroksydację lipidów (utlenianie kwasów tłuszczowych) aminokwasów i białek, destrukcję niektórych makromolekuł, a zwłaszcza DNA [19]. Rodnik  $O\cdot H$  nie jest wykrywany bezpośrednio, lecz reaguje z różnymi substancjami (zwykle reakcje przyłączenia lub oderwania atomu wodoru), dając rodniki stabilne i łatwo wykrywalne, np.: białkowe, lipidowe lub uwięzione w ma-

trycy glutenowej [20]. Rodniki te wchodząc w reakcje międzycząsteczkowe tworzą trwałe produkty końcowe. Nie można dokładnie ocenić, jakiego rodzaju wolne rodniki powstają podczas wygrzewania, lecz wiadomo, że utlenianie lipidów ma ujemny wpływ na zdrowie organizmu, a także powoduje pogorszenie przydatności do spożycia produktów spożywczych [19]. Tak duży wzrost liczby wolnych rodników w badanych próbkach może sugerować, że termiczna obróbka ziarna jest procesem negatywnie wpływającym na przydatność do spożycia wszelkiego rodzaju wypieków. W nasionach bardzo suchych, czyli zaraz po wygrzaniu (3 min) przedłuża się czas istnienia wolnych rodników, istnieje także korelacja między stopniem uszkodzenia nasion a zawartością w nich wolnych rodników [3]. Nie wiadomo jednak, jak wpływa na rekombinację wolnych rodników proces trawienia w przewodzie pokarmowym.

Wiadomo, że oddziaływanie na grzybnię światła lasera He-Ne, nawet przy braku zahamowania wzrostu grzybów, może powodować zmiany morfologiczne, które zmniejszają zdolność ich rozprzestrzeniania się [21]. Poza długością fali i powierzchniową gęstością mocy istotny wpływ ma także czas naświetlania wiązką lasera badanych próbek [22-23]. Im dłuższy czas naświetlania, tym lepszy efekt mikostatyczny [2, 21]. Źródłem wolnych rodników w grzybach mogą być mikotoksyny przez nie wytwarzane, obejmujące takie kancerogeny, jak np. benzopiran [2] oraz krótkożyciowe rodniki powstające podczas naświetlania i powodujące kaskadową peroksydację lipidów. Naświetlanie laserem He-Ne przy odpowiednich parametrach (takich, jak długość fali, powierzchniowa gęstość mocy i czas naświetlania) działa na grzyby mikostatycznie, powodując także zmniejszenie ilości wolnych rodników zawartych w badanych próbkach. Proces ten nie jest stabilny, gdyż po kilku dniach wraz z odbudową grzybni stopniowo wzrasta także liczba wolnych rodników [21].

## 5. WNIOSKI

1. Badane próbki ziarna, poddane procesowi obróbki termicznej, wykazują istotny wzrost liczby wolnych rodników, średnio o 1 rząd wielkości



większy niż przed wygrzaniem. Liczba niesparowanych elektronów w jednym gramie badanego ziarna po wygrzaniu wynosi  $10^{15}$  spin/gram, co dziesięciokrotnie przewyższa liczbę rodników obecnych *in vivo* w 1 gramie tkanki organizmu żywego.

2. Podczas procesu obróbki termicznej badanych próbek pszenicy powstają stabilne wolne rodniki, które nawet po 5 dniach od chwili wygrzania obecne są w próbkach w ilościach nieistotnie mniejszych niż bezpośrednio po wygrzaniu w 200°C.

3. Niewielka zmiana czynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g$  po wygrzaniu w 200°C sugeruje powstanie zmodyfikowanych stabilnych wolnych rodników, które po 5 dniach w dużym stopniu wracają do poprzedniej struktury ( $g$  prawie osiąga wartość taką, jak przed wygrzaniem).

4. Znaczny wzrost liczby wolnych rodników w badanych próbkach może sugerować, że termiczna obróbka ziarna zbóż jest procesem, który wpływa na wzrost liczby wtórnych rodników bardziej stabilnych, np: białkowych, lipidowych lub uwieczonych w matrycy glutenowej we wszelkiego rodzaju prażonych i pieczonych ziarnach.

5. Naświetlanie światłem lasera He-Ne przy odpowiednich parametrach (takich, jak długość fali, powierzchniowa gęstość mocy i czas naświetlania) działa na grzyby mikostatycznie, powodując także nieznaczne zmniejszenie liczby wolnych rodników zawartych w badanych próbkach.

#### LITERATURA

- [1] Pijanowski E., *Ogólna technologia żywności*, WNT, Warszawa 1997, 137-139.
- [2] Gagoś M., Misiak L.E., Kowalczyk E. i Koper R., *Ekoinżynieria*, (1999), 38 (2) 14-19.
- [3] Drozd D., Szajsner H. i Jezierski A., *Biuletyn IHAR*, (1997), 204, 181-186.
- [4] Aleksandrowicz J., *Tyg.-Lek.*, (1970), 29, 1100-1103.
- [5] Strzelecki E.L., *Acta Microb. Polon.*, (1972), 4, 155.
- [6] Lemieszek-Chodorowska K., *Roczniki PZH*, (1967), 18, 563-569.
- [7] Juskiewicz T. i Piskorska-Pliszczyńska J., *Med. Weteryn.*, (1976) 32 (10), 617-619.
- [8] World Health Organization, *Mycotoxins Environmental Health Criteria*, (Genewa) (1979) 11.
- [9] Goliński P. i in., *Appl. Environ. Microbiol.*, (1984), 47, 1210-1212.
- [10] Chełkowski J., *Mikotoksyny, wytwarzające je grzyby i mikotoksykozy*, W. SGGW-AR, Warszawa 1985.

- [11] Chelkowski J., Wiewiórkowska M. i Pietrzak J., *Przem. ferm. i owocowo-warzywny*, (1984), 28, 6, 9–10.
- [12] Lejstner L., *Toxinogenic Penicillia occurring in foods and feeds.*, [in:] *Toxinogenic Fungi, their toxins and Health Hazard*, Kondasha Ltd., Tokyo 1984.
- [13] Moreau C., *Moulds, toxins and food*, John Wiley and Sons, New York – Toronto 1979.
- [14] Chu F.S., *Critical Rev. Toxicol.*, (1974), 2, 499–524.
- [15] Kochman J., *Zarys mikologii dla fitopatologów*, Wyd. AR, Warszawa 1981, 143-146.
- [16] Pogorzelski E., *Przem. Ferm. Rol.*, (1997), 5, 11–15.
- [17] Kączkowski J., *Biochemia roślin*, PWN, Warszawa 1982, 250-252.
- [18] *Biofizyka dla biologów*, (red.) M. Gryszewska i W. Leyko, PWN, Warszawa 1997, 439-443.
- [19] Gonet B., *Żywnienie człowieka i metabolizm*, (1994), XXXI (1), 49-52.
- [20] Symons M., *Spektroskopia EPR w chemii i biochemii*, PWN, Warszawa 1987, 266-267.
- [21] Dobrowolski J.W., Budak H. i Bogusz B., *Ocena wpływu światła laserowego na niektóre gatunki grzybów patogennych in vivo. Materiały VII Sympozjum Bioelektro-niki KUL*, Lublin 1994.
- [22] Dziamba S. i Koper R., *Fragm. Agronom.*, (1992), 1 (33) 80–93.
- [23] Koper R., *Intern. Agroph.*, (1994), 8, 593–596.

#### SUMMARY

Grains of Jasna wheat, infected with pathogenic fungi: *Aspergillus sp.*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* and *Mucor*, were subsequently exposed to heating at 200°C for 1 h. The heating resulted in the formation of stable free radicals, detected with electron spin resonance. Interestingly, the concentration of free radicals after five days was comparable to that seen 1 h after the heating.

The number of unpaired electrons per one gram of a grain sample reached  $10^{15}$  spin which exceeded by 10-fold the number of free radicals encountered in *in vivo* conditions. A moderate change of the *g*-factor following the heating at 200°C may suggest the formation of modified stable free radicals. The considerable increase in the number of free radicals may lead to a conclusion that thermal treatment negatively affects the usefulness for consumption of a variety of roasted grains.