

Henryk Bartoń, Małgorzata Fortuna, Maria Folta, Joanna Chlopicka

WPŁYW PROCESU FERMENTACJI MLEKOWEJ NA STĘŻENIE CYNKU I MIEDZI W ZAKWASACH UZYSKANYCH Z PRZETWORÓW RÓŻNYCH RODZAJÓW ZBÓŻ I PSEUDOZBÓŻ*

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

*Celem pracy było zbadanie przechodzenia miedzi i cynku do frakcji wodnej (zakwasu) podczas fermentacji mlekowej przetworów nasion zbóż i pseudozbóż (ryż, owies, żyto, orkisz, proso, gryka, len, amarantus, soczewica, pszenica, kukurydza). Do fermentacji użyto kultury naturalnej z mąki żytniej i *Lactobacillus rhamnosus*. Analizy wykonano metodą płomieniową absorpcyjnej spektrometrii atomowej. Stężenia metali w zakwasach były proporcjonalne do ich zawartości w materiale wyjściowym – dla cynku w całym zakresie wartości a dla miedzi od zawartości ok. 0,5 mg/100 g. Wydajność ekstrakcji wynosiła średnio 75% dla cynku i 46% dla miedzi w zakresie liniowości a poniżej tego zakresu była marginalna. Fermentacja mlekowa może modyfikować dostępność składników mineralnych dla organizmu.*

Hasła kluczowe: fermentacja mlekowa, zboża, pseudozboża, cynk, miedź
Key words: lactic fermentation, cereals, pseudocereals, zinc, copper

Zboża, ze względu na wysoką wydajność plonów, stanowią podstawę wyżywienia ludności. W Europie uprawiana jest głównie pszenica, w Azji ryż, na obszarze Ameryki kukurydza, a w Afryce sorgo. W Polsce uprawia się głównie pszenicę zwyczajną, żyto i pszenżyto. Ponadto uprawiane są różne odmiany jęczmienia, kukurydzy, owsa oraz proso. Wzrasta także zainteresowanie pseudozbożami, między innymi gryką (*Polygonaceae*), amarantusem (*Amaranthus cruentus*) i komosą ryżową (*Chenopodium quinoa*). Głównymi składnikami zbóż i pseudozbóż są węglowodany oraz białka jak również tłuszcze i błonnik (1). W zbożach występują naturalne przeciwutleniacze, w szczególności fenolokwasy oraz ich estry i glikozydy, flawonoidy (gryka), awentramidy (owies), lignany (fitoestrogeny), tokoferol i karotenoidy. Zboża zawierają także, głównie w okrywie, szereg składników mineralnych (Zn, Cu, Fe, Se, Mn), które wchodzi w skład enzymów ochrony antyoksydacyjnej organizmu i pełnią rolę w kluczowych procesach życiowych. Zboża stanowią główne źródło miedzi oraz istotne źródło cynku w diecie Europejczyków (2).

Przetwarzanie biologiczne żywności, między innymi poprzez fermentację mlekową znajduje coraz większe zainteresowanie badaczy i konsumentów. Proces fer-

* Projekt był finansowany ze środków na działalność statutową w ramach UJ Collegium Medicum (K/ZDS/003297).

mentacji mlekowej może konserwować żywność i polepszać jej atrakcyjność dietetyczną, a także wywoływać potencjalnie korzystne dla zdrowia zmiany chemiczne oraz modyfikować dostępność składników żywności dla organizmu. Wiąże się to również z odkrywaną coraz ważniejszą rolą flory bakteryjnej organizmu człowieka dla zdrowia (3). Kontynuując rozpoczęte wcześniej badania (4), przedstawiamy obecnie wyniki badań związanych z przechodzeniem (ekstrakcją) cynku i miedzi do fazy wodnej (zakwasu) w trakcie fermentacji mlekowej przetworów różnych zbóż i pseudozbóż dostępnych na rynku produktów spożywczych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły produkty zbożowe (produkty wyjściowe) przedstawione w tabeli I. W badaniach zastosowano dwa szczepy bakteryjne: dwuskładnikowy szczep wyhodowany z mąki żytniej z rejonu woj. podkarpackiego oznaczony jak A, którego jeden składnik został zidentyfikowany jako *Lactobacillus paracasei* oraz *Lactobacillus rhamnosus* (nazwa handlowa Lakcid) oznaczony jak B (4). Fermentację prowadzono beztlenowo przez 14 dni w temp. 30°C, jak opisano uprzednio (4).

W celu oznaczenia pierwiastków sproszkowane produkty wyjściowe w ilości 0,5 g mineralizowano w temperaturze pokojowej z 3 ml kwasu azotowego 65% (Suprapure, Merck) przez 24 godz., następnie naświetlano średniociśnieniową lampą rtęciową 500W do rozpuszczenia osadu (ok. 4 godz.), utrzymując stan łagodnego wrzenia. Próbkę zakwasów w ilości 5 ml zadano 1 ml kwasu azotowego 65% i pozostawiono na dwa tygodnie. Przed analizą próbki rozcieńczono wodą do 15 ml i odwirowano.

Oznaczenie stężeń Zn i Cu w mineralizatach wykonano standardową metodą płomieniową (acetylen/powietrze, palnik 10 cm, szczelina 0,7 mm, analityczna długość fali Cu 324,8 nm, Zn 213,9 nm, zakres kalibracji 0–2 mg/l) za pomocą spektrometru atomowego 5100 ZL (Perkin Elmer, USA). Wzorce i próbki rozcieńczano 0,5% kwasem azotowym. Wyniki stanowią średnie z trzech pomiarów.

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem pakietu Statistica for Windows 5.1 (Statsoft, inc.). Wyniki oznaczeń zawartości Zn i Cu w produktach wyjściowych i zakwasach, wyrażono w miligramach składnika na 100 g produktu wyjściowego użytego do fermentacji. Efektywność przechodzenia metalu do zakwasu (wydajność, stopień ekstrakcji) wyrażono w procentach (%E) jako ilość składnika przechodzącego do fazy wodnej (zakwasu) po fermentacji w stosunku do oznaczonej całkowitej zawartości w produkcie wyjściowym.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Oznaczone zawartości cynku i miedzi w badanych produktach zbożowych oraz udział frakcji przeniesionej do fazy wodnej po 14-dniowej fermentacji zestawiono w tabeli 1. W dalszej części pracy przedstawiono wyniki analizy korelacyjnej oznaczonych parametrów i innych dostępnych parametrów dotyczących badanych produktów.

Oznaczone zawartości Zn i Cu w badanych zbożach, poza kilkoma wyjątkami, były zbliżone z danymi z bazy *U.S. Department of Agriculture* (USDA, 5).

Tabela 1. Zawartość cynku i miedzi w badanych produktach oraz procent ich ekstrakcji do zakwasu podczas fermentacji mlekowej

Table 1. Zinc and copper content in investigated foods and percent of its solubilization to sourdough during lactic fermentation

Nr	Produkt	Cynk				Miedź			
		Zawartość w surowcu [mg/100g]		% Ekstrakcji (Zn%E)		Zawartość w surowcu [mg/100g]		% Ekstrakcji (Cu%E)	
		Oznaczona	Literaturowa	Szczep A	Szczep B	Oznaczona	Literaturowa	Szczep A	Szczep B
1	Brązowy ryż z Camarunge	1,88±0,02	2,45	99	81	0,36±0,01	0,23	1	4
2	Płatki owsiane błyskawiczne	2,16±0,02	3,97	106	88	0,22±0,01	0,63	0	0
3	Płatki żytnie ekologiczne	2,24±0,01	2,65	97	89	0,28±0,01	0,37	0	1
4	Kasza jaglana	2,40±0,02	1,68	104	91	0,27±0,01	0,75	9	4
5	Mąka kukurydziana	0,77±0,01	1,73	~100	~100	0,05±0,01	0,23	2	9
6	Nasiona lnu	8,33±1,29	4,34 (7,8*)	54		1,22±0,10	1,22	24	24
7	Nasiona amarantusa	3,50±0,76	2,87 (3,65*)	26	30	0,57±0,09	0,52	60	24
8	Nasiona pszenicy	4,26±0,15	2,66 (3,11*)	~100	~100	0,15±0,01	0,46	56	57
9	Soczewica zielona	3,43±0,74	4,78	29	55	0,67±0,01	0,52	37	44
10	Mąka gryczana	3,19±0,79	3,12	31	46	0,60±0,01	0,52	29	33
11	Soczewica czerwona	4,53±1,08	3,90	71	77	0,84±0,11	1,30 (0,85*)	88	80
12	Płatki orkiszowe	3,25±0,04	3,28	81	61	0,45±0,01	0,51	2	3
13	Ryż biały długi	1,82±0,29	0,80	79	65	0,25±0,01	0,13	0	0

Legenda: Zawartość pierwiastków w produkcie wyjściowym oznaczona, literaturowa wg bazy USDA (5) i z innych* źródeł; % Ekstrakcji określony jako stosunek ilości pierwiastka przechodzącego z materiału wyjściowego do zakwasu wyrażony w procentach; A i B – robocze symbole szczepów użytych do fermentacji (4)

Względne wydajności ekstrakcji cynku (Zn%E) i miedzi (Cu%E) różniły się istotnie ($p < 0,001$). Rodzaj szczepu (A, B) nie wpływał na wydajność ekstrakcji cynku w przypadku większości produktów (test t dla par: $P = 0,20$; korelacja Pearsona: $r = 0,83$; $p < 0,001$). Średnia wydajność ekstrakcji Zn wynosiła 75% (mediana 80%). Nieco niższe wydajności otrzymano dla szczepu A w przypadku płatków owsianych i kaszy jaglanej. Najniższe wartości wystąpiły w przypadku amarantusa, soczewicy zielonej i mąki gryczanej. Praktycznie ilościowa ekstrakcja zachodziła w przypadku ryżu brązowego, mąki kukurydzianej i pszenicy. Największą rozbieżność zaobserwowano dla nasion lnu, co może wiązać się z dużą lepkością tych zakwasów.

Wydajność ekstrakcji miedzi z surowców dla obu szczepów była podobna (test t dla par: $P=0,55$), co potwierdziła również korelacja Pearsona ($r=0,92$; $p<0.001$). Efektywność ekstrakcji miedzi wynosiła średnio 23% a mediana 9%. Wysokie efektywności ekstrakcji miedzi do zakwasów (ok. 2/3 zawartości w surowcu) wykazała soczewica czerwona, mąka pszenna i nasiona amarantusa, a o połowę mniejsze nasiona lnu i mąki gryczanej. W pozostałych przypadkach wartości były niskie, w zakresie 0-9%.

W celu dalszego wyjaśnienia obserwowanych różnic w ekstrakcji badanych metali do fazy wodnej z różnych produktów, przeanalizowano korelacje pomiędzy parametrami badanych składników mineralnych, włączając również opisane uprzednio (4) wskaźniki kwasowości (pH, pojemność kwasowa) (tabela II). Ze względu na statystycznie nieistotne różnice zbiorów parametrów dla szczepów A i B, dane użyte do analizy korelacyjnej stanowiły średnie z wartości parametrów dotyczących tego samego produktu wyjściowego fermentowanego za pomocą obu szczepów.

Tabela II. Korelacje Pearsona parametrów badanych zbóż i produktów fermentacji

Table II. Pearson correlations of parameters of investigated cereals and products of fermentation

	pH	KW	Zn _o	Zn _z	Zn%E	Cu _o	Cu _z	Cu%E
pH		-0,17	0,70	0,14	-0,87	0,78	0,43	0,34
		p=0,582	p=0,008	p=0,645	p=0,000	p=0,002	p=0,144	p=0,253
KW	-0,17		0,14	0,25	0,04	0,17	0,65	0,69
	p=0,582		p=0,652	p=0,406	p=0,893	p=0,572	p=0,016	p=0,009
Zn _o	0,70	0,14		0,74	-0,60	0,86	0,57	0,49
	p=0,008	p=0,652		p=0,004	p=0,030	p=0,000	p=0,041	p=0,091
Zn _z	0,14	0,25	0,74		0,05	0,37	0,32	0,42
	p=0,645	p=0,406	p=0,004		p=0,875	p=0,212	p=0,286	p=0,158
Zn%E	-0,87	0,04	-0,60	0,05		-0,80	-0,47	-0,30
	p=0,000	p=0,893	p=0,030	p=0,875		p=0,001	p=0,106	p=0,325
Cu _o	0,78	0,17	0,86	0,37	-0,80		0,73	0,46
	p=0,002	p=0,572	p=0,000	p=0,212	p=0,001		p=0,005	p=0,114
Cu _z	0,43	0,65	0,57	0,32	-0,47	0,73		0,87
	p=0,144	p=0,016	p=0,041	p=0,286	p=0,106	p=0,005		p=0,000
Cu%E	0,34	0,69	0,49	0,42	-0,30	0,46	0,87	
	p=0,253	p=0,009	p=0,091	p=0,158	p=0,325	p=0,114	p=0,000	

* Dane dotyczące zakwasów wykorzystane do korelacji stanowiły średnie oznaczonych wartości parametrów z użyciem szczepów A i B; dane z indeksem „o” i „z” dotyczą odpowiednio, produktów wyjściowych i zakwasów; korelacje istotne statystycznie ($p<0,05$) zaznaczono czcionką pogrubioną. Do korelacji wykorzystano parametry z publikacji (2): pH zakwasu i KW – kwasowość ogólna zakwasu (mmol/g produktu wyjściowego) oraz parametry z niniejszej pracy opartej na (1); Zn_o; Cu_o – całkowita zawartość metali w produkcie wyjściowym (mg/100 g); Zn_z, Cu_z – zawartość metali w zakwasie (frakcja wyekstrahowana) w przeliczeniu na produkt wyjściowy użyty do fermentacji (mg/100g); Zn%E; Cu%E – efektywność ekstrakcji pierwiastka do zakwasu wyrażona w % jako stosunek frakcji metalu w zakwasie do jego całkowitej zawartości w surowcu.

Dodatnie korelacje występowały pomiędzy zawartością pierwiastka w produktach wyjściowych i w zakwasach, dla obu metali współczynniki korelacji były podobne (r 0,73-0,74). Oznacza to, że przechodząca do roztworu frakcja badanych metali jest proporcjonalna do ich zawartości w surowcu. Szczególnie dla cynku, analiza korelacyjna i graficzna wykazała liniowy charakter korelacji ($Zn_z = 0,49 \times Zn_o + 0,65$; $R^2=0,55$) w całym zakresie zawartości Zn w surowcach.

Szczegółowa analiza takiej zależności dla miedzi sugeruje, że może ona mieć charakter złożony, mimo, że korelacja obejmująca wszystkie dane była istotna statystycznie (Cu_z i Cu_o : $r=0,73$; $p=0,005$). Dla ponad połowy badanych zbóż, o zawartości Cu w materiale wyjściowym poniżej 0,5 mg/100g (produkty 1–5 i 12–13), miedź pozostaje w osadzie (średnia wydajność ekstrakcji w obrębie tej grupy wynosi 3%), a dopiero powyżej tej wartości ulega ekstrakcji do fazy wodnej ze średnią wydajnością 46%. Dla tych ostatnich przypadków zaobserwowano dodatnią zależność wydajności ekstrakcji, o nachyleniu zbliżonym do omówionej wyżej korelacji parametrów cynku (dla parametrów o wartościach $Cu\%E > 10\%$: $Cu_z = 0,37 Cu_o + 0,04$; $R^2 = 0,42$). Siemię lniane stosuje się do tej zależności z dużym ujemnym odchyleniem, co prawdopodobnie związane jest z wyższą lepkością roztworów.

Wyniki te sugerują, że ekstrakcję Cu przy jej małej zawartości w surowcu mogą ograniczać składniki fazy stałej silnie wiążące Cu (6), a miedź przechodzi do roztworu dopiero po wysyceniu aktywnych domen fazy stałej. Ta graniczna wartość, odpowiadająca pojemności fazy stałej badanych produktów może być w przybliżeniu oszacowana dla badanych zbóż na ok. 0,5 mg Cu/100g. Podobna analiza korelacji tych parametrów w ujęciu względnym, to znaczy, korelacji efektywności ekstrakcji metali (%E) z ich zawartością w surowcach, wykazała odwrotne zależności (cynk: $Zn\%E$ i Zn_o : $r = -0,60$; miedź: $Cu\%E$ i Cu_o : $r = -0,80$), chociaż ta ostatnia zbieżność wynika z silnej dodatniej korelacji zawartości obu metali w produktach zbożowych (Zn_o i Cu_o : $r = 0,86$). W szczególności, stopień przechodzenia cynku do fazy wodnej istotnie maleje z jego zawartością w surowcu ($Zn\%E$ i Zn_o : $r = -0,60$).

Dla miedzi zależność ta była dodatnia ale nie uzyskała istotności statystycznej ($Cu\%E$ i Cu_o : $r=0,46$, $p=0,114$), natomiast istotność uzyskała korelacja z frakcją Cu w fazie wodnej ($Cu\%E$ i Cu_z : $r=0,87$). Brak znamienności można wiązać ze wspomnianym wcześniej efektem marginalnej ekstrakcji miedzi w zakresie niskich zawartości Cu dotyczącej połowy przypadków.

W poszukiwaniu wyjaśnienia zaobserwowanych korelacji lub ich braku, w tym braku ekstrakcji przy niskiej zawartości Cu w produktach wyjściowych, przeanalizowano korelacje parametrów dotyczących pierwiastków ze wskaźnikami kwasowości (KW) i pH frakcji wodnych (tabela II). Wartości pH były dodatnio skorelowane z zawartością tak Zn (pH i Zn_o : $r = 0,70$) jak i Cu w produktach wyjściowych (pH i Cu_o : $r = 0,78$). Oznacza to spadek wytwarzania silnie zdysocjowanych kwasów lub wzrost buforowania wytwarzanych kwasów. Tę pierwszą możliwość sugeruje brak korelacji kwasowości ogólnej (KW) z zawartością tych metali w badanych zbożach (Zn_o , Cu_o). Można rozważyć hipotezę, że istotny wpływ na ten proces może mieć tylko jeden z badanych metali lub, ogólniej, że wpływ obu metali jest odmienny. Sugestia ta wiąże się z silną dodatnią korelacją zawartości Cu i Zn w zbożach (Zn_o i Cu_o : $r = 0,86$), czego konsekwencją są wyżej wymienione korelacje. Poparcie dla

tej hipotezy stanowi także istotna ujemna korelacja pH i stopnia ekstrakcji cynku ($Zn\%E$ i pH: $r=-0,87$), przy braku analogicznej korelacji dla miedzi oraz dodatnia korelacja kwasowości i stopnia ekstrakcji miedzi ($Cu\%E$ i KW: $r=0,69$) wobec braku takiej korelacji dla cynku. Dodatnia korelacja kwasowości i stężenia miedzi a także kwasowości i wydajności ekstrakcji miedzi do fazy wodnej (Cu_z i KW: $r=0,65$; $Cu\%E$ i KW: $r=0,69$) może oznaczać wzrost efektywności wiązania jonów miedzi przez wytwarzane kwasy organiczne lub skorelowane metabolity i zmniejszanie hamującego wpływu wolnych jonów Cu na ich produkcję. Obniżanie stężenia jonów wodorowych w fermentowanych zbożach można zatem interpretować jako wynik modyfikowania (i hamowania) fermentacji przez miedź naturalnie obecną w produktach spożywczych. Wpływ miedzi może wywoływać również inne, jakościowe zmiany końcowych produktów fermentacji, co jest aktualnie badane. Sugestia ta znajduje uzasadnienie w badaniach, w których wykazano znaczne osłabienie dynamiki fermentacji przy dodatku związków miedzi (7). Hamujące działanie dodatku miedzi na rozwój mikroorganizmów jest znane od dawna (8) i było badane w odniesieniu do fermentacji wina (9) i mleka (10). Wpływ metali na rozwój bakterii kwasu mlekowego, w kontekście zastosowania tych czynników dla polepszenia bezpieczeństwa i jakości żywności, podejmują też najnowsze badania (11).

WNIOSKI

1. Ekstrakcja cynku i miedzi z badanych produktów do zakwasów podlega złożonym procesom, a jej wydajność jest uzależniona od rodzaju pierwiastka i składników fermentowanego produktu
2. Proces fermentacji mlekowej może podlegać hamującemu wpływowi miedzi obecnej w produktach zbożowych, co może być wykorzystane praktycznie.
3. Fermentacja produktów roślinnych może modyfikować przyswajalność cynku i miedzi z żywności.

H. Bartoń, M. Fortuna, M. Fołta, J. Chłopicka

THE IMPACT OF LACTIC FERMENTATION ON THE SOLUBILIZATION OF ZINC AND COPPER FROM DIFFERENT TYPES OF CEREALS AND PSEUDO-CEREALS

Summary

The aim of the study was to investigate the transition of copper and zinc to the water fraction (sourdough) with lactic acid fermentation of cereals and pseudo-cereals (rice, oats, rye, spelt, millet, buckwheat, flax, amaranth, lentils, wheat, corn). Natural lactobacillus cultures of rye flour and *L. Rhamnosus* (Lacid) were used for fermentation. The analyses were performed by flame atomic absorption spectrometry. The concentrations of metals in sourdough were proportional to their content in the starting material: zinc throughout the whole value range, and copper above approx. 0.5 mg/100 g. The extraction efficiency was on average 75% for zinc, 46% for copper in terms of linearity, while below this threshold the concentration was marginal. Lactic acid fermentation can modify the availability of minerals for the body.

PIŚMIENNICTWO

1. *Gertig H., Przysławski J.*: Bromatologia, zarys nauki o żywności i żywieniu; Wyd. PZWŁ, Warszawa, 2006; 298–304. – 2. Normy żywienia dla populacji polskiej – nowelizacja, red. nauk.: Jarosz J., Instytut Żywności i Żywienia 2012, s.233. – 3. *Sekirov I., Russell S.L., Antunes L.C.M., Finlay B.B.*: Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.*, 2010; 90(3): 859-904. – 4. *Bartoń H., Fortuna M., Foltá M.*: Właściwości antyoksydacyjne wybranych produktów fermentacji mlekowej. *Brom. Chem. Toksykol.*, 2012; 45(3): 803-807. – 5. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search>. – 6. *Gyurcsik B., Nagy L.*: Carbohydrates as ligands: coordination equilibria and structure of the metal complexes. *Coordination Chem. Rev.*, 2000; 203(1): 81–149. – 7. *Podkowa K., Bartoń H., Foltá M., Dobrowolska-Iwanek J.*: Wpływ dodatku kompleksu chelatowego miedzi z glicyną na zawartość kwasów organicznych powstających w wyniku procesu fermentacji mąki żytniej, *Brom. Chem. Toksykol.*, 2014; 47(3): 681–686, 2014. – 8. *Vidal, M. T., Poblet, M., Constantf, M., Bordons A.*: Inhibitory effect of copper and dichlofluanid on *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 2001; 52.3: 223–229. – 9. *Spano G., Massa S.*: Environmental stress response in wine lactic acid bacteria: beyond *Bacillus subtilis*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2006; 32.2: 77-86. – 10. *Zhang L., Han X., Du M., Yi H., Li J, Zhang L.*: Effects of copper on the post acidification of fermented milk by *St. Thermophilus*. *J. Food Sci.*, 2012; 71(1): M25–28.
11. *Mrvčić J., Stanzer D., Stolic E., Stehlik-Tomas V.*: Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 28: 2771–2782.

Adres: 30–688 Kraków, ul. Medyczna 9.