

BOŻENA STODOLAK, ANNA STARZYŃSKA-JANISZEWSKA,
AGNIESZKA WIKIERA

WPLYW DODATKU WYTŁOKÓW LNIANYCH NA POTENCJAŁ ANTYOKSYDACYJNY TEMPE Z NASION ŁĘDŹWIANU

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu dodatku wycieków z nasion lnu, jako kosubstratu nasion łądźwianu w fermentacji typu tempe, na potencjał antyoksydacyjny otrzymanych produktów.

Sporządzono 5 rodzajów tempe: z samych nasion łądźwianu oraz z dodatkiem 5, 15, 25 i 35 % wycieków lnianych. Otrzymane produkty zliofilizowano, odfuszczone, a następnie sporządzono wodne i wodno-acetonowe (1 : 1, v/v) ekstrakty, w których oznaczono zawartość fenoli, aktywność antyrodnikową (ABTS⁺⁺ i ·OH lub DPPH[·]) oraz zdolność do redukcji.

Zawartość fenoli w ekstraktach wodnych była o 20 ÷ 80 % większa w przypadku produktów zawierających wycieki lniane w porównaniu z tempe z samych nasion łądźwianu. Ekstrakty te charakteryzowały się również o 50 ÷ 100 % większą aktywnością względem rodnika ABTS⁺⁺. Stosunkowo niewielki, 15-procentowy dodatek wycieków do podstawowego substratu fermentacji spowodował również maksymalny wzrost zdolności do wygaszania rodnika hydroksylowego. Ekstrakty wodne z produktów zawierających 35-procentowy dodatek wycieków wykazywały o 40 % wyższą i statystycznie istotną ($p < 0,05$) zdolność do redukcji niż tempe z samych nasion łądźwianu. Zawartość fenoli w ekstraktach wodno-acetonowych była 0,5 ÷ 3,5 razy większa w przypadku produktów z dodatkiem wycieków lnianych. Ekstrakty te wykazywały również 1,5 ÷ 10 razy większą aktywność względem rodnika DPPH[·] oraz 1,7 ÷ 3 razy wyższą zdolność do redukcji w porównaniu z produktem powstałym po fermentacji samych nasion łądźwianu. Aktywność antyoksydacyjna była skorelowana z zawartością fenoli, niezależnie od rodzaju zastosowanego ekstrahenta.

Słowa kluczowe: wycieki lniane, łądźwian siewny, tempe, fenole rozpuszczalne, aktywność antyrodnikowa, zdolność do redukcji

Wprowadzenie

Nasiona lnu oleistego charakteryzują się unikatowym składem, który stwarza możliwość wykorzystania ich jako komponentu żywności funkcjonalnej. Zawierają $10,5 \div 31,0$ % białka o składzie aminokwasowym porównywalnym z białkiem nasion soi [14], około 40 % tłuszczu i 30 % błonnika pokarmowego. Rozpuszczalny błonnik nasion lnu wykazuje działanie hipocholesterolemiczne, a ponadto zmniejsza wchłanianie glukozy do krwi [3]. Olej nasion lnu bogaty jest w kwas α -linolenowy (ALA), który może stanowić, zależnie od odmiany, $50 \div 70$ % puli wszystkich kwasów tłuszczowych [7]. Dobroczynność spożywania nasion lnu i oleju lnianego wykazano w badaniach z udziałem zwierząt i ludzi [5]. Nasiona lnu są szczególnie bogatym źródłem lignanu secoisolariciresinolu (SDG), który w jelicie grubym przekształcany jest przez bakterie do enterodiolu i enterolaktonu [25]. SDG, jego aglikon SECO oraz pochodzące z nich lignany wykazują aktywność antyoksydacyjną [6, 16] i przeciwrakową [5, 25]. Lignany z nasion lnu mogą odgrywać rolę w obniżaniu ryzyka zachorowalności na choroby układu sercowo-naczyniowego [17]. Ponadto SDG wykazuje działanie przeciwcukrzycowe [5, 28].

Wytłoki lniane (makuchy) stanowią produkt odpadowy po ekstrakcji oleju z nasion. Jadalne makuchy (np. z nasion soi, słonecznika, rzepaku, orzechów ziemnych) o wysokiej wartości odżywczej są zwykle przeznaczane na paszę dla zwierząt, głównie dla przeżuwaczy i ryb [18]. Możliwe jest jednak wykorzystanie wytłoków lnianych jako komponentu produktów spożywczych dla ludzi. Pozyskane z nich izolaty białka oraz ich hydrolizaty o określonych właściwościach mogą służyć jako składniki żywności funkcjonalnej [10, 26, 27]. Ogunronbi i wsp. [13] wykorzystali wytłoki z ciemnobrązowych nasion lnu jako zamiennik mąki do wypieku chlebów, a Nowicka i wsp. [12] zastosowali wytłoki lniane jako komponent przecieru aroniowego. Ciekawą alternatywą zagospodarowania tego odpadu może być zastosowanie wytłoków lnianych jako kosubstratu fermentacji typu tempe. Wyniki wcześniejszych doświadczeń wskazują, że w wyniku fermentacji nasion lędźwianu z dodatkiem makuchów lnianych przy udziale szczepu *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* uzyskuje się produkt o właściwościach funkcjonalnych. Dodatek nawet niewielkiej ilości makuchów lnianych (5 % m/m) do podstawowego substratu, jaki stanowiły nasiona lędźwianu, pozwolił na uzyskanie tempe wzbogaconego w kwas $n-3$ linolenowy. Tłuszcz tego tempe charakteryzował się znacznie korzystniejszym stosunkiem kwasów $n-6/n-3$ w porównaniu z tempe z samych nasion lędźwianu (2,5/1 i 11/1 przy pożądanym od 1/1 do 4/1). Ponadto dodatek makuchów lnianych nie wpływał na zmniejszenie zawartości białka, jak i na obniżenie jego strawności szacowanej metodą *in vitro* [22].

Celem pracy było określenie wpływu dodatku wytłoków lnianych, jako kosubstratu nasion lędźwianu w fermentacji typu tempe, na potencjał antyoksydacyjny otrzymanych produktów.

Material i metody badań

Material doświadczalny

Substratami fermentacji były nasiona lędźwianu siewnego (*Lathyrus sativus*) odmiany 'Krab', zakupione w Hodowli i Nasiennictwie Ogrodniczym Spółnia (Nochowo) oraz wytloki (makuchy) po tłoczeniu oleju lnianego na zimno, otrzymane z Zakładu Tłoczenia Olejów Roślinnych i Produkcji Kosmetyków Efavit (Poznań).

Szczep *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (Institute for Microbial, Taichung, Taiwan) hodowano na agarze brzezkowym. Zarodniki pozyskiwano z dwunastodniowych skosów, stosując sterylne roztwory soli fizjologicznej z dodatkiem peptonu (0,01 g/l) i Tweenu 80 (0,1 ml/l). Zawiesinę zarodników sączone trzykrotnie przez filtry o średnicy porów 11 µm (Nylon Net Filtres, Millipore) w celu pozbycia się fragmentów grzybni. Gęstość zawiesiny szacowano metodą liczenia zarodników w komorze Thoma.

Wytłoki lniane mieszano z taką objętością 5-procentowego kwasu mlekowego, aby zawartość wody w mieszaninie wynosiła 40 %, a pH zawierało się w zakresie 4 ÷ 5. Następnie mieszaninę autoklawowano (temp. 121 °C, 20 min). Po sterylizacji makuchy chłodzono do temp. 20 ± 2 °C.

Nasiona lędźwianu myto, osuszano, gotowano w wodzie przez 30 min, a następnie moczone przez 18 h. Po moczeniu nasiona obłuskiwano ręcznie, dzieląc je jednocześnie na połówki i gotowano ponownie przez 15 min w wodzie zakwaszonej kwasem mlekowym do pH 4,5 ÷ 5,0. Po gotowaniu nasiona odsączano, osuszano i chłodzono do temp. < 30 °C.

Nasiona lędźwianu oraz nasiona lędźwianu z dodatkiem wytlóków lnianych mieszano z zarodnikami *Rhizopus microsporus* ($1,2 \cdot 10^6$ zarodników na 60 g wyjściowej masy substratu). Zainokulowany materiał wkładano do perforowanych woreczków foliowych i formowano zwarty pakiecik o wysokości ok. 3 cm. Fermentację prowadzono w temp. 37 °C przez 2 h (indukcja kiełkowania zarodników), następnie – w 30 °C przez 27 h do uzyskania jednolicie przerośniętych i porośniętych białą grzybnią próbek, bez pierwszych oznak zarodnikowania. Proces zatrzymywano przez 10-minutowe gotowanie na parze, a następnie materiał liofilizowano (liofilizator Alpha, model 1-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Niemcy, ciśnienie < 1 mbar, 24 h).

Przygotowano 5 rodzajów produktów: tempe z lędźwianu oraz tempe z lędźwianu z dodatkiem 5, 15, 25 i 35 % (m/m) makuchów lnianych (każdy w trzech powtórzeniach). Materiał z trzech powtórzeń mieszano przed liofilizacją.

Metody badań

Przed wykonaniem analiz zliofilizowany materiał odtłuszczano heksanem w aparacie Soxhleta.

Suchą masę (s.m.) oznaczano za pomocą wagosuszarki (WPS 110S, Radwag, Radom).

Fenole rozpuszczalne [g/kg s.m.] oznaczano metodą według Swain i Hillis [24] w ekstraktach wodnych (0,1 mol/l bufor fosforanowy, pH 7,4) o stężeniu 0,5 g w 15 ml oraz w ekstraktach wodno-acetonowych (woda : aceton 1 : 1 v/v) o stężeniu 1 g w 20 ml. Jako standard zastosowano kwas galusowy o stężeniach 0,1 ÷ 1,5 mg %.

Aktywność neutralizacji wolnych rodników przez otrzymane produkty tempe oznaczano względem:

- rodnika hydroksylowego, według Marambe i wsp. [8], w ekstraktach wodnych (0,02 mol/l bufor fosforanowy, pH 7,4). Aktywność antyrodnikową wyrażano jako IC_{50} , co oznacza ilość mg próbki, z której sporządzono ekstrakt o zdolności do wygaszania 50 % rodnika hydroksylowego wygenerowanego w warunkach oznaczenia. Niższa wartość IC_{50} oznacza wyższą aktywność przeciwrodnikową;
- rodnika $ABTS^{++}$ (kwas 2,2'-azino-bis (3-etylbentotiazolino-6-sulfonowy)), metodą opisaną przez Starzyńską-Janiszewską i wsp. [21], w ekstraktach wodnych (0,1 mol/l bufor fosforanowy, pH 7,4). Aktywność antyrodnikową wyrażano w ekwiwalentach troloksu [μ mole troloksu/g s.m.] i jako IC_{50} , co oznacza ilość mg próbki, z której sporządzono ekstrakt o zdolności do wygaszania 50 % rodników $ABTS^{++}$ w warunkach oznaczenia;
- rodnika $DPPH^{\bullet}$ (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl), metodą opisaną przez Pekkarinena i wsp. [15], w ekstraktach wodno-acetonowych (woda : aceton – 1 : 1 v/v). Aktywność neutralizacji $DPPH^{\bullet}$ wyrażano w μ molach troloksu/g s.m.

Ponadto oznaczano zdolność do redukcji, według Ardestani i Yazdanparast [2], w obu rodzajach ekstraktów. Zdolność do redukcji ($RP_{0,5}$) zdefiniowano jako ilość mg próbki, z której sporządzono ekstrakt, wywołujący wzrost absorbancji mierzonej przy długości fali 700 nm o 0,5. Mniejsza wartość $RP_{0,5}$ wskazuje na wyższą zdolność do redukcji.

Ekstrakty z poszczególnych próbek wykonano w dwóch powtórzeniach, natomiast każdą analizę – w 4 lub 6 powtórzeniach.

Wyniki opracowano statystycznie za pomocą programu Statistica wer. 10. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji. W celu porównania wartości średnich zastosowano test NIR ($p < 0,05$). Wyliczono również współczynniki korelacji ($p < 0,05$) pomiędzy zawartością fenoli i aktywnością antyrodnikową badanego materiału.

Wyniki i dyskusja

Zawartość fenoli w ekstrakcie otrzymanym po wymywaniu tempe lędźwianowego buforem fosforanowym wynosiła 2,12 g/kg. Już niewielki dodatek (5 % m/m) wytlóków lnianych spowodował istotny ($p < 0,05$), około 20-procentowy wzrost zawartości fenoli w badanym materiale. W przypadku tempe z największym udziałem wytlóków oznaczony poziom fenoli był wyższy o ponad 80 % niż w produkcie z samych nasion lędźwianu (tab. 1).

Tabela 1. Zawartość fenoli i aktywność antyoksydacyjna ekstraktów wodnych z tempe
Table 1. Content of phenols and antioxidant activity of aqueous extracts from tempeh

Rodzaj tempe Type of tempeh	Suma fenoli Total phenols [g/kg s.m.] [g/kg dm]	ABTS ^{•+} [μmole troloksu/g s.m.] [μmol trolox/g dm]	ABTS ^{•+} IC ₅₀	•OH IC ₅₀	Zdolność do redukcji RP _{0,5} Reducing power RP _{0,5}
T0	2,12 ^a ± 0,05	21,38 ^a ± 0,52	1,40 ^c ± 0,034	5,04 ^c ± 0,30	43,73 ^d ± 0,36
T5	2,60 ± 0,01 b	32,36 ^b ± 0,94	1,13 ^d ± 0,028	5,66 ^d ± 0,04	36,47 ^c ± 0,48
T15	3,41 ± 0,01 c	39,46 ^c ± 0,64	1,01 ^b ± 0,013	3,98 ^a ± 0,19	28,53 ^b ± 0,38
T25	3,39 ± 0,02 c	38,81 ^c ± 0,40	1,04 ^c ± 0,012	4,8 ^b ± 0,17	28,31 ^b ± 0,62
T35	3,92 ± 0,03 d	45,39 ^d ± 1,02	0,93 ^a ± 0,011	3,92 ^a ± 0,07	27,32 ^a ± 0,73

Objaśnienia: / Explanatory notes:

T0 – tempe bez dodatku wytlóków lnianych (0 % makuchów) / tempeh without flaxseed oil cake added; T35 – tempe z 35-procentowym dodatkiem wytlóków lnianych / tempeh with 35 % of flaxseed oil cake added; IC₅₀ – ilość mg próbki, z której sporządzono ekstrakt o aktywności wygaszania 50 % rodników ABTS^{•+}/ •OH w warunkach oznaczenia / quantity of sample (mg) used to make extract able to scavenge 50% of ABTS^{•+}/ •OH under the assay conditions; RP_{0,5} – ilość mg próbki, z której sporządzono ekstrakt wywołujący wzrost absorbancji mierzonej λ = 700 nm o 0,5 / quantity of sample (mg) used to make extract that causes the increase of 0.5 in absorbance measured at λ = 700 nm. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; wartości średnie w kolumnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,05$ / mean values in column and denoted by different letters differ statistically significantly ($p < 0.05$).

Wzrost zawartości fenoli związany ze zmianą składu substratów fermentacji był skorelowany z aktywnością antyrodnikową i zdolnością do redukcji oznaczoną w ekstraktach wodnych. Istotne współczynniki korelacji Pearsona ($p < 0,05$) wskazują na silną zależność badanych parametrów (tab. 2).

Dodatek wytlóków do nasion lędźwianu spowodował istotny wzrost aktywności ekstraktów wodnych względem wolnego rodnika ABTS^{•+}. Produkty z dodatkiem wytlóków lnianych odznaczały się większą wartością ekwiwalentów troloksu – od 50 % (T5) do ponad 100 % (T35) – niż tempe z samych nasion lędźwianu (tab. 1). Tempe z 15-procentowym udziałem makuchów (T15) wykazywał istotnie ($p < 0,05$) większą aktywność wygaszania rodnika hydroksylogowego niż produkt otrzymany tylko z nasion lędźwianu (T0). Najmniejszą dawkę rodników hydroksylogowych wygenerowanych

w warunkach metody o aktywności neutralizacji 50 % (3,92 mg s.m. stanowiące 4/5 IC₅₀ próbki T0) oznaczono w przypadku tempe z największym udziałem wyłoków. Nie różniła się ona jednak istotnie ($p < 0,05$) od wartości próbki T15. Oznacza to, że stosunkowo niewielki dodatek wyłoków lnianych (15 %) do podstawowego substratu fermentacji spowodował maksymalny wzrost potencjału wygaszania OH[•] w warunkach doświadczenia (tab. 1). Ekstrakty wodne produktów otrzymanych na bazie nasion lędźwianu i wyłoków lnianych charakteryzowały się również istotnie ($p < 0,05$) wyższą zdolnością do redukcji niż ekstrakt z T0. Wskaźnik RP_{0,5} był tym niższy, im większy był udział wyłoków z nasion lnu w substracie poddanym fermentacji. W przypadku T35 dawka próbki (mg s.m.) potrzebna do uzyskania absorbancji równej 0,5 była o 40 % mniejsza niż w tempe z samych nasion lędźwianu (T0) (tab. 1).

Tabela 2. Współczynniki korelacji Pearsona między zawartością fenoli i aktywnością antyoksydacyjną ekstraktów wodnych z tempe

Table 2. Coefficients of Pearson's correlation between content of phenols and antioxidant activity of aqueous extracts from tempeh

Wyszczególnienie / Item	ABTS ^{•+}	ABTS ^{•+} IC ₅₀	•OH IC ₅₀	RP _{0,5}
Suma fenoli / Total phenols	0,984	-0,943	-0,799	-0,959
ABTS ^{•+}	-	-0,981	-0,728	-0,968
ABTS ^{•+} IC ₅₀	-	-	0,653	0,955
•OH IC ₅₀	-	-	-	0,717

Zawartość sumy fenoli wyekstrahowanych mieszaniną wody i acetonu (1 : 1 v/v) z tempe lędźwianowego wynosiła 1,83 g/kg s.m. Dodatek 5 % wyłoków lnianych do podstawowego substratu procesu spowodował wzrost zawartości fenoli o 50 %. Natomiast w produkcie zawierającym 35 % makuchów stwierdzono ponad 3,5-krotnie większą zawartość rozpuszczalnych fenoli niż w T0 (tab. 3).

Tabela 3. Zawartość fenoli i aktywność antyoksydacyjna ekstraktów wodno-acetonowych

Table 3. Content of phenols and antioxidant activity of aqueous-acetone extracts

Rodzaj tempe Type of tempeh	Suma fenoli / Total phenols [g/kg s.m.] / [g/kg dm]	DPPH [•] [μmole troloksu/g s.m.] [μmol trolox/g dm]	Zdolność do redukcji RP _{0,5} Reducing power RP _{0,5}
T0	1,83 ^a ± 0,021	2,04 ^a ± 0,25	63,57 ^e ± 1,90
T5	2,78 ^b ± 0,024	3,00 ^b ± 0,35	37,73 ^d ± 0,19
T15	4,41 ^c ± 0,084	11,14 ^c ± 0,22	26,95 ^c ± 0,24
T25	5,33 ^d ± 0,072	15,47 ^d ± 0,72	22,80 ^b ± 0,33
T35	6,79 ^e ± 0,12	20,66 ^e ± 0,67	18,84 ^a ± 0,51

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Zmiany zawartości związków fenolowych w badanych ekstraktach były wysoko skorelowane z aktywnością antyrodnikową i zdolnością do redukcji (istotne współczynniki korelacji Pearsona wynosiły odpowiednio: $r = 0,988$ i $-0,904$, $p < 0,05$) – tab. 4.

Dodatek wyłoków lnianych do nasion łądzwianu spowodował istotny wzrost aktywności ekstraktów wodno-acetonowych względem stabilnego rodnika DPPH*. Aktywność ta, wyrażona w postaci ekwiwalentów troloksu [$\mu\text{mol/g s.m.}$] była od 1,5 (T5) do 10 razy (T35) wyższa w porównaniu z tempe z samych nasion łądzwianu.

Wraz ze wzrostem udziału wyłoków lnianych w fermentowanym substracie wzrastała też istotnie ($p < 0,05$) zdolność do redukcji oznaczona w ekstraktach wodno-acetonowych. $RP_{0,5}$ próbki T5 było 1,7 razy niższe, a próbki T35 – ponad 3 razy niższe w porównaniu z $RP_{0,5}$ próbki T0.

Tabela 4. Współczynniki korelacji Pearsona między zawartością fenoli i aktywnością antyoksydacyjną ekstraktów wodno-acetonowych z tempe

Table 4. Coefficients of Pearson's correlation between phenols and antioxidant activity of aqueous-acetone extracts from tempeh

Wyszczególnienie / Item	DPPH*	$RP_{0,5}$
Suma fenoli / Total phenols	0,988	-0,904
DPPH*		-0,852

Zawartość fenoli w tempe łądzwianowym była zgodna z wcześniejszymi oznaczeniami autorów [20]. Dodatek wyłoków lnianych, zawierających wyjściowo 9,6 g/kg s.m. fenoli rozpuszczalnych (dane niepublikowane), do podstawowego substratu fermentacji, spowodował istotną zmianę zawartości tych związków w tempe. Niezależnie od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika (bufor, woda i aceton w stosunku 1 : 1) zawartość sumy fenoli zwiększała się wraz ze wzrostem udziału wyłoków w produkcie. Pomimo braku statystycznego porównania danych uzyskanych z dwóch różnych ekstraktów można stwierdzić, że rozpuszczalne związki fenolowe łatwiej przechodziły do fazy wodno-acetonowej. Wiadomo, że podatność fenoli na ekstrakcję jest związana zarówno z ich strukturą chemiczną, lokalizacją w tkance roślinnej, jak i rodzajem materiału. Ilość związków fenolowych oznaczana w danym materiale w dużej mierze zależy od sposobu ekstrakcji [1, 19]. W niniejszej pracy zdecydowano się na ekstrakcję mieszaniną wody z acetonem (1 : 1 v/v) na podstawie wyników badań, które przedstawili Xu i wsp. [29] oraz wyników własnych, wstępnych doświadczeń (dane niepublikowane), które dowodziły większej skuteczności takiego ekstrahenta w izolowaniu rozpuszczalnych związków fenolowych obecnych w produktach tempe.

W celu pełniejszej oceny potencjału antyoksydacyjnego zastosowano kilka różnych testów. Niezależnie od rodzajów ekstraktu, aktywność wygaszania wolnych rodników (ABTS^{•+} i [•]OH lub DPPH[•]) oraz zdolność do redukcji były silnie skorelowane z poziomem fenoli. Podobne obserwacje poczynili Anwar i Przybylski [1], którzy badali aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z nasion lnu.

Tempe z dodatkiem wytlóków lnianych, charakteryzujący się zarówno większą zawartością fenoli rozpuszczalnych, jak i większą aktywnością antyoksydacyjną w porównaniu z tempe lędźwianowym, może poszerzyć asortyment żywności o cechach funkcjonalnych, wzbogacanej w związki bioaktywne pochodzenia naturalnego [4]. Przykładem takich produktów mogą być chleby wypiekane z dodatkiem nasion lnu [11, 23, 9]. W przypadku tempe oznaczone zawartości fenoli, jak i ich antyoksydacyjna aktywność, wynikały nie tylko ze składu substratów, ale też z działania metabolicznego pleśni w czasie fermentacji [21].

Wnioski

1. Dodatek wytlóków lnianych do nasion lędźwianu miał istotny wpływ na zawartość fenoli i aktywność antyoksydacyjną produktów tempe, otrzymanych z tych surowców.
2. Dodatek wytlóków lnianych w ilości 5 ÷ 35 % do nasion lędźwianu wpłynął na wzrost zawartości fenoli rozpuszczalnych w ekstraktach wodnych o 20 ÷ 80 %, a w ekstraktach wodno-acetonowych – o 50 ÷ 270 %.
3. Produkty tempe, zawierające wytloki lniane, charakteryzowały się znacząco wyższą aktywnością względem wolnych rodników ABTS^{•+}, [•]OH, DPPH[•] i większą zdolnością do redukcji w porównaniu z tempe lędźwianowym.
4. Aktywność antyrodnikowa i zdolność do redukcji były wysoko skorelowane z zawartością rozpuszczalnych związków fenolowych w tempe.

Literatura

- [1] Anwar F., Przybylski R.: Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). Acta Sci. Pol., Technol. Aliment., 2012, **3** (11), 293-301.
- [2] Ardestani A., Yazdanparast R.: Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chem., 2007, **1** (104), 21-29.
- [3] Bloedon L.T., Szapary P.O.: Flaxseed and cardiovascular risk. Nutrition Reviews, 2004, **62**, 18- 27.
- [4] Dziki D., Różyło R., Gawlik- Dziki U., Świeca M.: Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. Trends Food Sci. Technol., 2014, **1** (40), 48-61.
- [5] Hall III C., Tulbek M.C., Xu Y.: Flaxseed. In: Advances in food and nutrition research. Ed. S.L. Taylor. Elsevier Academic Press, San Diego, 2006, pp. 2-96.

- [6] Hu C., Yuan Y.Y., Kitts D.D.: Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone *in vitro*. Food Chem. Toxicol., 2007, **45**, 2219-2227.
- [7] Łukaszewicz M., Szopa J., Krasowska A.: Susceptibility of lipids from different flax cultivars to peroxidation and its lowering by added antioxidants. Food Chem., 2004, **88**, 225-231.
- [8] Marambe P.W.M.L.H.K., Shand P.J., Wanasundara J.P.D.: An *in-vitro* investigation of selected biological activities of hydrolysed flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. J. Am. Oil Chem. Soc., 2008, **12 (85)**, 1155-1164.
- [9] Meral R., Dogan I.S.: Quality and antioxidant activity of bread fortified with flaxseed. Ital. J. Food Sci., 2013, **25**, 51-56.
- [10] Mueller K., Eisner P., Yoshie- Stark Y., Nakada R., Kirchhoff E.: Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). J. Food Eng., 2010, **98**, 453-460.
- [11] Muir A.D., Westcott N.D.: Quantitation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside in baked goods containing flax seed or flax meal. J. Agric. Food Chem., 2000, **9 (48)**, 4048-4052.
- [12] Nowicka P., Teleszko M., Wojdyło A., Oszmiański J.: Ocena walorów sensorycznych i wartości żywieniowej przecieru aroniowego z dodatkiem wyłoków z lnu i suszonych liści stewii. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2014, **1 (92)**, 124-136.
- [13] Ogunronbi O., Jooste P.J., Abu J.O., van Der Merwe B.: Chemical composition, storage stability and effect of cold- pressed flaxseed oil cake inclusion on bread quality. J. Food Process. Pres., 2011, **35**, 64-79.
- [14] Oomah B.D., Mazza G.: Flaxseed proteins- a review. Food Chem., 1993, **48**, 109-114.
- [15] Pekkarinen S.S., Stöckmann H., Schwarz K., Heinonen M.I., Hopia A.I.: Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. J. Agric. Food Chem., 1999, **8 (47)**, 3036-3043.
- [16] Prasad K.: Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside- derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol and enterolactone. Int. J. Angiol., 2000, **9**, 220-225.
- [17] Prasad K.: Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. Atherosclerosis, 2005, **179**, 269-275.
- [18] Ramachandran S., Singh S.K., Larroche C., Soccol C.R., Pandey A.: Oil cakes and their biotechnological applications - A review. Bioresource Technol., 2007, **98**, 2000- 2009.
- [19] Remiszewski M., Przygoński K., Kulczak M., Jeżewska M.: Optymalizacja układu ekstrakcyjnego i ocena właściwości przeciwutleniających nasion wybranych roślin strączkowych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2006, **1 (46) Supl.**, 127-135.
- [20] Starzyńska- Janiszewska A., Stodolak B., Duliński R., Mickowska B.: The influence of inoculum composition on selected bioactive and nutritional parameters of grass pea tempeh obtained by mixed-culture fermentation with *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* strains. Food Sci. Tech. Int., 2012, **2 (18)**, 113-122.
- [21] Starzyńska-Janiszewska A., Stodolak B., Jamróz M.: Antioxidant properties of extracts from fermented and cooked seeds of Polish cultivars of *Lathyrus sativus*. Food Chem., 2008, **2 (109)**, 285-292.
- [22] Stodolak B., Starzyńska- Janiszewska A., Mickowska B.: Effect of flaxseed oil- cake addition on the nutritional value of grass pea tempeh. Food Sci. Technol. Res., 2013, **6 (19)**, 1107-1114.
- [23] Strandas C., Kamal- Eldin A., Andersson R., Aman P.: Phenolic glucosides in bread containing flaxseed. Food Chem., 2008, **110**, 997-999.
- [24] Swain T., Hillis W.E.: The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. - The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric., 1959, **1 (10)**, 63-68.

- [25] Touré A., Xueming X.: Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bioactive components, and health benefits. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2010, **9**, 261-269.
- [26] Udenigwe C.C., Aluko R.E.: Antioxidant and angiotensin converting enzyme- inhibitory properties of flaxseed protein- derived high Fischer ratio peptide mixture. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 4762-4768.
- [27] Udenigwe C.C., Aluko R.E.: Multifunctional cationic peptide fractions from flaxseed protein hydrolysates. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2012, **67**, 1-9.
- [28] Westcott N.D., Muir A.D.: Flax seed lignan in disease prevention and health promotion. *Phytoch. Rev.*, 2003, **2**, 401-417.
- [29] Xu B.J., Chang S.K.C.: A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.*, 2007, **2 (72)**, 159-166.

EFFECT OF FLAXSEED OIL CAKE ADDITION ON ANTIOXIDANT POTENTIAL OF GRASS PEA TEMPEH

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the effect of flaxseed oil cake, added to grass pea seeds as a tempeh-type fermentation co-substrate, on the antioxidant potential of the products produced.

Five types of tempeh were made: one type made from grass pea seeds only and 4 types with the addition of 5, 15, 25, and 35 % of flaxseed oil cake. The products produced were lyophilized, defatted and, next, aqueous and aqueous-acetone extracts (1:1, v/v) were made, and the following was determined therein: content of phenols, antiradical activity (ABTS+• and •OH or DPPH), and reducing power.

As for the products containing flaxseed oil cake, the content of phenols in aqueous extracts was 20 – 80 % higher than in the tempeh from grass pea seeds only. Moreover, those extracts were characterized by a 50-100 % higher activity towards ABTS+• radical. Additionally, the addition of only 15% - a relatively low amount - of flaxseed oil cake to the basic fermentation substrate caused a maximal increase in the •OH scavenging activity potential. The reducing power of aqueous extracts from products with 35% of flaxseed oil cake added was 40% higher and statistically significant compared to the tempeh from grass pea seeds. The content of phenols in aqueous-acetone extracts was 0.5 – 3.5 times higher in the products with flaxseed oil-cake added. Additionally, these extracts showed a 1.5 - 10 times higher activity towards DPPH• and a 1.7- 3 times higher reducing power compared to the products produced after the fermentation of grass pea seeds only. The antioxidant activity was correlated with the content of phenols irrespective of the type of the used extract.

Key words: flaxseed oil cake, grass pea, tempeh, soluble phenols, antiradical activity, reducing power ☒