

OPTIMALIZACJA PROCESU FERMENTACJI NASION ŁUBINU WĄSKOLISTNEGO ZA POMOCĄ DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* W KIERUNKU MAKSYMALIZACJI PRODUKCJI BIAŁKA W UZYSKANYM PRODUKCIE*

MALGORZATA KASPROWICZ-POTOCKA¹, PAULINA BOROWCZYK¹, PIOTR GULEWICZ², ANITA ZAWORSKA¹,
ANDRZEJ FRANKIEWICZ¹

¹Katedra Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²Katedra Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy
w Bydgoszczy

malgokas@poczta.onet.pl

Synopsis. Celem badań było określenie wpływu fermentacji nasion łubinu wąskolistnego za pomocą drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w różnych warunkach hodowli, na skład chemiczny produktów pofermentacyjnych. Modyfikowano: pH (4, 5, 6), temperaturę (25°C, 30°C, 40°C) i czas fermentacji (18h, 24h, 48h). Zmiana zakresu pH nie wpłynęła na skład produktów pofermentacyjnych uzyskanych w wyniku zastosowania drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, za wyjątkiem zawartości kwasów organicznych. Optymalna temperatura fermentacji wynosiła 30°C, natomiast wyższa temperatura wpłynęła negatywnie na skład aminokwasowy białka, ale obniżyła udział alkaloidów. Optymalny czas fermentacji to 24 godziny. Wydłużenie do 48 godzin wpływa niekorzystnie na strukturę kwasów organicznych i poziom alkaloidów.

Słowa kluczowe – *key words*: łubin wąskolistny – *blue lupin*, parametry fermentacji – *fermentation parameters*, skład chemiczny – *chemical composition*

WSTĘP

W krajach Unii Europejskiej od wielu lat istnieje problem niedostatku białka paszowego. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania roślinami strączkowymi, szczególnie uprawą łubinów. Nasiona łubinu zawierają dużo białka, jednak obecność substancji antyodżywczych oraz magazynowanie energii w nasionach w postaci węglowodanów nieskrobiowych, wpływa niekorzystnie na strawność składników pokarmowych, a także wykorzystanie nasion przez zwierzęta. Z tego powodu przeprowadza się próby mające na celu poprawę wartości odżywczej nasion łubinu i zwiększenie możliwości ich wykorzystania, jako komponentów paszowych dla zwierząt.

Fermentacja jest procesem, który zmienia strukturę materiału pod wpływem enzymów wytwarzanych przez drożdże, wzbogaca pasze w wysokowartościowe białko oraz obniża zawartość substancji antyodżywczych. Khattab i Arntfield [2009] i Khattab i in. [2009] fermentując nasiona roślin strączkowych za pomocą drożdży *Saccharomyces cerevisiae* stwierdzili pozytywny wpływ fermentacji na zawartość aminokwasów w produkcie, poprawę indeksów wartości odżywczej białka i strawności białka *in vitro*, oraz obniżenie koncentracji tanin, oligosacharydów, kwasu fitynowego i inhibitorów tripsyny. Pozytywny wpływ fermentacji za pomocą różnych szczepów drożdży (*Saccharomyces cerevisiae* – Baker Yeast, Bayanus G-995, szczep 7013 oraz *Saccharomyces carlsbergensis*) na wartość odżywczą nasion łubinu wykazała we wcześniejszej

* Praca została wykonana w ramach grantu: 2011/01/B/NZ9/00232.

pracy Borowczyk [2011]. Z wykorzystanych przez autorkę drożdży najkorzystniejsze wyniki fermentacji uzyskano przy zastosowaniu drożdży piekarniczych Baker Yeast. W produktach stwierdzono wzrost zawartości białka i popiołu, poprawę indeksów wartości odżywczej białka oraz obniżenie koncentracji fitynianów i oligosacharydów, a także w nieznacznym stopniu alkaloidów.

Efektywność wzrostu biomasy jest jednak uzależniona od warunków rozwoju mikroorganizmów, m.in. takich jak zawartość wody, temperatura, czas, pH, dostęp tlenu i substratów [Grajek i Szymanowska 2008]. Dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zakres optymalnych warunków fermentacji to: temperatura 25–30°C, pH 4,5–6,5, wilgotność około 30% oraz dostęp tlenu w początkowej fazie fermentacji. Porównanie efektów procesu fermentacji nasion łubinu, za pomocą *Saccharomyces cerevisiae*, prowadzonych w różnych warunkach hodowli, umożliwi optymalizację procesu i dobór parametrów, przy których uzyskane produkty łubinowe będą się charakteryzowały najlepszym składem chemicznym.

Celem badań było przeprowadzenie procesu fermentacji rozdrobnionych nasion łubinu za pomocą suszonych aktywnych drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach zmieniającego się pH, temperatury i czasu fermentacji i określenie wpływu tych zmian na skład chemiczny uzyskanych produktów.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wybrano nasiona łubinu wąskolistnego odmiany Neptun, pozyskane ze Stacji Hodowli Roślin Przebędowo. Badania przeprowadzono w 2011 roku w Laboratorium Katedry Żywnienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej. Nasiona zostały odkażone w 0,25% roztworze podchlorynu sodu (POCH Gliwice) a następnie podsuszone i rozdrobnione w młynku laboratoryjnym. Za warunki wyjściowe (grupa kontrolna) przyjęto pH 5, temperaturę 30°C, i czas 24h. Do naczyń odmierzano po 100 g zmielonych nasion, które wymieszano z wodą w stosunku 1:4. Następnie naczynia umieszczono na mieszadłach magnetycznych wyposażonych w termostat i po wstępnym wymieszaniu dodawano 1 g suchych drożdży piekarniczych (Dr Oetker). Fermentacje tlenowe prowadzono w otwartych naczyniach, w systemie ciągłego mieszania. Wszystkie czynniki środowiskowe były po kolei modyfikowane: pH (4, 5, 6), temperatura (25°C, 30°C, 40°C), czas (18h, 24h, 48h). pH materiału ustalano poprzez wkraplanie 10% kwasu solnego i pomiar pH za pomocą pH-metru bagnetowego (Hanna Instruments), a temperaturę kontrolowano przy pomocy czujnika termicznego będącego częścią wyposażenia mieszadła. Po zakończeniu fermentacji zneutralizowano enzymy drożdżowe w temperaturze 70°C przez 10 minut, a uzyskany materiał wysuszono w suszarce laboratoryjnej.

W produktach pofermentacyjnych wykonano oznaczenia zawartości suchej masy, białka ogólnego, włókna surowego, tłuszczu surowego oraz popiołu surowego wg AOAC [2007]. Analizę aminokwasów wykonano na aparacie AAA-339 Mikrotechnia Amino Acid Analyzer, po wstępnej hydrolizie prób w 6N HCl w 105°C przez 23h. Analizę alkaloidów łubinowych wykonano w Laboratorium Oceny Odmian Roślin w Słupii Wielkiej. Alkaloidy wyekstrahowano z wysuszonej mąki łubinowej przy użyciu kwasu trójchlorooctowego a następnie chlorku metylenu. Oznaczenia wykonano za pomocą chromatografii gazowej (Shimadzu GC17A) z kolumną kapilarną firmy Phenomenex. Analizę oligosacharydów wykonano metodą GC, wg. Zalewski i in. [2001]. Obliczenia wskaźników wartości odżywczej białka EAAI wykonano metodą Osera a CS – Blocka-Mitchela. Analizę kwasów organicznych wykonano Poziom pH w materiałach po fermentacji oznaczono w 10% wodnych ekstraktach za pomocą pH-metru InoLab Level 1. W celu analizy kwasów organicznych ekstrakt odwirowano przy 10000 g przez 8 minut. Próbkę

przesączono przez sączek 0,20 mm. Supernatant analizowano bezpośrednio za pomocą HPLC (Waters) z detekcją UV. Kwasy organiczne rozdzielano na kolumnie Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, USA) w 65°C stosując roztwór 5 mmol·l⁻¹ H₂SO₄ jako eluent, przy przepływie 0,5 ml·min⁻¹.

Wyniki analizowano porównując je trójkami w zależności od zmiany czynnika badawczego. Obliczono średnie odchylenie standardowe za pomocą programu Statgraphics (ver. 5.0, USA).

WYNIKI BADAŃ

Charakterystykę chemiczną nasion łubinu wąskolistnego odmiany Neptun przedstawia tabela 1. Nie zaobserwowano znaczącego wpływu zmiany zakresu pH z 4 do 6 na podstawowy skład chemiczny uzyskanych produktów (tab. 2). Najwyższą zawartością białka charakteryzował się

Tabela 1. Charakterystyka chemiczna nasion łubinu wąskolistnego Neptun
Table 1. The chemical composition of narrow-leafed lupin seeds var. Neptun

Składnik – Component	Wartość – Value
Białko ogólne – Crude protein (g·kg ⁻¹ sm – DM)	330,3
Popiół surowy – Crude ash (g·kg ⁻¹ sm – DM)	38,8
Włókno surowe – Crude fiber (g·kg ⁻¹ sm – DM)	174,1
Tłuszcz surowy – Crude fat (g·kg ⁻¹ sm – DM)	46,4
ZBW – N-free extractivess (g·kg ⁻¹ sm – DM)	367,6
Aminokwasy (g·100 g ⁻¹ białka) – Amino acids (g·100 g ⁻¹ of protein)	
ARG	12,17
HIS	3,75
ILE	3,54
LEU	5,90
LYS	5,26
MET	0,53
PHE	3,48
TRE	3,27
VAL	3,57
ALA	3,03
ASP	8,95
CYS	1,38
GLU	22,74
GLY	3,98
PRO	5,58
SER	4,39
TYR	3,47
CS	33
EAAI	62
Suma oligosacharydów – Total oligosaccharides (g·kg ⁻¹ sm – DM)	7,36
Suma alkaloidów – Total alkaloids (g·kg ⁻¹ sm – DM)	0,40

Tabela 2. Wpływ parametrów procesu na podstawowy skład chemiczny i koncentrację czynników antyodżywczych w produktach po fermentacji ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ suchej masy)Table 2. Influence of process parameters on the basic chemical composition and concentration of anti-nutritional factors in the fermentation products ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dry matter)

Składnik <i>Ingredients</i>	pH				Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) <i>Temperature ($^{\circ}\text{C}$)</i>				Czas – Time (h)			
	4	5	6	SD*	25	30	40	SD	12	24	48	SD
Popiół surowy <i>Crude ash</i>	20,4	17,5	20,2	1,6	12,2	17,5	15,7	2,7	18,7	17,5	22,1	2,4
Białko ogólne <i>Crude protein</i>	361	387	374	13,3	364	387	361	14,4	361	387	356	16,9
Włókno surowe <i>Crude fiber</i>	177	154	163	11,6	182	154	183	16,7	160	154	179	13,4
Tłuszcz surowy <i>Crude fat</i>	42,9	46,9	44,0	2,1	43,5	46,9	46,0	1,8	45,2	46,9	41,8	2,6
ZBW <i>N-free extractives</i>	331	326	331	2,8	349	326	344	12,0	349	326	326	13,0
Oligosacharydy <i>Oligosaccharides</i>	NS**	NS	NS	–	NS	NS	NS	–	NS	NS	NS	–
Alkaloidy <i>Alkaloids</i>	0,40	0,37	0,43	0,03	0,41	0,37	0,33	0,04	0,40	0,37	0,41	0,02

* – SD – odchylenie standardowe – *standard deviation*** – NS – nie stwierdzono – *not detected*

produkt fermentacji przy pH 5, który zawierał ponadto najwięcej tłuszczu surowego i najmniej włókna surowego. Przy pH 4 zawartość białka była o około 3 jednostki procentowe niższa niż przy pH 5. Nie stwierdzono obecności oligosacharydów w materiałach po fermentacji, a zawartość alkaloidów była najniższa przy pH 4. Największe zróżnicowanie poziomu aminokwasów stwierdzono w przypadku proliny, cystyny, metioniny i tyrozyny (tab. 3). Nasiona łubinu fermentowane przy pH 5 charakteryzowały się najwyższym poziomem proliny i cystyny, ale najniższym metioniny. Prawie dwukrotnie wyższą koncentrację metioniny uzyskano w wyniku fermentacji przy pH 6. Wskaźniki wartości odżywczej białka nasion fermentowanych przy wyższych pH (5 i 6) były nieco wyższe niż przy pH 4. Niezależnie od wyjściowego pH procesu fermentacji, pH produktów finalnych mieściło się w zakresie od 4,2 do 4,9 (tab. 4). Najwięcej kwasów wytworzyło się w materiale fermentowanym przy pH 6. Stwierdzono, że podczas fermentacji wytwarzany jest głównie kwas mlekowy, podczas gdy kwas masłowy występuje w nieznacznych ilościach. Najwyższym udziałem kwasu mlekowego charakteryzował się produkt fermentowany przy pH 6.

Zmiany temperatury procesu fermentacji w zakresie od 25 do 40 $^{\circ}\text{C}$ nie wpłynęły znacząco na skład chemiczny produktów (tab. 2). Najwyższym udziałem białka, a najniższym włókna i węglowodanów charakteryzował się produkt fermentowany w 30 $^{\circ}\text{C}$. W produktach pofermentacyjnych nie stwierdzono obecności cukrów z rodziny rafinozy, a najniższym poziomem alkaloidów charakteryzował się produkt otrzymany w temperaturze 40 $^{\circ}\text{C}$. Fermentacja w temperaturze powyżej 30 $^{\circ}\text{C}$ spowodowała znaczne obniżenie koncentracji metioniny, proliny, cystyny

Tabela 3. Wpływ parametrów fermentacji na skład aminokwasowy białka ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ białka) produktów i jego wartość odżywczą

Table 3. Influence of fermentation parameters on the amino acid composition of protein ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ of protein) in product after fermentation and its nutritive value

Aminokwasy <i>Amino acids</i>	pH				Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) <i>Temperature ($^{\circ}\text{C}$)</i>				Czas – Time (h)			
	4	5	6	SD*	25	30	40	SD	12	24	48	SD
ASP	9,24	9,25	8,99	0,15	9,21	9,25	9,39	0,09	8,89	9,25	9,09	0,18
THR	3,46	3,43	3,23	0,13	3,27	3,43	3,40	0,09	3,32	3,43	2,99	0,23
SER	4,49	4,51	4,35	0,09	4,22	4,51	4,40	0,15	4,19	4,51	3,86	0,33
GLU	23,85	23,47	22,16	0,89	22,62	23,47	23,92	0,66	22,6	23,47	22,7	0,48
PRO	6,56	8,69	7,23	1,09	6,01	8,69	6,56	1,42	7,02	8,69	7,00	0,97
CYS	1,70	2,18	1,70	0,28	1,31	2,18	1,70	0,44	1,72	2,18	1,81	0,24
GLY	4,15	4,06	4,10	0,05	4,08	4,06	4,26	0,11	4,01	4,06	4,08	0,04
ALA	3,35	3,44	3,52	0,09	3,28	3,44	3,33	0,08	3,45	3,44	3,47	0,02
VAL	4,08	4,25	4,30	0,12	4,19	4,25	3,89	0,19	4,39	4,25	4,46	0,11
MET	0,74	0,48	0,90	0,21	0,91	0,48	0,51	0,24	1,02	0,48	0,97	0,30
ILE	4,11	3,72	4,16	0,24	4,20	3,72	3,99	0,24	4,2	3,72	4,30	0,31
LEU	6,40	5,93	6,47	0,29	6,70	5,93	6,57	0,41	6,52	5,93	6,60	0,37
TYR	3,92	4,37	5,86	1,02	5,02	4,37	3,94	0,54	4,27	4,37	4,91	0,34
PHE	3,74	3,47	3,71	0,15	4,23	3,47	3,56	0,41	4,13	3,47	4,08	0,37
HIS	2,98	2,80	2,99	0,11	3,24	2,80	2,82	0,25	3,27	2,80	3,21	0,26
LYS	4,17	3,96	4,11	0,11	4,95	3,96	4,38	0,50	4,56	3,96	4,30	0,30
ARG	8,06	6,99	7,21	0,57	7,54	6,99	8,39	0,71	7,44	6,99	7,17	0,23
EAAI	68	68	70	1	71	68	67	2	71	68	71	2
CS	42	46	45	2	38	46	38	4	47	46	48	1

* – SD – odchylenie standardowe – *standard deviation*

i tyrozyny (tab. 3). Najniższe wskaźniki CS i EAAI stwierdzono dla materiału fermentowanego w 40°C , a najwyższe w 30°C . Wzrost temperatury procesu z 25 do 40°C nie wpłynął znacząco na pH i zawartość sumy kwasów organicznych w suchym materiale (tab. 4). Najwyższym poziomem kwasu mlekowego charakteryzował się produkt fermentowany w 40°C a najniższym w 30°C . W otrzymanych produktach nie stwierdzono obecności kwasu masłowego.

Wydłużenie czasu fermentacji do 48 godzin spowodowało obniżenie poziomu białka ogólnego i wzrost koncentracji włókna surowego oraz popiołu surowego w produktach (tab. 2). Najwyższą zawartością białka ogólnego, a najniższą włókna surowego charakteryzował się produkt fermentowany przez 24 godziny. Nie stwierdzono obecności oligosacharydów, a najniższym poziomem alkaloidów charakteryzował się produkt po 24-godzinnej fermentacji. Wydłużenie czasu fermentacji do 48h spowodowało obniżenie koncentracji treoniny, seryny, kwasu glutaminowego, proliny i cystyny w białku uzyskanych produktów, a jednocześnie wzrost koncentracji metioniny i histydyny (tab. 3). Najwyższą zawartością proliny, cystyny i seryny charakteryzowało się białko produktu fermentowanego przez 24h, jednakże zawierało ono najmniej histydyny, fenyloalaniny, metioniny, izoleucyny, leucyny i lizyny. Najwyższą wartością biologiczną białka charakteryzował się produkt po 48h fermentacji. pH uzyskanych produktów wahało się od 4,7 do 4,9 (tab. 4). Najniższą koncentracją kwasów organicznych charakteryzował się pro-

Tabela 4. Wpływ parametrów fermentacji na pH i skład kwasów organicznych suchych produktów po fermentacji (g·kg⁻¹ sm)Table 4. Influence of fermentation parameters of pH and organic acid composition of dry products after fermentation (g·kg⁻¹ DM)

Składnik Ingredients	pH				Temperatura (°C) Temperature (°C)				Czas – Time (h)			
	4	5	6	SD*	25	30	40	SD	12	24	48	SD
pH	4,20	4,87	4,70	0,35	4,64	4,87	4,57	1,6	4,68	4,87	4,73	1,0
Kwas mlekowy Lactic acid	20,2	8,8	23,7	7,8	13,0	8,8	14,8	3,1	15,4	8,8	12,4	3,3
Kwas octowy Acetic acid	5,8	4,4	6,0	0,9	3,9	4,4	4,5	0,3	3,9	4,4	7,5	2,0
Kwas propionowy Propionic acid	5,5	3,4	11,3	4,1	4,1	3,4	5,6	1,1	5,0	3,4	6,6	1,6
Kwas masłowy Butyric acid	NS**	NS	NS	–	NS	NS	NS	–	NS	NS	0,15	–
Suma kwasów Total acids	31,5	16,6	41,0	12,3	21,0	16,6	24,9	4,2	24,3	16,6	28,0	5,8

SD** – odchylenie standardowe – standard deviation

NS* – nie stwierdzono – not detected

dukt po fermentacji przez 24h, natomiast w produkcie po 48h fermentacji stwierdzono obecność kwasu masłowego. Udział kwasu mlekowego był najwyższy po 12h fermentacji.

DYSKUSJA

Fermentacja nasion łubinu za pomocą drożdży piekarniczych zwiększyła udział białka w produkcie i metioniny oraz cystyny w białku, co przyczyniło się do znacznej poprawy wskaźników CS i EAAI w porównaniu do nieprzetworzonych nasion łubinu Neptun. Podczas fermentacji nastąpiła także całkowita degradacja oligosacharydów z rodziny rafinozy, podczas gdy fermentacja nie miała znaczącego wpływu na poziom alkaloidów.

Mikroorganizmy są bardzo wrażliwe na odczyn środowiska i zdolne są do funkcjonowania tylko w określonym przedziale pH. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* rozwijają się w minimalnym pH 2,5, przy czym optymalne pH mieści się w przedziale 4,0– 5,0, a maksymalne wynosi 7,5 [Libudzisz i in. 2010]. Odchylenie od przedziału optymalnego znacznie upośledza pobór pożywek, wzrost i rozmnażanie się drożdży, a tym samym obniża wydajność procesu produkcji biomasy. W prezentowanych badaniach nie zaobserwowano zróżnicowania w podstawowym składzie chemicznym produktów w zależności od wyjściowego pH. Największą zawartością białka charakteryzował się produkt otrzymany przy pH 5, który zawierał ponadto najwięcej tłuszczu, a najmniej włókna surowego i ZBW, co wskazuje na wyższą aktywność drożdży *S. cerevisiae*, które do fermentacji wykorzystują głównie węglowodany. Przy optymalnym pH 5 zaobserwowano także najniższy udział alkaloidów, co wskazuje na możliwość ich częściowego

rozkładu przez najbardziej aktywne w tym pH drożdże [Trojanowska i in. 1991]. Największy przyrost biomasy spowodowany wzrostem aktywności drożdży pomiędzy pH 4 a 5 potwierdzają także badania Yalcin i Ozbas [2008]. Uzyskany przez nich produkt otrzymany przy pH 5 charakteryzował się największym udziałem proliny i cystyny a najniższym metioniny, podobnie jak w badaniach własnych. Niezależnie też od wyjściowego pH procesu, pH materiałów uzyskanych po fermentacji kształtowało się w przedziale 4,2–4,9. Wartość początkowa pH podłoża zależy od składu chemicznego i może się zmieniać pod wpływem metabolizmu i fizjologii drobnoustrojów [Libudzisz i in. 2010]. We wszystkich produktach dominującym kwasem był kwas mlekowy, a kwasu masłowego nie stwierdzono. Świadczy to o prawidłowej fermentacji i dominacji drożdży, które mogą wytwarzać kwas mlekowy, jako produkt uboczny [Valli i in. 2006].

Temperatura istotnie wpływa na procesy życiowe mikroorganizmów, a szczególnie na szybkość ich wzrostu. W niskich temperaturach fermentacja zachodzi niecałkowicie i powstają niewielkie ilości produktów pożądaných [Niba i in. 2009]. Stopniowy wzrost temperatury powyżej minimalnej powoduje zwiększenie szybkości większości reakcji chemicznych, jednak dalszy wzrost temperatury powyżej optymalnej powoduje gwałtowne zahamowanie wzrostu i rozmnażania drobnoustrojów. Dla drożdży optymalna temperatura namnażania waha się od 25 do 35°C. Fermentacja prowadzona w wyższej temperaturze jest jednak bardziej efektywna i krótsza [Niba i in. 2009]. Z drugiej strony, już powyżej 30°C nasila się produkcja dwucukru – trehalozy, której ilość rośnie wraz z temperaturą. Jej obecność jest wskaźnikiem stresu, a kumulacja w komórkach jest związana m.in. z szokiem termicznym [Grajek i Szymanowska 2008]. Potwierdzają to wyniki prezentowanych badań, w których zaobserwowano, że temperatura powyżej 30°C wpływa negatywnie na profil aminokwasowy białka i wartości wskaźników CS i EAAI. Najkorzystniejszym składem chemicznym charakteryzował się produkt fermentowany przy 30°C. Także Yalcin i Ozbas [2008] stwierdzili najefektywniejszy wzrost biomasy, gdy temperatura procesu fermentacji wynosiła 30°C. Torija i in. [2002] zauważyli natomiast, że liczba komórek drożdży spada, gdy temperatura fermentacji wzrasta z 30 do 35°C. Beal i in. [2005] stwierdzili, że zmiana temperatury fermentacji w zakresie 30–35–40°C nieznacznie wpływa na pH, a stężenie kwasu mlekowego i octowego zmienia się podobnie jak w badaniach własnych. W prezentowanych badaniach stwierdzono ponadto, że wraz ze wzrostem temperatury procesu obniża się koncentracja alkaloidów łubinowych z 0,41 g·kg⁻¹ sm przy 25°C do 0,33 g·kg⁻¹ sm przy 40°C, co wskazuje na możliwość częściowego ich rozkładu, na skutek wytwarzania enzymów przez namnażające się drożdże, co w organizmach żywych zachodzi najefektywniej przy 37°C [Slaa i in. 2009].

Yabaya i in. [2009] wykazali, że wydłużenie czasu fermentacji do 56h zwiększa liczbę komórek drożdżowych. Jednakże, Mbata i in. [2009] stwierdzili, że wzrost drożdży jest najintensywniejszy do 24h fermentacji, a od 24 do 48h koncentracja komórek zmienia się nieznacznie. Potwierdzają to całkowicie aktualnie prezentowane badania, w których najwyższy udział białka, a najniższy włókna stwierdzono przy 24h fermentacji. Wydłużenie czasu fermentacji nie wpływało także na koncentrację węglowodanów, co wskazuje, że proces został zatrzymany [Kasprowicz-Potocka i Frankiewicz 2011]. Podobne jak w prezentowanych badaniach obserwacje dotyczące zawartości białka i aminokwasów w produktach fermentacji poczynili Sripriya i in. [1997]. Udział wolnych aminokwasów wzrastał, osiągając maksimum przy 18h, a następnie od 36 do 48 godziny – malał. Podobnie udział białka rozpuszczalnego wzrastał do 18h, a następnie malał (36h) i znowu wzrastał (do 48h). Yabaya i in. [2009] podczas 72h fermentacji, wykonując pomiary, co 8h, stwierdzili obniżenie zawartości kwasu glutaminowego, proliny i cystyny w białku, a także wzrost metioniny i histydyny, podobnie jak w badaniach własnych. Czas fermentacji wpływał także na pH i strukturę kwasów organicznych w uzyskanych produktach. W badaniach własnych stwierdzono wzrost pH przy 24 godzinnej fermentacji, podczas, gdy

inni autorzy obserwowali ciągle obniżanie się pH [Mbata i in. 2009]. Podobnie jak w badaniach własnych Sripriya i in. [1997] zaobserwowali natomiast powolny wzrost stężenia kwasu octowego w produktach do 48h fermentacji, jednakże gwałtowny spadek zawartości kwasów organicznych, a szczególnie kwasu mlekowego przy 24h fermentacji jest trudny do wyjaśnienia. Sripriya i in. [1997] stwierdzili także obniżenie poziomu fitynianów, a Egounlety i in. [2003] – fitynianów, inhibitorów tripsyny i stachiozy przy wydłużeniu czasu fermentacji. W badaniach własnych jednakże czas fermentacji nie wpłynął znacząco na zawartość alkaloidów, gdyż stwierdzono niewielkie ich obniżenie jedynie przy 24 godzinnej fermentacji. Alkaloidy łubino- we wykazują generalnie znaczną odporność na fermentację za pomocą mikroorganizmów, natomiast oligosacharydy z rodziny rafinozy, podobnie jak w innych wariantach, uległy całkowitej degradacji, co potwierdzają także wcześniejsze badania Borowczyk [2011].

WNIOSKI

1. Zmiana zakresu pH z 4 do 6 nie wpływa znacząco na skład produktów pofermentacyjnych uzyskanych w wyniku zastosowania drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, za wyjątkiem poziomu kwasów organicznych.
2. Podniesienie temperatury procesu fermentacji powyżej 30°C wpływa niekorzystnie na skład aminokwasowy białka, ale obniża udział alkaloidów w produkcie.
3. Wydłużenie czasu fermentacji z 12 do 48 godzin zwiększa wykorzystanie węglowodanów, ale wpływa niekorzystnie na strukturę kwasów organicznych i koncentrację alkaloidów.

PIŚMIENNICTWO

- AOAC. 2007. Agricultural chemicals. Official methods of Analysis, vol. 1. Association of Official Analytical Chemists. 18th Edition. Gaithersburg Maryland, USA.
- Beal J.D., Niven S.J., Brooks P.H., Gill B.P. 2005. Variation in short chain fatty acid and ethanol concentration resulting from the natural fermentation of wheat and barley for inclusion in liquid diets for pigs. *J. Sci. Food Agric.* 85: 433–440.
- Borowczyk P. 2011. Możliwość wykorzystania różnych szczepów drożdży suszonych do poprawy składu chemicznego nasion łubinu wąskolistnego. *Praca inż., UP Poznań (maszynopis):* ss. 73.
- Egounlety M., Aworh O.C. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *J. Food Eng.* 56: 249–254.
- Grajek W., Szymanowska D. 2008. Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej. *Biotechnologia. Prace Przegł.* 3: 46–63.
- Kasprowicz-Potocka M., Frankiewicz A. 2011. Wykorzystanie drożdży do poprawy wartości pokarmowej nasion grochu. *Sesja Nauk. Kom. Żyw. Zwierząt KNZ-PAN „Sterowanie metabolizmem u zwierząt poprzez żywienie”.* Piechowice, 15–17 czerwca 2011: 80–81.
- Khattab R.Y., Arntfield S.D. 2009. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. *Food Sci. Technol.* 42: 1113–1118.
- Khattab R.Y., Arntfield S.D., Nyachoti C.M. 2009. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments, Part 1: Protein quality evaluation. *Food Sci. Technol.* 42: 1107–1112.
- Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. 2010. *Mikrobiologia techniczna (Mikroorganizmy i środowiska ich występowania).* PWN Warszawa, 1: 43–60.

- Mbata T.I., Ikenebomeh M., Alaneme J.C. 2009. Studies on the microbiological, nutrient composition and antinutritional contents of fermented maize flour fortified with bambara groundnut (*Vigna subterranean* L.). Afr. J. Food Sci. 3: 165–171.
- Niba A.T., Beal J.D., Kudi A.C., Brooks P.H. 2009. Potential of bacterial fermentation as a biosafe method of improving feeds for pigs and poultry. Afr. J. Biotechnol. 8: 1758–1767.
- Servi S., Özkaya H., Colakoglu A.S. 2008. Dephytinization of wheat bran by fermentation with bakers' yeast, incubation with barley malt flour and autoclaving at different pH levels. J. Cereal Sci. 48: 471–476.
- Slaa J., Gnode M., Else H. 2009. Yeast and fermentation: the optimal temperature. J. Organic Chem.: Chem. Dut. Aspects 134.
- Sripriya G., Usha A., Chandra T.S. 1997. Changes in carbohydrate, free amino acids, organic acids, phytate and HCl extractability of minerals during germination and fermentation of finger millet (*Eleusine coracana*). Food Chem. 58: 345–350.
- Torija M.J., Roze's N., Poblet M., Guillamo'n J.M., Mas A. 2002. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Food Microbiol. 80: 47–53.
- Trojanowska K., Markiewicz M., Czaczuk K., Mueller A., Gulewicz K. 1991. Ekstrakt lubinowy jako surowiec w biosyntezie białka paszowego na drodze mikrobiologicznej. Biotechnologia 3–4: 131–136.
- Valli M., Sauer M., Branduardi P., Borth N., Porro D., Mattanovich D. 2006. Improvement of Lactic Acid Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Cell Sorting for High Intracellular pH. Appl. Environ. Microbiol. 72: 5492–5499.
- Yabaya A., Akinyanju J.A., Jatou E.D. 2009. Yeast enrichment of soybean cake. World J. Dairy Food Sci. 4: 141–144.
- Yalcin S.K., Ozbas Z.Y. 2008. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. Braz. J. Microbiol. 7:89–93.
- Zalewski K., Lahuta L. B., Horbowicz M. 2001. The effect of soil drought on the composition of carbohydrates in yellow lupin seeds and triticale kernels. Acta Physiol. Plant. 23: 73–78.

M. KASPROWICZ-POTOCKA, P. BOROWCZYK, P. GULEWICZ, A. ZAWORSKA, A. FRANKIEWICZ

**OPTIMIZATION OF FERMENTATION CONDITIONS FOR BLUE LUPIN SEEDS USING
THE YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* TOWARDS MAXIMIZING
THE PRODUCTION OF PROTEIN**

Summary

The aim of this study was to determine the effect of blue lupin seeds fermentation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in different culture conditions, on the chemical composition of post-fermentation products. During experiment pH (4, 5, 6), temperature (25°C, 30°C, 40°C) and fermentation time (18h, 24h, 48h) were modified. Changing the pH range did not influence the composition of the post-fermentation products derived from the application of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, except for the concentration of organic acids. Optimum fermentation temperature was 30°C, while higher temperatures have negatively affected the amino acid composition of proteins and reduced of alkaloids content. The optimum fermentation time was 24 hours. Extending up to 48 hours has a negative effect on the structure of organic acids and concentration of alkaloids.