

*Joanna Chłopiczka, Henryk Bartoń, Maria Folta, Aleksandra Baster*

## WPŁYW FERMENTACJI MLEKOWEJ NA AKTYWNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNĄ NASION I KIEŁKÓW GRYKI (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*)

Zakład Bromatologii, Collegium Medicum  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie  
Kierownik: dr hab. P. Zagrodzki

*Celem pracy było porównanie fermentacji mlekowej nasion i kiełków trzech odmian gryki. Do fermentacji użyto bakterie szczepu *Lactobacillus rhamnosus*, monitorując w ciągu 7 dni kwasowość ogólną, pH, aktywność antyoksydacyjną i całkowitą zawartość polifenoli. Początkowa zawartość polifenoli i aktywność antyoksydacyjna nasion stanowiła 3–6% wartości dla kiełków, a po fermentacji proporcja ta wzrosła do 10–16%. W trakcie fermentacji nastąpił 5-krotny wzrost wartości tych parametrów dla nasion i 3-krotny dla kiełków. Fermentowane kiełki gryki uzyskały wyższe od nasion pH oraz 3–5-krotnie wyższą, zróżnicowaną dla badanych odmian, kwasowość ogólną. Fermentacja mlekowa kiełków może podwyższyć ich trwałość i polepszyć przyswajalność aktywnych biologicznie składników.*

Hasła kluczowe: probiotyki, fermentacja mlekowa, żywność funkcjonalna, gryka, kiełki.

Key words: probiotics, lactic fermentation, functional food, buckwheat, sprouts.

Kiełkowanie nasion jest jedną z metod modyfikacji żywności, w trakcie którego uaktywniony zostaje enzymatyczny system, który inicjuje rozkład związków wielkocząsteczkowych do prostych (cukry, aminokwasy), powoduje odłączanie cząsteczek aglikonowych od glikozydów (polifenole) oraz stymuluje biosyntezę aktywnych biologicznie związków (np. witaminy) kosztem zużywania zmagazynowanej skrobi (1–2). Zatem, w porównaniu do nasion, kiełki są uboższe energetycznie i bogatsze w niskocząsteczkowe składniki aktywne biologicznie, łatwiej dostępne dla organizmu (3).

Jednak kiełki nie znalazły dotychczas w Polsce szerokiego zastosowania w diecie. Do czynników utrudniających zastosowanie kiełków w żywieniu człowieka należy przede wszystkim długotrwały proces kiełkowania, ryzyko rozwoju niepożądanego i chorobotwórczej flory bakteryjnej (*Salmonella*, *E. coli*, *Listeria*, *Clostridium*), a także nietrwałość produktu końcowego.

Fermentacja żywności jest metodą modyfikacji żywności, opierającą się również na procesach enzymatycznych, ale inicjowanych przez bakterie (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) lub/i grzyby. Żywność fermentowana uzyskuje cechy korzystne, podobne jak w procesie kiełkowania (obniżona zawartość skrobi i fitynianów, zwiększone stężenie składników aktywnych biologicznie) (4). Ponadto takie produkty są bardziej

trwale chemicznie (środowisko beztlenowe) i biologicznie (środowisko kwasowe, hamujące rozwój niepożądaných mikroorganizmów). Następuje też zmiana ich walorów organoleptycznych (smak, zapach, barwa). Do przeprowadzenia fermentacji, w odróżnieniu od procesu kiełkowania, możliwy jest wybór rodzaju mikroorganizmów, a także dowolnie przetworzonego produktu poddawanego temu procesowi. Stwarza to możliwości uzyskania różnorodnych produktów z tego samego surowca. Mimo, że fermentacja żywności jest znana i stosowana od dawna, możliwości rozszerzania puli fermentowanych produktów są nadal ogromne. Ponadto tak przetworzone produkty spożywcze mogą uzyskać cechy żywności funkcjonalnej.

Jako kontynuację badań dotyczących procesów fermentacji mlekowej produktów roślinnych (5–6), prezentujemy wyniki badań, których celem była ocena wpływu kiełkowania i fermentacji mlekowej na aktywność antyoksydacyjną i parametry kwasowości nasion i kiełków gryki.

## MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto trzy odmiany nasion gryki: 1) Kora, 2) Panda, 3) PA15 uzyskane z Zakładu Uprawy Roślin Zbożowych w Palikijach (woj. lubelskie). Kiełki wyhodowano z nasion gryki w trzy poziomowych naczyniach do kiełkowania w ciągu 7 dni w warunkach: pokojowa temperatura i oświetlenie, płukanie przegotowaną wodą 2 razy na dobę. Do fermentacji użyto 50 g rozdrobnionych kiełków lub 20 g nasion, dodano 5 g glukozy, zawiesinę bakterii w wodzie (1 ampułka preparatu Lacid®, szczep *L. rhamnosus*), uzupełniono wodą do 250 mL, naczynia zamknięto, wypełniono argonem i umieszczono w temp. 30°C. Po ok. 2 godz. pobrano po 10 mL próbek zawiesin a kolejne po 1, 2, 3 i 7 dniach. Próbkę początkową traktowano jako ekstrakty wodne wyjściowych nasion i kiełków lub zakwasy w dniu 0, a próbki dalsze jako zakwasy fermentacyjne. Próbkę odwirowano, a w supernatantach oznaczono kwasowość ogólną przez miareczkowanie alkalimetryczne 0,1M NaOH, zmierzono pH i oznaczono aktywność antyoksydacyjną (FRAP (6), DPPH) przy użyciu spektrofotometrycznego czytnika mikroplótkowego Synergy 2 (Biotek/USA). Aktywność przeciwrodnikową (DPPH) oznaczono w metanolowym roztworze buforu octanowego, a wartości wyznaczono metodą ekstrapolacji do stężenia zero (7). Całkowitą zawartość polifenoli (PF) oznaczono za pomocą odczynnika Folin-Ciocalteau. W celu standaryzacji wyniki oznaczeń w roztworach wyrażono w przeliczeniu na 1 g suchej masy (s.m.) użytego materiału roślinnego i tej konwencji omawiano w tekście. Istotność różnic szacowano testem par t-Studenta i przyjmowano za istotne przy kryterium  $p < 0,05$ . W opracowaniu danych wykorzystano głównie pakiet Statistica 5.1 (*Statsoft Inc.*).

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Średnie wartości parametrów kwasowości w czasie 7-dniowej fermentacji zawiera tabela I. Zróżnicowanie pH między trzema odmianami gryki nie było istotne statystycznie, a wartości pH zmieniały się istotnie do trzeciego dnia fermentacji. Nie było różnic pomiędzy wartościami kwasowości ogólnej fermentowanych trzech odmian nasion gry-

ki ( $0,36 \pm 0,07$  mM/g,  $p > 0,05$ ). Istotnie zróżnicowana była natomiast kwasowość kiełków fermentowanych ( $0,77$ – $1,70$  mM/g s.m.; odmiany 1 & 2:  $p = 0,02$ ; 1 & 3:  $p = 0,04$ ; 2 & 3:  $p = 0,14$ ), a także kiełków i nasion tych samych odmian gryki ( $p = 0,02$ – $0,05$ ). Kwasowość fermentowanych nasion stanowiła ok.  $\frac{1}{4}$  (24–29%) kwasowości fermentowanych kiełków. Duża różnica kwasowości fermentowanych kiełków i nasion może wynikać z różnic zawartości cukrów prostych w kiełkach (2–3%) (8), w odróżnieniu od nasion (1,43–1,96%) (9).

Tabela I. Wskaźniki kwasowości fermentowanych nasion i kiełków gryki

Table I. Acidity indices of fermented buckwheat seeds and sprouts

Czas /dni/	pH			Kwasowość ogólna [mM/g s.m.]		
	Kiełki (KG)	Ziarno (ZG)	Różnica	Kiełki (KG)	Ziarno (ZG)	
	Średnia	Średnia	KG – ZG	Średnia	Średnia	ZG vs KG
0	$4,12 \pm 0,06^a$	$4,21 \pm 0,04^a$	-0,09	$0,01 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00^a$	
1	$3,47 \pm 0,04^b$	$3,23 \pm 0,06^b$	+0,23	$0,18 \pm 0,07$	$0,04 \pm 0,01$	24%
2	$3,36 \pm 0,07^b$	$3,11 \pm 0,06^b$	+0,25	$0,55 \pm 0,35$	$0,15 \pm 0,04$	26%
3	$3,09 \pm 0,06^b$	$3,06 \pm 0,09^b$	+0,03	$0,98 \pm 0,50$	$0,26 \pm 0,04$	27%
7	$3,15 \pm 0,13^b$	$3,05 \pm 0,06^b$	+0,11	$1,25 \pm 0,46$	$0,36 \pm 0,07^b$	29%

\* dane w kolumnach różniące się istotnie oznaczono różnymi literami

W Tabeli II i III przedstawiono wartości parametrów antyoksydacyjnych nasion i kiełków przed fermentacją oraz w trakcie 7-dniowej fermentacji. Aktywności niefermentowanych nasion i kiełków były istotnie różne ( $p < 0,05$ ), a odpowiednie proporcje miały wartości 3–6%.

W trakcie fermentacji nasion następuje znaczne podwyższenie aktywności antyoksydacyjnej, co pokazują wartości procentowe (300–400%). W odróżnieniu od nasion, wzrost aktywności kiełków po fermentacji nie przekracza 100%. Mimo wielokrotnego wzrostu aktywności antyoksydacyjnej nasion, ich aktywność po fermentacji stanowiła tylko 10–16% aktywności kiełków i proporcje te nie zmieniły się istotnie nawet po uwzględnieniu masy łusek (10).

Tabela II. Aktywność antyoksydacyjna FRAP nasion i kiełków gryki w trakcie 7-dniowej fermentacji

Table II. Antioxidant activity FRAP of buckwheat seeds and sprouts during 7-days fermentation

Czas /dni/	FRAP (4', 25°C)			FRAP (30')		
	$\mu\text{M/g s.m.}$			$\mu\text{M/g s.m.}$		
	Kiełki (KG)	Ziarno (ZG)	ZG vs KG	Kiełki (KG)	Ziarno (ZG)	ZG vs KG
0	$43,6 \pm 18,0$	$1,35 \pm 0,30$	3%	$76,1 \pm 29,6$	$2,12 \pm 0,39$	3%
1	$22,3 \pm 4,5$	$1,17 \pm 0,14$	5%	$37,3 \pm 6,5$	$1,88 \pm 0,25$	5%
2	$68,9 \pm 8,6$	$3,81 \pm 1,82$	6%	$106,4 \pm 10,2$	$5,82 \pm 2,71$	5%
3	$60,9 \pm 6,0$	$4,88 \pm 0,43$	8%	$94,8 \pm 6,7$	$7,34 \pm 0,56$	8%
7	$59,7 \pm 7,0$	$5,72 \pm 0,16$	10%	$92,3 \pm 7,4$	$8,79 \pm 0,31$	10%
Zmiana %	37%	323%*		21%	313%*	

\* efekt istotny statystycznie

Tabela III. Zawartość polifenoli (PF) i aktywność przeciwrodnikowa (DPPH) nasion i kiełków gryki

Table III. Total polyphenols (PF) and antiradical activity (DPPH) of buckwheat seeds and sprouts

Czas fermentacji /dni/	DPPH (25°C, 60')			PF (25°C)		
	μM Trx/g s.m.			μM GA/g s.m.		
	Kiełki (KG)	Ziarno (ZG)	ZG vs KG	Kiełki (KG)	Ziarno (ZG)	ZG vs KG
0	23,3 ± 8,3	0,81 ± 0,10	3%	44,2 ± 15,5	2,57 ± 0,93	6%
1	16,2 ± 3,7	0,81 ± 0,11	5%	24,1 ± 4,6	1,87 ± 0,43	8%
2	41,3 ± 3,6	2,34 ± 1,14	6%	64,0 ± 5,8	5,48 ± 2,38	9%
3	38,9 ± 4,5	3,25 ± 0,33	8%	53,3 ± 13,6	7,17 ± 0,40	13%
7	44,1 ± 1,5	4,21 ± 0,12	10%	62,0 ± 4,7	9,74 ± 1,91	16%
Zmiana %	89%	417%*		40%	279%	

\* efekt istotny statystycznie; PF – całkowita zawartość polifenoli; GA – równoważnik kwasu galusowego, Trx – równoważnik troloksu

Aktywność (DPPH) nasion gryki po 2 dniach fermentacji była podobna do wartości podanych przez innych badaczy dla ekstraktów metanolowych:  $2,13 \pm 0,05 \mu\text{M/g}$  (8). Zawartość polifenoli po fermentacji nasion gryki ( $9,74 \pm 1,91 \mu\text{M/g}$ ) była zbliżona do wartości dla ekstraktu białej mąki gryczanej ( $9,94 \pm 3,6 \mu\text{M/g}$ ) (8), natomiast w kiełkach niefermentowanych ( $44,2 \pm 15,5 \mu\text{M/g}$ ) była porównywalna z wynikami badań innych autorów (3). Przykłady te ilustrują zbieżność uzyskanych wyników z danymi z piśmiennictwa.

## WNIOSKI

1. Kiełkowanie nasion gryki powodowało znaczny wzrost wartości parametrów antyoksydacyjnych (FRAP, DPPH, PF), ale nie wpływało na wskaźniki kwasowości.

2. Fermentacja nasion gryki spowodowała kilkakrotny, istotny wzrost wartości parametrów antyoksydacyjnych, natomiast w przypadku fermentacji kiełków, obserwowany wzrost był nieistotny statystycznie.

3. W czasie fermentacji obniżyło się pH, a kwasowość wzrosła, zmiany te były bardziej znaczne w przypadku kiełków, niż nasion.

J. Chłopicka, H. Bartoń, M. Fołta, A. Baster

INFLUENCE OF LACTIC FERMENTATION ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BUCKWHEAT SEEDS AND SPROUTS (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*)

Summary

The aim of the study was to compare lactic fermentation of seeds and sprouts of three varieties of buckwheat. *Lactobacillus rhamnosus* lactic acid bacteria strain was used for fermentation. During 7 days of fermentation the following parameters were monitored: pH, total acidity, antioxidant activity and total polyphenol content. Initial content of polyphenols and antioxidant activity of seeds accounted for 3-6% of the value for sprouts and after fermentation, the proportion had increased to 10-16%. During

the fermentation time there was a 5-fold increase in the value of these parameters for seeds and 3-fold for sprouts. Fermented buckwheat sprouts scored higher pH of seeds and 3-5 times higher total acidity, significantly different for the tested varieties. Lactic fermentation of sprouts may increase their durability and improve bioavailability of biologically active ingredients.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Sharma P., Ghimeray A.K., Gurung A., Jin C.W., Rho H.S., Cho D.H.: Phenolic contents, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibition properties of Nepalese strain buckwheat vegetables, *African J. Biotechnol.*, 2012; 11(1): 184-190. – 2. Kim, S. L., Kim, S. K., Park, C.H.: Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable. *Food Res. Int.*, 2004; 37(4): 319-327. – 3. Alvarez-Jubete, L., Wijngaard, H., Arendt, E. K., Gallagher, E.: Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chem.*, 2010; 119(2): 770-778. – 4. Hole A.S., Rud I., Grimmer S., Sigl S., Narvhus J., Sahlstorm S.: Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *J. Agr. Food Chem.*, 2012; 60: 6369-6375. – 5. Bartoń H., Fortuna M., Folta M., Chłopicka J.: Wpływ procesu fermentacji mlekowej na stężenie cynku i miedzi w zakwasach uzyskanych z przetworów różnych rodzajów zbóż i pseudozbóż. *Brom. Chem. Toksykol.*, 2015; XLVIII(3): 229-235. – 6. Bartoń H., Fortuna M., Folta M.: Właściwości antyoksydacyjne wybranych produktów fermentacji mlekowej. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2012; XLV(3): 803-807. – 7. Barton H.J.: A „zero sample concentration approach”. Standardization of methods for the estimation of total antioxidant activity by the use of extrapolation to zero sample concentration. A novel standard. Part 1. ABTS cation radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.*, 2010; 58(16): 8918-8926. – 8. Şensoy, İ., Rosen, R. T., Ho, C. T., Karwe, M. V. Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. *Food Chem.*, 2006, 99(2): 388-393. – 9. Bartoń H.J., Folta M., Chłopicka J., Zachwieja Z., Gumul D.: Badania aktywności przeciwutleniającej nasion pięciu odmian gryki (*Fagopyrum esculentum Moench*). *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; XXXVIII(supl.): 71-74. – 10. Dziadek, K., Kopeć, A., Pastucha, E., Piątkowska, E., Leszczyńska, et al.: Basic chemical composition and bioactive compounds content in selected cultivars of buckwheat whole seeds, dehulled seeds and hulls. *J. Cereal Sci.*, 2016; 69: 1-8.

Adres: 30-688 Kraków, ul. Medyczna 9.