

Iwona Konopka, Alicja Faron, Małgorzata Tańska

BADANIE WPŁYWU FERMENTACJI MLEKOWEJ I KIELKOWANIA NA UWALNIANIE ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH Z POŁĄCZEŃ NIEROZPUSZCZALNYCH W ZIARNIE ZBÓŻ

Katedra Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Kierownik: prof. dr hab. *E. J. Borowska*

Badano zmiany zawartości wolnych związków fenolowych w produktach pszennych i żytnich (mąka wyciągowa, razowa, otręby) poddanych fermentacji mlekowej oraz w kielkującym ziarnie pszenicy. Stwierdzono, że tempo wzrostu zawartości wolnych związków fenolowych jest uzależnione od rodzaju procesu (fermentacja, kielkowanie), a w przypadku fermentacji od rodzaju produktu zbożowego. Wykazano, że już 12-godzinne kielkowanie ziarna pszenicy daje produkt o zawartości wolnych polifenoli zbliżonej do próbki fermentowanej przez 24 godziny. Analiza procesu fermentacji wskazuje, że bardziej podatne na rozpad są kompleksy kwasów fenolowych obecnych w ziarnie żyta. Można przypuszczać, że zastosowanie tradycyjnych technologii fermentacji na zakwasach i/lub zastosowanie w recepturach pieczywa mąki z ziarna podkielkowanego pozwoli na zwiększenie w diecie łatwo dostępnych polifenoli.

Hasła kluczowe: związki fenolowe, fermentacja mlekowa, kielkowanie, pszenica, żyto

Key words: phenolic compounds, lactic acid fermentation, germination, wheat, rye

Ziarna zbóż są bogatym źródłem biologicznie aktywnych fitozwiązków, do których należą polifenole, karotenoidy, tokoferole i tokotrienole. Wykazują one właściwości prozdrowotne związane z zabezpieczaniem organizmu przed stresem oksydacyjnym (1).

Najbardziej zróżnicowaną grupę fitozwiązków ziarna zbóż stanowią polifenole, które występują w ilości od 100 do 300 mg na 100 g suchej masy (2). Wśród nich dominują kwasy fenolowe, które przyczyniają się do zmiatania wolnych rodników, przeciwdziałają nowotworom, chorobom układu krążenia, cukrzycy typu II, otyłości i stanom zapalnym (1). Biodostępność kwasów fenolowych zależy od sposobu ich podania do organizmu (w postaci suplementu, czy jako naturalny składnik żywności), składu diety towarzyszącej ich przyjmowaniu, ale przede wszystkim od formy w jakiej są wprowadzane do przewodu pokarmowego (wolne, skoniugowane i związane). Łatwiej przyswajane są monomery i dimery, wchodzące w skład tzw. frakcji wolnej (3).

W ziarnie zbóż kwasy fenolowe występują głównie w warstwach peryferyjnych, w formie związanej ze składnikami ścian komórkowych (4). Procesy trawienne oraz aktywność mikroflory zasiedlającej przewód pokarmowy człowieka pozwalają w niewielkim tylko stopniu zwiększyć przyswajalność fenolokwasów (1, 5, 6).

Celem badań było określenie wpływu fermentacji mlekowej oraz kiełkowania ziarna na uwalnianie związków fenolowych z ich połączeń z polimerami ścian komórkowych. Poznanie tych procesów może przyczynić się do opracowania nowych receptur pieczywa o zwiększonej zawartości łatwo przyswajalnych związków fenolowych.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie 1. Badanie uwalniania związków fenolowych podczas fermentacji mąki oraz otrąb otrzymanych z przemiału ziarna pszenicy i żyta.

Materiał badawczy stanowiło ziarno pszenicy odmiany Tonacja i żyta odmiany Dańkowskie Złote. Z każdego rodzaju ziarna uzyskano trzy produkty do dalszych badań: 1) mąki jasne: pszenną o wyciągu 54% oraz żytnią o wyciągu 61% otrzymano w wyniku przemiału ziarna w młynie walcowym Agromatic AQC 109; 2) mąki razowe otrzymano w wyniku 1-krotnego przemiału ziarna w młynie Falling Number 3100; 3) otręby otrzymano jako produkt uboczny przemiału na mąkę wyciągową, przesiany przez sito 315 μm .

Próbki mąki i otrąb fermentowano z 1% udziałem kultury starterowej LV1 (skład: drożdże *Saccharomyces chevalieri* oraz bakterie fermentacji mlekowej *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus brevis*), sporządzając luźne żurki o wydajności 450% (zakwasy z mąki) oraz o wydajności 600% (zakwasy z otrąb). Fermentację prowadzono w temperaturze 34°C przez 24 godziny z ciągłym mieszaniem próbek w łaźni wodnej Water Bath Shaker Typ 357. Po 24 godzinach uzyskano zakwas o optymalnych cechach użytkowych w technologii piekarskiej (optymalne pH i kwasowość miareczkowa). Zawartość wolnych związków fenolowych określono w próbkach wyjściowych oraz po 12 i 24 godzinach fermentacji. Przed przystąpieniem do ekstrakcji próbki zostały zamrożone, a następnie zliofilizowane.

Doświadczenie 2. Badanie uwalniania związków fenolowych z próbek ziarna pszenicy poddanych kiełkowaniu.

Materiał badawczy stanowiło nieuszkodzone ziarno pszenicy odmiany Tonacja (frakcja o grubości/szerokości od 2.5 do 2.8 mm). Kiełkowanie przeprowadzono na płytkach Petriego, stosując procedurę opisaną w metodzie *Aubry'go* (7). Polegała ona na przygotowaniu płytek z bibułą nawilżoną 8 cm³ wody destylowanej, ułożeniu na każdej z nich po 100 ziarniaków pszenicy bruzdkami do dołu i włożeniu do termostatu o temperaturze 24°C. Proces kiełkowania prowadzono przez 6, 12, 24, 48 i 72 godzin. Bezpośrednio po wyjęciu z termostatu próbki przenoszono na suchą bibułę i wstawiano do wysuszenia do stałej masy w temperaturze 50°C, a następnie mielono w młynku laboratoryjnym Knifetec 1095 Sample Mill firmy Tecator.

Ekstrakcja całkowitej ilości związków fenolowych po hydrolizie zasadowej

Do 1 g próbki (mąki lub otrąb) dodano 40 cm³ 2M NaOH i hydrolizowano 4 godziny w temperaturze pokojowej, stosując ciągłe mieszanie. Następnie próbki

zakwaszono do pH 2 (6M HCl), przeniesiono do rozdzielaczy i przeprowadzono 3-krotną ekstrakcję związków fenolowych przy użyciu eteru etylowego. Ekstrakty połączono i zagęszczono do sucha w temperaturze 40°C.

Ekstrakcja wolnych związków fenolowych

Przeprowadzono 2-krotną ekstrakcję 1 cm³ 80% metanolu i 1-krotną 1 cm³ 80% acetonu związków obecnych w 150 mg próbek liofilizatów zakwasów i suszów ze skiełkowanego ziarna. Ekstrakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 15 minut przy użyciu termomiksera (Eppendorf). Po każdym etapie ekstrakcji próbki odwirowano (10 minut przy 15000 obr/min) w wirówce (Eppendorf). Uzyskane ekstrakty połączono, a następnie zagęszczono do sucha w temperaturze 40°C.

Oznaczenie kolorymetryczne zawartości wolnych i całkowitych związków fenolowych

Do kolb miarowych z zagęszczonym ekstraktem dodano 0,5 cm³ odczynnika Folin-Ciocalteu, 3 cm³ 14% roztworu węgla sodu i uzupełniono do 10 cm³ wodą destylowaną (8). Kolbki odstawiono w ciemne miejsce na 60 minut, a następnie odwirowano przez 10 min przy 15000 obr/min (Eppendorf). Absorbancję klarownych roztworów mierzono przy długości fali 720 nm wobec próbki odczynnikowej (bez ekstraktu związków fenolowych). Wynik absorbancji przeliczono, za pomocą krzywej wzorcowej, na zawartość D-katechiny.

Obliczenia statystyczne

Do oceny wyników wykorzystano analizę wariancji z testem Duncana przy poziomie istotności $p \leq 0,05$. Obliczenia wykonano przy użyciu programu Statistica 10.0 (Statsoft).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Ogólna zawartość związków fenolowych w ziarnie zbóż

Badane produkty zbożowe różniły się zawartością związków fenolowych ogółem (tab. I). Mąki razowe zawierały od 182 do 281 mg/100 g, a mąki wyciągowe od 37 do 100 mg/100 g polifenoli. Wyższe wartości zanotowano dla prób z żyta. Najwyższą, ale porównywalną, zawartością polifenoli charakteryzowały się otręby (ok. 390 mg/100 g).

Oznaczona zawartość polifenoli w produktach przemiału zbóż jest zbliżona do podawanej przez innych autorów (1, 9). Akumulacja związków fenolowych w ziarniakach wynika z ich funkcji strukturalnej, związanej z tworzeniem polimerów z arabinoksylianami, ligniną i taninami w obrębie ścian komórkowych, zwłaszcza okrywy owocowo-nasiennej. Naturalna koncentracja polifenoli w warstwach peryferyjnych ziarniaka skutkuje tym, że otręby i produkty pełnego przemiału charakteryzują się zdecydowanie wyższą ich zawartością niż mąki jasne (9). Ponadto większe nagromadzenie związków fenolowych w ziarnie może być efektem oddziaływania środowiska. Stres abiotyczny (susza, intensywne promieniowanie UV, zanieczyszczenia organiczne i nieorganiczne gleby) i biotyczny (insekty, drapieżniki, chwasty) wpływa na wzrost zawartości związków fenolowych (10).

Tab e l a I. Zawartość związków fenolowych ogółem w mąkach i otrębach oraz zmiany zawartości wolnych związków fenolowych w czasie fermentacji ciast z ich udziałem [mg/100 g s.m.]

Table I. Total contents of phenolic compounds in flour and bran as well as changes of free phenolic compounds content during fermentation of dough with their share [mg/100 g d.m.]

Rodzaj próbki	Zawartość związków fenolowych						
	ogółem	wolnych					
		po 0 godz.		po 12 godz.		po 24 godz.	
	$\bar{x} \pm S.D.$	$\bar{x} \pm S.D.$	%*	$\bar{x} \pm S.D.$	%*	$\bar{x} \pm S.D.$	%*
RP	182,2 ^A ± 5,4	13,1 ± 0,9 ^a	7,2	26,9 ± 2,9 ^b	14,8	30,7 ± 2,8 ^c	16,9
RŻ	281,2 ^B ± 5,1	10,6 ± 2,0 ^a	3,8	68,0 ± 5,7 ^b	24,2	99,9 ± 11,2 ^c	35,5
WP	37,2 ^C ± 3,4	1,3 ± 1,3 ^a	3,6	8,4 ± 2,3 ^b	22,7	16,9 ± 3,9 ^c	45,6
WŻ	100,5 ^D ± 2,7	5,7 ± 0,9 ^a	5,6	28,1 ± 2,0 ^b	28,0	58,5 ± 2,3 ^c	58,2
OP	396,4 ^E ± 9,6	33,4 ± 5,8 ^a	8,4	55,5 ± 16,8 ^b	14,0	101,9 ± 8,9 ^c	25,7
OŻ	379,8 ^F ± 8,8	25,6 ± 0,6 ^a	6,7	102,6 ± 7,6 ^b	27,0	219,4 ± 8,3 ^c	57,8

RP – mąka razowa pszenna, RŻ – mąka razowa żytnia, WP – mąka wyciągowa pszenna, WŻ – mąka wyciągowa żytnia, OP – otręby pszenne, OŻ – otręby żytnie, * – procentowy udział w ogólnej ilości związków fenolowych, ^{A, B, C, ...} – wartości średnie zawartości związków fenolowych ogółem oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie ($p \leq 0,05$), ^{a, b, c, ...} – wartości średnie zawartości wolnych związków fenolowych oznaczone tymi samymi literami czytane w wierszach nie różnią się istotnie ($p \leq 0,05$).

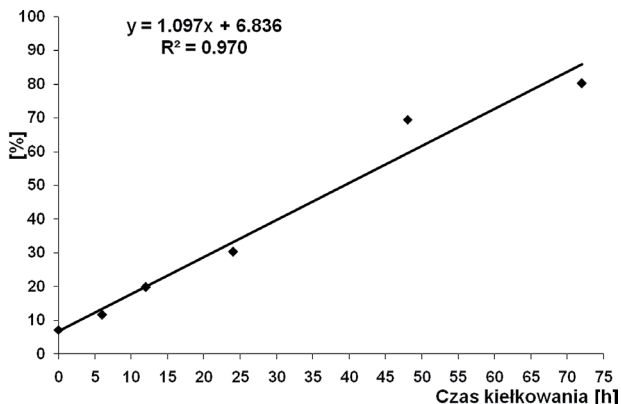
Uwalnianie związków fenolowych podczas fermentacji mlekowej

Fermentacja zakwasów z mąki i otrąb spowodowała istotny wzrost zawartości wolnych związków fenolowych (tab. I). Dla produktów żytnich ich ilość wzrosła ok. 5-krotnie, a dla pszennych ok. 2-krotnie (wyjątek stanowiła jedynie mąka wyciągowa) po pierwszych 12 godzinach fermentacji. Po kolejnych 12 godzinach fermentacji zanotowano dalszy, około 2-krotny przyrost ich ilości. Najwyższy stopień rozkładu kompleksów stwierdzono w mące wyciągowej żytniej (58,2%), a najniższy w mące razowej pszennej (16,9%).

Wzrost zawartości wolnych polifenoli wskazuje na hydrolizę estrów kwasów fenolowych z polisacharydami nieskrobiowymi ściany komórkowej. Esterazy kwasu ferulowego mają optimum działania w zakresie pH 6.0-8.0 oraz temperatur 30-60°C. Ich aktywność wymaga jednak wstępnej hydrolizy ścian komórkowych przez endo- i egzo- β -1,4-ksylanazy, α -L-arabinofuranozydazy, α -glukuronidazy oraz β -glukanazy, dla których optymalna wartość pH wynosi 4.0-6.5 (11). Źródłem tych enzymów może być surowiec (enzymy natywne), mikroflora zasiedlająca powierzchnię ziarna lub dodana z kulturą starterową. W przypadku oddziaływania kultury starterowej bardziej prawdopodobny jest rozpad wiązań estrowych pod wpływem enzymów drożdży piekarskich, bowiem tylko niewiele szczepów bakterii fermentacji mlekowej syntetyzuje esterazy ferulowe (12).

Uwalnianie związków fenolowych podczas kiełkowania ziarna zbóż

Zmiany zawartości wolnych związków fenolowych podczas kiełkowania miały charakter liniowy (ryc. 1). Po 72 godzinach ich ilość wzrosła ponad 10-krotnie, osiągnąjąc ok. 80% wydajność rozpadu kompleksów polifenolowych.



Ryc. 1. Zmiany zawartości wolnych związków fenolowych podczas kiełkowania ziarna pszenicy odmiany Tonacja

Fig. 1. Changes in the content of free phenolic compounds during germination of wheat grains variety Tonacja

Kiełkowanie jest procesem, który pobudza metabolizm ziarniaka do uaktywniania nieczynnych form i syntezy nowych enzymów (13). Sprzyja to rozpadowi polimerów ziarna i ogólnemu zwiększeniu wszystkich form monomerycznych, które mogą zostać wykorzystane podczas rozwoju nowej rośliny. To tłumaczy dynamiczny przyrost zawartości wolnych związków fenolowych, obserwowany m.in. w ziarnie żyta (14), pszenicy (15) oraz innych zbóż (16, 17, 18).

WNIOSKI

1. Porównanie tempa uwalniania związków fenolowych w wyniku procesu fermentacji i kiełkowania wskazuje, że kiełkowanie ziarna pozwala na szybszą akumulację w nim dużej ilości wolnych związków fenolowych.

2. Wykazano, że ok. 12 godzinne kiełkowanie ziarna pszenicy jest równoważne fermentacji zakwasu z mąki razowej prowadzonego przez 24 godziny.

3. Zastosowanie zarówno fermentacji ciasta, jak i dodatek do jego receptury skiełkowanego ziarna może wzbogacić pieczywo w związki fenolowe o większej biodostępności.

I. Konopka, A. Faron, M. Tańska

THE STUDY OF IMPACT OF LACTIC FERMENTATION AND GERMINATION OF GRAINS ON RELEASE OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM INSOLUBLE BOUNDS IN CEREAL GRAINS

Summary

The changes of free phenolic compounds content in wheat and rye products (wholemeal flour, extracted flour, bran) subjected to lactic fermentation and in germinated wheat grain were investigated. It was found that the growth rate of free phenolic compounds content depends on the type of process (fermenta-

tion, germination); and in the case of fermentation, depends on the type of cereal product. It was shown that the effect of 12 hours wheat grain germination is similar to fermentation of wholemeal flour by 24 hours. Analysis of the fermentation process shows that the more susceptible to degradation are esters of phenolic acids present in rye grain. It can be assumed that the use of lactic fermentation for bread production, especially wheat bread, and/or use of flour from germinated grain in recipes of bread could lead to an increase of polyphenols bioavailability in human diet.

PIŚMIENICTWO

1. Moore, J., Hao, Z., Zhou, K., Luther, M., Costa, J., Yu, L.: Carotenoid, tocopherol, phenolic acid and antioxidant properties of Maryland-grown soft wheat. *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53: 6649-6657. – 2. Mattila P., Pihlava J.M., Hellström J.: Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53(21): 8290-8295. – 3. Miniati E.: Polyphenols in human health: biological effects, mechanisms of action and disease prevention. *Annali dell' Istituto superiore di sanità*, 2007; (43, 4): 362-368. – 4. Beta T., Nam S., Dexter J.E., Sapirstein H.D.: Phenolic Content and Antioxidant Activity of Pearled Wheat and Roller-Milled Fractions. *Cereal Chem.*, 2005; 82(4): 390-393. – 5. Gawlik-Dziki U.: Zmiany poziomu związków fenolowych i właściwości przeciwutleniających płynów uzyskanych po trawieniu *in vitro* chleba pszennego. *ŻNTJ*, 2007; 5(54): 374-384. – 6. Michalska A., Zieliński H., Soral-Śmietana M., Stempińska K.: Zawartość związków fenolowych i pojemność przeciwutleniająca produktów żytnich w symulowanych *in vitro* zmianach pH w przewodzie pokarmowym oraz po trawieniu enzymatycznym *in vitro*. *ŻNTJ*, 2007; 5(54): 374-384. – 7. Neumann L.: Specified procedures for the determination of germination energy of brewing barley in boxes by the Aubry method. *Monatsschrift fuer Brauwissenschaft.*, 1987; 40(2), 77-79. – 8. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzym.*, 1999; 299: 152-178. – 9. Klepacka J., Fornal L.: Określenie zależności między zawartością wybranych związków fenolowych a wartością przemiałową ziarna pszenicy. *ŻNTJ*, 2008; 6: 55-64. – 10. Lachman J., Dudjak J., Orsák M., Pivec V.: Effect of accelerated ageing on the content and composition of polyphenolic complex of wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. *Plant Soil Environ.*, 2003; 49 (1): 1-7.
11. Sz wajgier D., Targonski Z.: Release of free ferulic acid and feruloylated arabinoxylans from brewery's spent grain by commercial enzyme preparation. *Electr. J. Pol. Agric. Univers.*, 2006; 9, <http://www.ejpau.media.pl/volume9/issue1/art-26.html>. – 12. Donaghy J., Kelly P.F., McKay A.M.: Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and *Lactobacilli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998; 50, 257-260. – 13. Lewicki P.P.: Kiełki nasion jako źródło cennych składników odżywczych. *ŻNTJ*, 2010; 6(73), 18-33. – 14. Katina K., Liukkonen K.-H., Kaukovirta-Norja A., Adlercreutz H., Heinonen, S.-M., Lampi A.-M., Pihlava J.-M., Poutanen K.: Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *J. Cer Sci.*, 2007; 46(3), 348-355. – 15. Hung P.V., Maeda T., Yamamoto S., Morita N.: Effects of germination on nutritional composition of waxy wheat. *J. Sci. Food Agr.*, 2012; 92(3), 667-672. – 16. Paško P., Bartoń H., Zagrodzki P., Gorinstein S., Folta M., Zachwieja Z.: Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chem.*, 2009; 115(3), 994-998. – 17. Moongngarm A., Saetung N.: Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chem.*, 2010; 122(3), 782-788. – 18. Sharma P., Gujral H.S.: Antioxidant and polyphenol oxidase activity of germinated barley and its milling fractions. *Food Chem.*, 2010; 120(3), 673-678.

Adres: 10-957 Olsztyn, Pl. Cieszyński 1.