

HANNA MISZKIEWICZ, JOANNA OKRAJNI, STANISŁAW BIELECKI

**ZMIANY ZAWARTOŚCI ORAZ AKTYWNOŚCI  
PRZECIWUTLENIAJĄCEJ POLIFENOLI I ALBUMIN GROCHU  
PODCZAS FERMENTACJI W BIOREAKTORZE SSSR**

Streszczenie

Celem pracy było określenie zmian zawartości i aktywności przeciwrodnikowej polifenoli i albumin grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*) podczas fermentacji z udziałem szczepu *Rhizopus oligosporus*, w bioreaktorze SSSR, z wymuszonym napowietrzaniem i mieszaniem.

Zawartość polifenoli w grochu fermentowanym w optymalnych warunkach mieszania i napowietrzania, wzrastała w ciągu całego procesu i po 72 h była ponad 3-krotnie (ekstrakty wodne) i 2-krotnie (ekstrakty acetonowe) wyższa od poziomu wyjściowego. Zastosowany w badaniach szczep *R. oligosporus* syntetyzował z dużą wydajnością: w 24. h procesu –  $\beta$ -glukozydazę (0,0068 J/mg),  $\alpha$ -glukozydazę (0,77 J/mg) i  $\beta$ -glukuronidazę (0,021 J/mg), a w 48. h –  $\alpha$ -amylazę (8,69 J/mg). W wyniku fermentacji uzyskano wzrost aktywności przeciwrodnikowej: ok. 2-krotny polifenoli rozpuszczalnych w wodzie i ok. 4-krotny polifenoli rozpuszczalnych w acetonie, wobec rodników DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>+</sup>. Otrzymane preparaty albumin i ich zdegradowanych form, z fermentowanego w bioreaktorze grochu, charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwrodnikową: ok. 2-krotnie w stosunku do surowca, 9-krotnie do owoalbuminy i 3-krotnie do BSA. Równocześnie była to 2-krotnie niższa aktywność przeciwrodnikowa w stosunku do syntetycznego przeciwutleniacza BHT. Produkt fermentacji grochu okazał się źródłem dobrej jakości białka, zawierającego aminokwasy egzogenne w ilości porównywalnej (lub wyższej) z zawartością aminokwasów egzogennych w wieprzowinie.

**Słowa kluczowe:** polifenole, albuminy, właściwości przeciwrodnikowe, rodniki DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>+</sup>, OH<sup>•</sup>

## Wprowadzenie

Aktywne biologicznie składniki pokarmowe, w szczególności naturalne przeciwutleniacze, znacznie zmniejszają ryzyko chorób cywilizacyjnych. Głównym źródłem przeciwutleniaczy są rośliny np. strączkowe, takie jak: soja, groch i fasola.

Przeciwutleniacze zawarte w surowcach roślinnych w czasie obróbki technologicznej ulegają różnym zmianom chemicznym, które mogą mieć skutek pozytywny

i powodować zwiększenie ich aktywności przeciwutleniającej lub prowadzić do ich rozkładu. Do zmian korzystnych zalicza się konwersję formy glikozydowej przeciwutleniaczy w formę aglikonową, zachodzącą przy udziale hydrolaz glikozydowych - głównie  $\beta$ -glukozydazy. Przemiany te towarzyszą procesom fermentacji nasion roślin strączkowych w stałym złożu przy udziale pleśni *Rhizopus oligosporus* [6].

Dobre właściwości przeciwutleniające wykazują również peptydy i białka roślin strączkowych [10]. Zdolność hamowania reakcji wolnorodnikowych związana jest głównie z obecnością w białkach aminokwasów siarkowych i hydrofobowych, takich jak: histydyna, lizyna, cysteina i arginina. Albuminy strączkowych (różnych odmian grochu i fasoli), bogate w aminokwasy siarkowe oraz lizynę, wykazują dobre właściwości przeciwrodnikowe, porównywalne z BHT. Białka, chroniąc przed skutkami utleniania inne składniki żywności, same ulegają modyfikacjom. Proces utleniania wpływa na ich strukturę (fragmentacja, polimeryzacja) i związane z nią właściwości żywieniowe. Zmienione oksydacyjnie białka są zazwyczaj bardziej podatne na działanie enzymów trawiennych. Zaobserwowano również pogorszenie strawności utlenionych białek [11].

Celem pracy było określenie zmian zawartości i aktywności przeciwrodnikowej polifenoli i albumin grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*) podczas fermentacji z udziałem szczepu *Rhizopus oligosporus*, w bioreaktorze SSSR, z wymuszonym napowietrzaniem i mieszaniem.

### **Material i metody badań**

Materiałem badawczym były nasiona grochu (*P. sativum*) odmiany Lens Agra, zakupione w firmie handlowej UNGERT, moczone w 0,85 % roztworze kwasu mlekowego (1:3 m/v, nasiona:roztwór kwasu) przez 12 h w temp.  $23 \pm 2$  °C, obłuszczone ręcznie, autoklawowane i zaszczipiane zawiesiną spor, w ilości 1 % (v/m). Fermentację nasion prowadzono w fermentorze SSSR (Swing Solid State Reactor), niemieckiej firmy Tec-Bio w warunkach zoptymalizowanych we wcześniejszych badaniach (wypełnienie bioreaktora - 70 %, napowietrzanie - 5,0 l/min  $\times$  kg), w temp. 37 °C, w ciągu 72 h [7].

W procesie fermentacji stosowano szczep *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710, pochodzący z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej, przechowywany na skosach dekstrozowo-agarowych w temp. 4 °C i uaktywniany co miesiąc. Inokulum przygotowano przez zmycie skosów agarowych ze szczepem *R. oligosporus* 4 cm<sup>3</sup> 0,1 % roztworu Tween 80. Otrzymaną zawiesiną spor o gęstości 10<sup>6</sup> jtk/cm<sup>3</sup> (1 cm<sup>3</sup>/100 g) szczepiono złoże.

Aktywność badanych enzymów (J/mg białka zawartego w ekstrakcie) oznaczano w ekstraktach wodnych przygotowanych jak poniżej, poddanych 24-godzinnej ( $\beta$ -glukuronidaza) lub 48-godzinnej ( $\alpha$ -amylaza,  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukozydaza) dializie wobec

wody destylowanej w temp. 4 °C (odcięcie  $12 \cdot 10^3$ -  $14 \cdot 10^3$  Da), metodami ogólnie przyjętymi w biochemii, w temp. 50 °C, w środowisku o pH 4,8. Jako jednostkę aktywności enzymu przyjęto ilość mikromoli produktu uwolnionego z substratu w ciągu 1 min. Uwalnianymi produktami były: maltoza ze skrobi rozpuszczalnej w wyniku działania amylazy, glukoza z maltozy lub z salicyny przy udziale  $\alpha$ -glukozydazy i  $\beta$ -glukozydazy odpowiednio oraz 4-nitrofenol z 4-nitrofenylo- $\beta$ -D-glukuronidu pod wpływem działania  $\beta$ -glukuronidazy [6].

Albuminy izolowano z alkalicznych ekstraktów (pH 9,2) liofilizowanych próbek fermentowanego grochu po 0, 24, 48 i 72 h procesu, na drodze dializy wobec wody dejonizowanej (72 h, temp. ok. 4 °C). Zastosowano woreczki dializacyjne firmy Sigma o odcięciu  $12 \cdot 10^3$  Da. Powstały osad globulin oddzielano przez odwirowanie, a uzyskany supernatant stanowił roztwór albumin stosowany do badań [11].

Białko rozpuszczalne oznaczano metodą Bradforda [1], wyniki odczytywano z krzywej wzorcowej opisującej zależność absorbancji, przy dł. fali 595 nm, od stężenia albuminy wołowej.

Właściwości przeciwutleniające ekstraktów albumin badano wobec stabilnych syntetycznych rodników DPPH<sup>•</sup>, kationorodników ABTS<sup>•+</sup> oraz rodników OH<sup>•</sup>, wytworzonych z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pod wpływem jonów Cu<sup>2+</sup>, w obecności katalizatora ditioerytritolu [11]. Miarą aktywności przeciwutleniającej albumin był stopień redukcji rodników [%], obliczony jako [(absorbancja próby kontrolnej - absorbancja próby badanej)/(absorbancja próby kontrolnej)×100].

Zmiany albumin pod wpływem rodników obserwowano na podstawie rozdzielów elektroforetycznych metodą SDS-PAGE w aparacie Mini-Protean 3, firmy BIO-RAD, stosując bufor lizujący, zawierający 5 % (v/v) 2-merkaptoetanolu i 15 % żele poliakrylamidowe barwione roztworem zawierającym metanol, lodowaty kwas octowy i wodę (5:1:4) oraz 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R [5].

Polifenole zawarte w grochu po 0, 24, 48 i 72 h fermentacji ekstrahowano wodą destylowaną lub 80 % acetonem (1g liofilizowanych próbek zawieszano w 10 cm<sup>3</sup> ekstrahenta, homogenizowano 1 min i odwirowywano w wirówce Beckmana (15000 rpm/min, temp. 4 °C, 20 min). Zawartość polifenoli ogółem w ekstraktach próbek fermentacyjnych oznaczano metodą zmodyfikowaną przez Chandler i wsp. [2]. W tym celu 1 cm<sup>3</sup> odpowiednio rozcieńczonego ekstraktu mieszano z 1 cm<sup>3</sup> 95 % etanolu, 5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i 0,5 cm<sup>3</sup> 50 % (v/v) odczynnika Folina-Ciocalteu'a, inkubowano 5 min w temp.  $23 \pm 2$  °C, następnie dodawano 1 cm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i trzymano 60 min w ciemnym miejscu. Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda = 725$  nm, wobec próby kontrolnej zawierającej zamiast ekstraktu wodę destylowaną lub aceton. Zawartość polifenoli ogółem wyrażano w mg katechiny/g s.m. Krzywą wzorcową opisującą zależność absorbancji, przy dł. fali 725 nm, od stężenia katechiny sporządzono w zakresie stężeń 25-200  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

Właściwości przeciwutleniające ekstraktów wodnych i acetonowych badano wobec stabilnych syntetycznych rodników DPPH oraz kationorodników ABTS<sup>+</sup> [11]. Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Zawartość aminokwasów w surowcu i w produkcie oznaczano za pomocą analizatora aminokwasów AAA-400 zgodnie z metodą zaproponowaną przez Ingos Company (Republika Czeska). Próbki (zawierające ok. 100 mg białka oznaczonego metoda Kjeldahla) poddawano hydrolizie kwasowej (6M HCl, 24 h, 110 °C), następnie doprowadzano ich pH do wartości 7,0-8,0 za pomocą 6M NaOH i odbiałczano, stosując kwas 5-sulfosalicylowy, w ilości zapewniającej jego końcowe stężenie w próbkach na poziomie 3 %. Sporządzoną mieszaninę uzupełniano wodą dejonizowaną do objętości 20 ml i sączono przez bibułę Whatman nr 3. Filtrat w ilości 1 ml rozcieńczano buforem cytrynianowym o pH 2,2, tak aby końcowe stężenie białka w roztworze wynosiło 1 mg/ml. Na szczyt kolumny wprowadzano 100 µl rozcieńczonej próbki. Aminokwasy związane z jonami sulfonowymi wymieniacza kationowego (OSTION typ ANB wysokość 36 cm) wymywano buforami cytrynianowymi o różnym pH i molarności w temp. 50-70 °C, w ciągu 95 min z prędkością wypływu 0,3 ml/min [9]. Oznaczenia wykonywano w dwóch powtórzeniach.

## Wyniki i dyskusja

Całkowita zawartość polifenoli w wodnych i acetonowych ekstraktach grochu (*P. sativum*) fermentowanego z udziałem *R. oligosporus* w bioreaktorze SSSR wzrastała w ciągu całego procesu, najbardziej dynamicznie w 2. i 3. dobie (rys. 1). W produkcie (po 72 h procesu) wzrosła ona od 4,6 do 16,5 mg KEW/g s.m.- ekstrakty wodne i od 5,2 do 10,7 mg KEW/g s.m.- acetonowe.

McCue [6] wykazał wzrost zawartości polifenoli rozpuszczalnych: w wodzie od 2,4 do 5,6 mg KEW/g s.m., a w 95 % etanolu od 1,4 do 3,3 mg KEW/g s.m. po 10 dniach hodowli *R. oligosporus* w stałym złożu, składającym się z całych nasion soi.

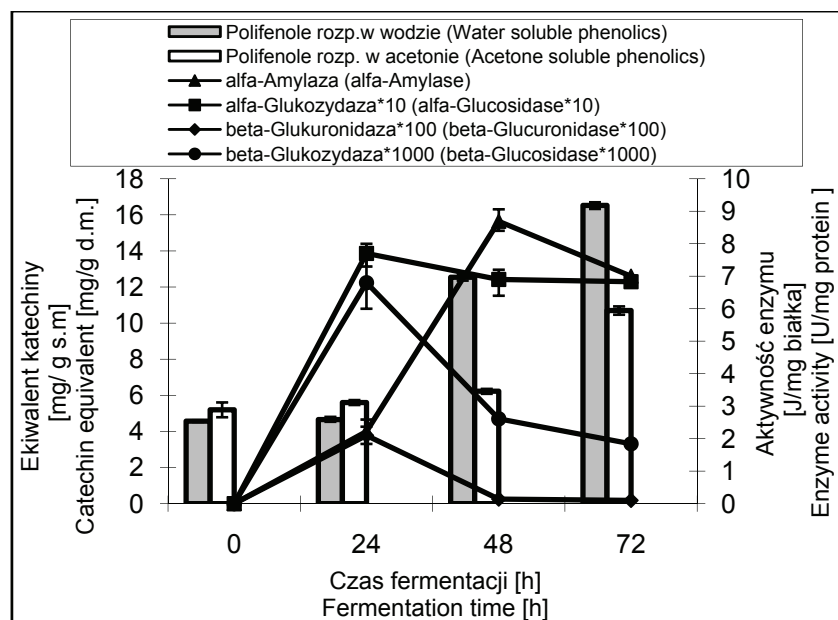
Zastosowany w badaniach szczep syntetyzował z dużą wydajnością:

- w 24. h procesu – β-glukozydazę (0,0068 J/mg), α-glukozydazę (0,77 J/mg) i β-glukuronidazę (0,021 J/mg),
- w 48. h – α-amylazę (8,69 J/mg).

Na końcu procesu (po 72 h) tylko aktywność α-glukozydazy i α-amylazy utrzymywała się na nieznacznie niższym poziomie, odpowiednio 0,68 i 7,00 J/mg. Wzrost aktywności ww. enzymów w 1. dobie fermentacji poprzedzał 2,7-krotny wzrost zawartości fenoli rozpuszczalnych w wodzie, natomiast biosyntezę α-amylazy z najwyższą wydajnością (2. doba) poprzedzał 1,3-krotny wzrost polifenoli rozpuszczalnych w wodzie i 1,7-krotny rozpuszczalnych w acetonie. Dość wysoka aktywność tego enzymu w 3. dobie (7,00 J/mg) umożliwiała podtrzymywanie pleśniowego katabolizmu

skrobi *P. sativum* w celu pozyskania niezbędnej energii do biosyntezy enzymów wywołujących polimeryzację fenoli, czego wyrazem była wysoka aktywność przeciwutleniająca (rys. 2, 3). Wzrost aktywności  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukozydazy poprzedza wzrost zawartości rozpuszczalnych polifenoli w 2. dobie procesu i wskazuje na ważną rolę tych enzymów w uaktywnianiu polifenoli grochu (związanych z węglowodanami) w czasie fermentacji z udziałem *R. oligosporus*. Biosynteza  $\beta$ -glukuronidazy dowodzi, że enzym ten również może brać udział w pleśniowej utylizacji węglowodanów grochu.

McCue [6] stwierdził, że  $\beta$ -glukuronidaza była związana z biokonwersją nierozpuszczalnych polimerów fenolowych do łatwiej rozpuszczalnych w wodzie i w acetonie metabolitów, a pięciokrotnie wyższa aktywność  $\alpha$ -amylazy, w porównaniu z glukozydazami, odgrywała ważną rolę w mobilizacji polimerów fenolowych soi w czasie fermentacji z udziałem *R. oligosporus*.



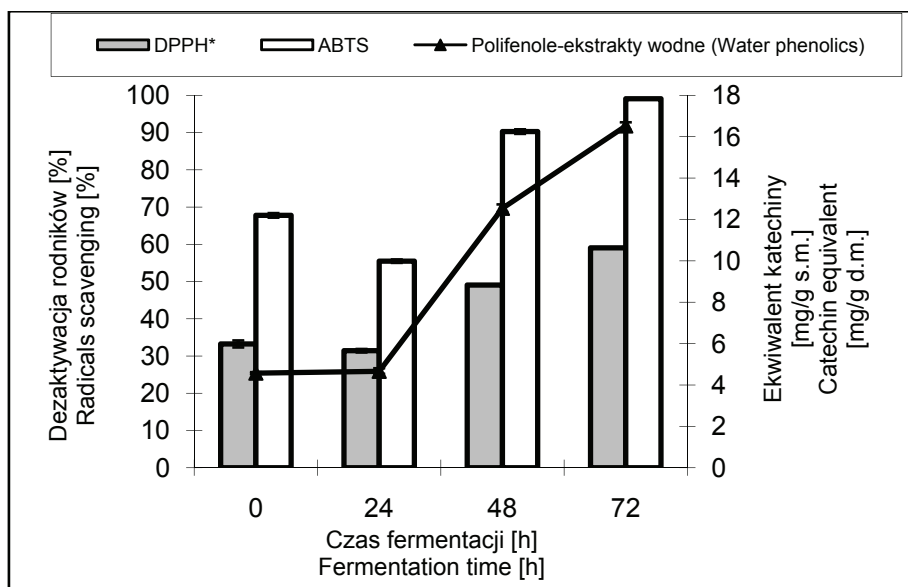
Rys. 1. Zawartość polifenoli w ekstraktach grochu (*P. sativum*) fermentowanego w bioreaktorze SSSR i biosynteza hydrolaz glikozydowych *R. oligosporus*.

Fig. 1. Content of polyphenolics in extracts of pea (*P. sativum*) fermented in an SSSR bioreactor, and biosynthesis of glycoside hydrolases by *R. oligosporus*.

Aktywność przeciwutleniająca wodnych i acetonowych ekstraktów polifenoli grochu (*P. sativum*) przed fermentacją, oznaczona wobec stabilnych syntetycznych rodników DPPH<sup>•</sup>, kształtowała się na poziomie, odpowiednio, 33,2 i 22,1 %, a wobec kationorodników ABTS<sup>+</sup> na poziomie 67,8 i 19,2 % (rys. 2 i 3). Aktywność przeciwutleniająca wodnych ekstraktów polifenoli fermentowanego grochu w pierwszej dobie

procesu obniżyła się o 1,8 % wobec rodników DPPH<sup>•</sup> oraz o 12,3 % wobec kationo-rodników ABTS<sup>+</sup>, natomiast acetonowych wobec DPPH<sup>•</sup> wzrosła o 9,4 a wobec ABTS<sup>+</sup> zmalała o 1,1 %. W kolejnych dobach procesu obserwowano wyraźny, liniowy wzrost aktywności przeciwutleniającej wszystkich badanych ekstraktów, który po 72 h procesu wynosił od 33 do 59 % (ekstrakty wodne) i od 22 do 84 % (ekstrakty acetonowe) wobec DPPH<sup>•</sup> oraz od 68 do 99 % (ekstrakty wodne) i od 19 do 68 % (ekstrakty acetonowe) wobec ABTS<sup>+</sup>. Powstałe w wyniku pleśniowej biokonwersji aglikony fenolowe wykazywały wyższą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu z ich koniugatami z węglowodanami.

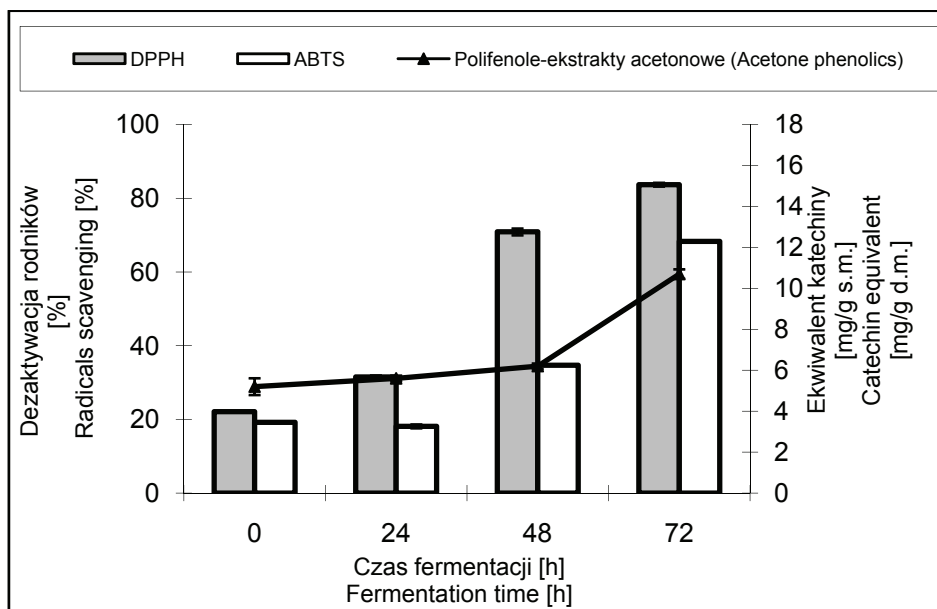
W czasie fermentacji całych nasion soi metodą konwencjonalną stwierdzono wzrost aktywności przeciwrodnikowej wobec DPPH<sup>•</sup> po dwóch dniach, następnie liniowy jej spadek wraz z wydłużaniem się czasu hodowli [6].



Rys. 2. Aktywność przeciwutleniająca polifenoli grochu, rozpuszczalnych w wodzie, fermentowanego z udziałem *R. oligosporus* wobec DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>+</sup>.

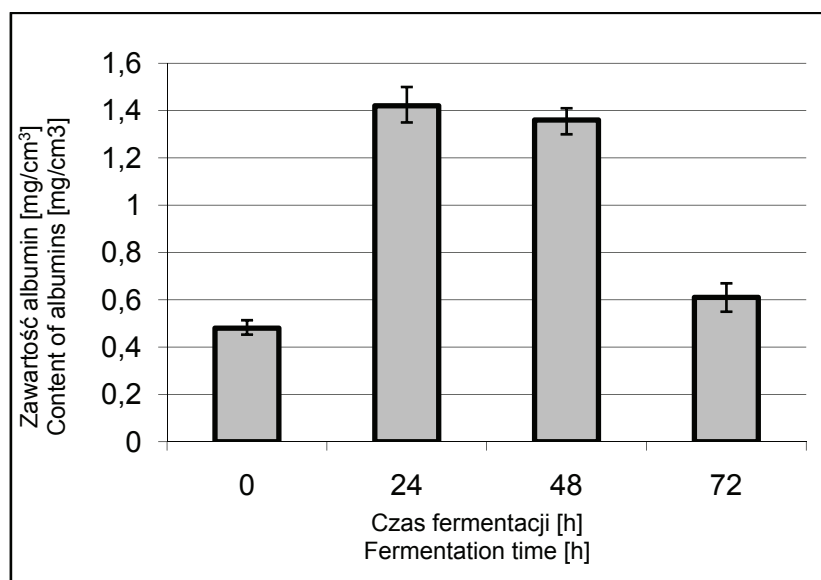
Fig. 2. Antioxidative activity towards DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>+</sup> of water soluble polyphenolics from pea fermented by *R. oligosporus*.

Zawartość albumin i ich zdegradowanych form w ekstraktach fermentowanego grochu wahała się w zakresie od 0,48 mg/cm<sup>3</sup> w próbce przed fermentacją do 1,42 mg/cm<sup>3</sup> w próbce po 24 h procesu (rys. 4). W produkcie (po 72 h fermentacji) zawartość tych związków zmniejszyła się do 0,61 mg/cm<sup>3</sup>, ale nadal była większa od zawartości albumin w surowcu. Wyniki te dowodzą, że zastosowany w badaniach grzyb *R. oligosporus* modyfikował i wykorzystywał badane białka do swojego wzrostu.



Rys. 3. Aktywność przeciwutleniająca polifenoli grochu, rozpuszczalnych w acetonie, fermentowanego z udziałem *R. oligosporus* wobec DPPH i ABTS<sup>+</sup>.

Fig. 3. Antioxidative activity towards DPPH and ABTS<sup>+</sup> of acetone-soluble polyphenolics from pea fermented by *R. oligosporus*.



Rys. 4. Zawartość albumin i ich zdegradowanych form w próbkach fermentowanego grochu.

Fig. 4. Contents of albumins and their degraded forms in the fermented pea samples.

Tendencje do zmniejszania zawartości albumin i prolamin, a zwiększania zawartości globulin w nasionach fasoli po moczeniu i 48-godzinnej fermentacji stwierdziła Flaczyk [4]. Obserwowane zmiany zawartości badanych frakcji białkowych po zastosowanych zabiegach technologicznych mogły być wynikiem przemian zachodzących w czasie fermentacji. Białka prolaminowe były szczególnie wykorzystywane przez grzyb *R. oligosporus* do budowy własnych białek.

Gibbs [3] opisał, że białka tempeh sojowego są tylko częściowo hydrolizowane, ponieważ występują one w formie glikoprotein i fosfoprotein, a większość proteaz nie wykazuje zdolności do degradacji takich związków. Ponadto zawierają one wyższą, w stosunku do innych białek, liczbę mostków dwusiarczkowych. W czasie fermentacji tempeh białka soi ulegały hydrolizie do wielkocząsteczkowych peptydów i następnie oligopeptydów przy udziale peptydaz *R. oligosporus*. Glicynina, jedno z głównych białek soi, była prekursorem większości izolowanych z tempeh peptydów. W tempeh sojowym zidentyfikowano dwa peptydy E i I pochodzące z glicyniny, które wykazywały aktywność przeciwutleniającą.

Aktywność przeciwrodnikową otrzymanych preparatów albumin i ich zdegradowanych form badano w stosunku do trzech rodzajów wolnych rodników: DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, OH<sup>•</sup> i porównywano ją z aktywnością albuminy wołowej jaja kurzego oraz BHT (rys. 5). Fermentacja grochu w SSSR korzystnie modyfikowała badane preparaty białkowe surowca, powodując zwiększenie ich zdolności wygaszania kationorodników ABTS<sup>•+</sup> - 1,7-krotnie, DPPH<sup>•</sup> - 1,8-krotnie, a OH<sup>•</sup> - 2-krotnie. Otrzymany produkt charakteryzował się prawie 9-krotnie wyższą aktywnością przeciwutleniającą w stosunku do ovoalbuminy i 3-krotnie do BSA, a 2-krotnie niższą do syntetycznego przeciwutleniacza BHT (mierzoną wobec DPPH<sup>•</sup>).

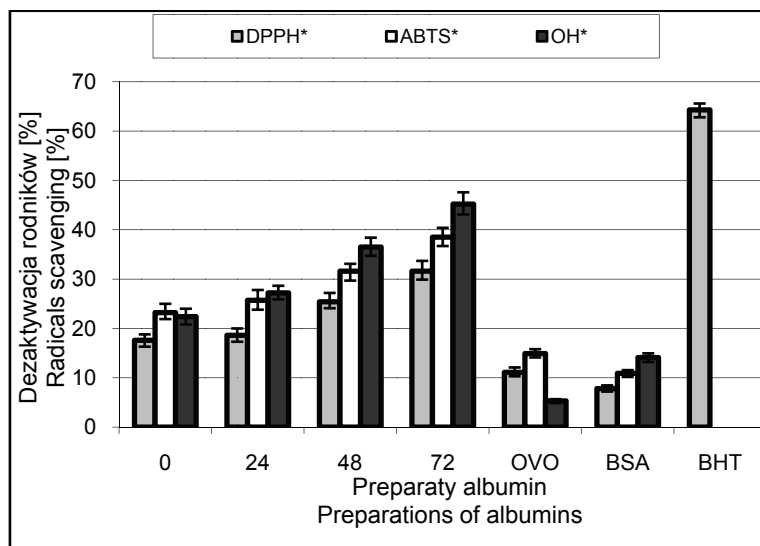
Podobne wyniki w badaniach właściwości przeciwutleniających albumin suchych nasion grochu i fasoli w porównaniu z ovoalbuminą i BSA otrzymał Wołosiak [11, 12].

Rozdziały elektroforetyczne w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) preparatów albumin i ich zdegradowanych form wyizolowanych z grochu poddanego działaniu wolnych rodników obrazowały zmiany strukturalne utlenionych białek (rys. 6). Pod wpływem oddziaływania rodników DPPH<sup>•</sup> i OH<sup>•</sup> na badane preparaty białkowe zachodziło zjawisko ich fragmentacji, szczególnie wyraźnie w przypadku białek niskocząsteczkowych (o masie  $14,2 \cdot 10^3$  Da i  $6,5 \cdot 10^3$  Da) i polimeryzacji białek wysokocząsteczkowych (o masie od  $20 \cdot 10^3$  Da do  $36 \cdot 10^3$  Da).

Po 24 h fermentacji obserwowano zanikanie prążków białek o wyższych masach cząsteczkowych i pojawianie się zdegradowanych (pod wpływem proteinaz *R. oligosporus*) form o niższej masie cząsteczkowej.

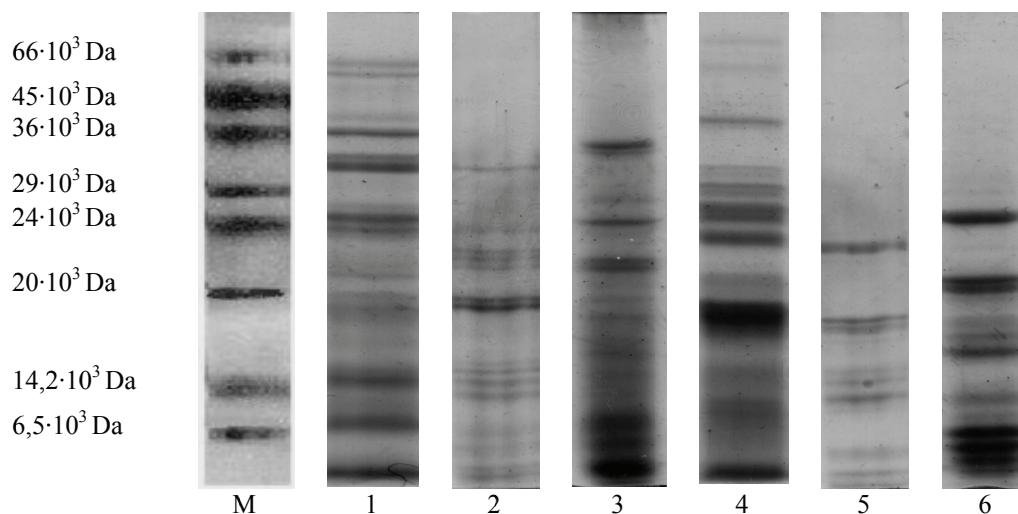
Badania Worobiej [10], dotyczące wpływu rodników hydroksylowych na izolaty białek fasoli, wykazały nieznaczną ich fragmentację, szczególnie frakcji o m. cz.  $45 \cdot 10^3$  Da oraz tworzenie się nowych frakcji o wyższej masie cząsteczkowej ok.  $80 \cdot 10^3$  Da.





Rys. 5. Aktywność przeciwrodnikowa preparatów albumin i ich zdegradowanych form fermentowanego grochu wobec rodników DPPH, ABTS<sup>+</sup> i OH<sup>-</sup>.

Fig. 5. Free radical scavenging activity toward in DPPH, ABTS<sup>+</sup>, and OH<sup>-</sup> of preparations of albumins and their degraded forms produced from fermented pea.



Objaśnienia: / Explanatory notes: M – próba kontrolna / control sample; próba wyjściowa / initial sample (prior to fermentation); 2) próba wyjściowa + DPPH / initial sample (prior to fermentation + DPPH); 3) próba wyjściowa + OH<sup>-</sup> / initial sample (prior to fermentation) + OH<sup>-</sup>; 4) po 24 h fermentacji / sample after the 24 h fermentation; 5) po 24 h fermentacji + DPPH / sample after the 24 h fermentation + DPPH; 6) po 24 h fermentacji + OH<sup>-</sup> / sample after the 24 h fermentation + OH<sup>-</sup>.

Rys. 6. Rozdział elektroforetyczny (SDS-PAGE) preparatów albumin i ich zdegradowanych form wyizolowanych z grochu, w warunkach denaturujących.

Fig. 6. Electrophoresis-based separation (SDS-PAGE) of albumins and their degraded forms isolated from pea, under the denaturing conditions.

Tabela 1

Zawartość aminokwasów w próbkach fermentowanego grochu.  
Content of amino acids in samples of the fermented *P.sativum* pea

Aminokwas Amino acid	Zawartość aminokwasów [%] Content of amino acids [%]				
	Fermentowany groch / Fermented pea				Wieprzowina [9] Pork meat
	Czas fermentacji [h] / Fermentation time				
	0	24	48	72	
Kwas asparaginowy Asparagic acid	12,74	12,11	13,98	15,31	13,2
Treonina Threonine	4,16	4,22	5,62	7,31	5,3
Seryna / Serine	5,58	5,31	7,02	8,04	3,1
Kwas glutaminowy Glutamic acid	17,85	16,56	17,83	20,48	17,3
Prolina / Proline	4,88	4,72	5,79	5,56	4,8
Glicyna /Glycine	4,47	4,47	5,37	5,81	5,9
Alanina / Alanine	4,63	4,88	6,50	6,94	6,4
Walina / Valine	5,13	5,11	6,18	6,78	5,2
Metionina Methionine	0,48	0,67	0,88	1,07	0,69
Izoleucyna Isoleucine	4,26	4,31	5,78	6,39	4,4
Leucyna / Leucine	7,98	8,21	13,09	16,68	9,0
Tyrozyna Tyrosine	2,65	2,85	4,42	3,62	3,2
Fenylalanina Phenylalanine	5,10	5,15	6,04	6,55	4,3
Histydyna Histidine	2,64	2,54	3,13	3,31	3,6
Lizyna / Lysine	8,18	8,13	8,99	10,75	12,0
1/2 Cys	0,60	0,59	0,41	0,45	0,27

Objaśnienia: / Explanatory notes:

SD < 0,100, jedynie w przypadku proliny SD < 0.250 / SD < 0.100 only if proline SD < 0.250.

Białka roślin strączkowych są bogate w aminokwasy siarkowe i zawierają wszystkie aminokwasy niezbędne. Proces fermentacji grochu w bioreaktorze SSSR spowodował wzrost zawartości badanych aminokwasów (tab. 1). Uzyskany produkt zawierał najwięcej leucyny i lizyny, odpowiednio 16,68 mg/g i 10,75 mg/g, spośród

wszystkich badanych aminokwasów egzogennych. Zawartość treoniny, waliny, fenyloalaniny i izoleucyny wyniosły, odpowiednio 7,31, 6,78, 6,55 i 6,39 mg/g. Spośród aminokwasów endogennych produktu najwięcej było w nim kwasu glutaminowego i asparaginowego (odpowiednio 20,48 i 15,31 mg/g).

Zastosowane warunki fermentacji grochu spowodowały znaczący przyrost zawartości leucyny (109 %), treoniny (75 %) i izoleucyny (50 %). Otrzymane wyniki dowodzą, że produkt fermentacji grochu okazał się źródłem dobrej jakości białka oraz aminokwasów egzogennych w ilości wyższej lub porównywalnej z zawartością aminokwasów egzogennych w wieprzowinie [9]. Produkt ten może być stosowany jako substytut mięsa, gdyż uzupełni dietę we wszystkie niezbędne aminokwasy.

Wzrost zawartości aminokwasów: metioniny, kwasu asparaginowego i izoleucyny powyżej 13,5 %, w ciągu 25-godzinnej fermentacji czarnej fasoli z ryżem, odnotował Rodriguez-Burger [8]. Z kolei Gibbs [3] stwierdził, że w ciągu 30-godzinnej fermentacji soi zawartość niektórych aminokwasów zmieniała się znacząco, (obserwował on wzrost zawartości treoniny o 129 %, proliny o 55 %, leucyny o 40 %), podczas gdy innych pozostawała niezmienną (alaniny, argininy, waliny, tryptofanu i metioniny) lub ulegała zmniejszeniu (kwasu asparaginowego, glutaminowego, lizyny i tyrozyny).

## Wnioski

1. Fermentacja grochu zwyczajnego (*P. sativum*) z udziałem *R. oligosporus*, w bioreaktorze SSSR, jest innowacyjną metodą wzbogacania żywności w naturalne przeciwutleniacze fenolowe, pochodzące z nasion roślin strączkowych.
2. Podczas procesu fermentacji grochu w bioreaktorze SSSR nastąpił ok. 3-krotny wzrost zawartości polifenoli i 2-krotny wzrost aktywności przeciwrodnikowej polifenoli w ekstraktach rozpuszczalnych w wodzie oraz, odpowiednio, ok. 2-krotny i 4-krotny w ekstraktach rozpuszczalnych w acetonie.
3. Otrzymane preparaty albumin i ich zdegradowanych form z fermentowanego grochu (*P. sativum*) charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwrodnikową: ok. 2-krotnie w stosunku do surowca, 9-krotnie do owoalbuminy i 3-krotnie do BSA, a 2-krotnie niższą do syntetycznego przeciwutleniacza BHT.
4. Produkt fermentacji grochu w bioreaktorze SSSR jest źródłem dobrej jakości białka, zawiera aminokwasy egzogenne w ilości porównywalnej lub nieco wyższej w stosunku do zawartości aminokwasów egzogennych w wieprzowinie i może być stosowany jako substytut mięsa lub uzupełniać dietę we wszystkie niezbędne aminokwasy.

Pracę zrealizowano w ramach projektu badawczego zamawianego PBZ-KBN /021/P06/99/25

### Literatura

- [1] Bradford M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- [2] Chandler S.F., Dodds J.H.: The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and soecoe in callus cultures of *solanum tuberosum*. *Plant Cell Rep.*, 1983, **2**, 105-108.
- [3] Gibbs B.F., Zougman A., Masse R., Mulligan C.: Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res. Int.*, 2004, **37**, 123-131.
- [4] Flaczyk E.: Charakterystyka układu białkowego nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris*) poddanych różnym zabiegom technologicznym. Cz. II. *Rocz. AR Poznań CCLXX, Technol. Żywn.*, 1995, **19**, 67-72.
- [5] Laemmli U.K.: Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- [6] McCue P., Shetty K.: Role of carbohydrate-enzymes in phenolic antioxidants mobilization from whole soybean fermented with *R. oligosporus*. *Food Biotechnol.*, 2003, **1 (17)**, 27-37.
- [7] Miskiewicz H., Rozwandowicz A., Bielecki S.: Physiological and enzymatic activities of *R. oligosporus* in Swing Solid State Reactor (SSSR). *Chem. Pap.*, 2004, **58 (6)**, 424-428.
- [8] Rodriguez-Burger A.P. et al.: Use of fermented black beans combined with rice to develop a nutritious weaning food. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **61**, 4806-4813.
- [9] Rozwandowicz A.: Tempeh fermentation as the process improving the nutritional quality of legume seeds. *Praca doktorska, Politechnika Łódzka, Łódź 2007.*
- [10] Worobiej E., Klepacka M.: Białka roślin strączkowych jako inhibitory rodników hydroksylowych. *Mat. XXX Sesji Nauk. KTiChŻ PAN.*, Kraków 1999.
- [11] Wołosiak R., Klepacka M.: Dezaktywacja wolnych rodników przez albuminy wybranych roślin strączkowych. *Mat. XXXII Sesji Nauk. KTiChŻ PAN*, Warszawa 2001.
- [12] Wołosiak R., Klepacka M.: Antioxidative properties of albumins in enzymatically catalyzed model systems, *EJPAU*, 2002, **5**, 11.

### CHANGES IN THE CONTENT AND ANTI-OXIDATIVE ACTIVITY OF POLYPHENOLS AND ALBUMINS IN PEA DURING ITS FERMENTATION IN AN SSSR BIOREACTOR

#### Summary

The objective of the work was to determine changes in the contents of polyphenols and albumins contained in *Pisum sativum* pea, and of their free radical scavenging activity while fermenting in the presence of a *Rhizopus oligosporus* strain in an SSSR bioreactor with forced aeration and mixing.

The total content of polyphenolics in pea fermented under the optimal mixing and aeration conditions continued to increase throughout the whole process, and, after a period of 72 hrs, it was three times higher (in water extracts) and two times higher (in acetone extracts) compared with the initial amount. The *Rhizopus oligosporus* strain used in the study effectively synthesized  $\beta$ -glukosidase (0.0068 J/mg),  $\alpha$ -glukosidase (0.77 J/mg), and  $\beta$ -glucuronidase (0.021 J/mg) during 24 hrs, and  $\alpha$ -amylase (8.69 J/mg) during 48 hrs. As the result of fermentation process, the following rise in the antioxidative activity of polyphenols towards the DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> radicals was achieved: as for water-soluble polyphenols, their anti-oxidative activity was 2 times higher, and as for acetone-soluble polyphenols - 4 times higher. The preparations of albumins and their degraded forms, produced from the pea fermented in a bio-reactor, were characterized by a higher free radical scavenging activity; their activity was twice as high as the

activity of the raw material, nine times as high as the activity of ovo-albumin, and three times as high as the activity of BSA. At the same time, the free radical scavenging activity obtained was two times lower if compared with the activity of the BHT synthetic antioxidant. The pea fermentation product appeared to be a source of a good quality albumin containing exogenic amino acids; the quantity of those amino acids was the same or higher if compared with the content of exogenic amino acids contained in pork meat.

**Key words:** polyphenols, albumins, free radical scavenging properties, DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup> radicals ☒