

OCENA WPŁYWU OBRÓBKİ HYDROTERMICZNEJ I CZASU FERMENTACJI NA ZAWARTOŚĆ POLIFENOLI I WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE PRODUKTÓW TEMPEH

Maciej Kuligowski¹, Agnieszka Gorzan¹, Iwona Jasińska-Kuligowska²,
Jacek Nowak¹

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

Streszczenie. Celem pracy była ocena wpływu rodzaju obróbki hydrotermicznej na zawartość polifenoli i potencjał antyoksydacyjny tempeh fasolowego poddanego 10-dniowej fermentacji. Opracowana skrócona metoda obróbki hydrotermicznej (metoda A) wobec klasycznej (metoda B) polegała na zastąpieniu całonocnego namaczania przez operację 5-minutowego gotowania. Surowiec do badań stanowiły nasiona fasoli odmiany Igołomska. Do fermentacji stosowano szczep grzybów *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. Oznaczenie sumy polifenoli przeprowadzono z zastosowaniem dwóch metod. Właściwości antyoksydacyjne oznaczono metodą z redukcją kationorodnika ABTS. Zaobserwowano istotną korelację pomiędzy zmianami potencjału antyoksydacyjnego a zmianami zawartości polifenoli oznaczanymi według metody Singleton i Rossi. Stwierdzono, że proces fermentacji istotnie zwiększa właściwości przeciwutleniające i ogólną zawartość oznaczanych polifenoli. Wyższe wartości potencjału przeciwutleniającego i ogólnej zawartości polifenoli występują po trzecim dniu fermentacji. Rodzaj zastosowanej obróbki hydrotermicznej ma wpływ na przebieg zmian i początkową wielkość właściwości przeciwutleniających oraz ogólną zawartość oznaczanych polifenoli.

Słowa kluczowe: tempeh, fermentacja, fasola, właściwości antyoksydacyjne, polifenole

WSTĘP

Spożycie nasion roślin strączkowych w Polsce jest niewielkie – według danych FAO wynosi 1,3 kg fasoli i 0,8 kg grochu na osobę rocznie i w stosunku do lat 70. maleje [<http://faostat.fao.org>]. Normy żywieniowe zalecają spożywanie nasion roślin strączkowych w ilości 2,1 do 6,2 kg [Jarosz i in. 2012]. Statystycznie Polak konsumuje więc ilość suchych nasion roślin strączkowych mieszczącą się w dolnych granicach zaleceń żywieniowych. Niechęć do konsumpcji nasion roślin strączkowych może wynikać z długiego czasu ich przygotowania oraz ze względu na gazy powstające w jelitach, co związane jest z obecnością w tym surowcu cukrów z grupy rafinozy. Zwiększenie konsumpcji nasion roślin strączkowych jest jednym z czynników prowadzących do poprawy zdrowia populacji, szczególnie w zakresie chorób serca [Menotti i in. 1999]. Jedną z metod zwiększenia popularności produktów z nasion strączkowych jest wykorzystanie azjatyckich technologii fermentacji. Jednym z popularnych w Europie azjatyckich produktów jest tempeh [Nout i Kiers 2005]. Tempeh to tradycyjny indonezyjski produkt, wytwarzany z nasion roślin strączkowych poprzez fermentację z udziałem grzybów z rodzaju *Rhizopus*, głównie *R. oligosporus* [Nowak 2006]. Wzbudza zainteresowanie badaczy m.in. ze względu na udokumentowaną zdolność do powstrzymywania biegunek [Nout i Kiers 2005], właściwości antybakteryjne [Chlebowska-Śmigiel i in. 2012] oraz znaczące zmiany zawartości oraz aktywności przeciwutleniającej polifenoli w trakcie fermentacji [Miszkiewicz i in. 2008].

Oprócz właściwości prozdrowotnych tempeh [Nout i Kiers 2005], akceptowalnych dla konsumenta cech organoleptycznych [Kuligowski i Nowak 2010], istotny jest również aspekt ekonomiczny technologii wytwarzania. W tym celu opracowano parametry obróbki hydrotermicznej nasion, pozwalające na znaczne skrócenie czasu trwania procesu [Kuligowski i Nowak 2010].

Celem pracy była ocena wpływu rodzaju obróbki hydrotermicznej na zawartość polifenoli i potencjał antyoksydacyjny tempeh fasolowego poddanego 10-dniowej fermentacji.

MATERIAŁ I METODY

Surowiec do badań stanowiły nasiona fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*) odmiany Igołomska otrzymane z Przedsiębiorstwa Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa „CNOS” w Poznaniu. Do fermentacji stosowano szczep grzybów *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 otrzymany z kolekcji szczepów Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, USA.

Opracowana skrócona metoda obróbki hydrotermicznej (metoda A) obejmowała 5-minutowe gotowanie nasion, obłuszczenie, 20-minutowe gotowanie i 15-minutowe chłodzenie w temperaturze pokojowej. Tradycyjna metoda obróbki hydrotermicznej (metoda B) polegała na poddaniu nasion namaczaniu przez 12 godzin, obłuszczeniu, 20-minutowym gotowaniu i 15-minutowym ochłodzeniu w temperaturze pokojowej. Po obróbce hydrotermicznej nasiona były zaszczipiane inokulum grzybów *R. oligosporus*, umieszczane w płytkach Petriego i inkubowane w temperaturze 37°C od 24 do 240

godzin. Inokulum przygotowano poprzez zawieszenie zarodników pleśni ze skosu po 72-godzinnej hodowli w temperaturze 37°C na podłożu PDA (Merck) w 10 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej.

Oznaczenia potencjału antyoksydacyjnego i zawartości polifenoli przeprowadzono z zastosowaniem ekstraktów z temph. Ekstrahent stanowiła 70-procentowa mieszanina acetonu z wodą. Do 0,5 g rozdrobnionego temph dodawano mieszaninę ekstrakcyjną, zawiesinę intensywnie wytrząsano, a następnie wirowano przy 1780× g przez 15 minut. Objętość supernatantu uzupełniano do 10 ml.

Przy oznaczeniu sumy polifenoli metodą Chandlera [Chandler i Dodds 1983, z modyfikacją Shetty i in. 1995] do 1 ml ekstraktu dodawano 1 ml 95% etanolu, 5 ml wody destylowanej oraz 0,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteuga. Następnie próbki inkubowano przez 5 minut w ciemności, dodawano 5% Na₂CO₃, mieszano i pozostawiano w ciemności w temperaturze pokojowej na 1 godzinę. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 725$ nm.

Oznaczenie sumy polifenoli metodą Folina-Ciocalteu według Singleton i Rossi [1965] polegało na dodaniu do 0,3 ml ekstraktu odczynnika Folina-Ciocalteuga, 0,5 ml 20% Na₂CO₃ oraz 4,15 ml wody destylowanej. Mieszaninę delikatnie mieszano i pozostawiano na 30 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 700$ nm.

Przy oznaczeniu ogólnej zawartości polifenoli wyniki obliczano na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej dla kwasu galusowego.

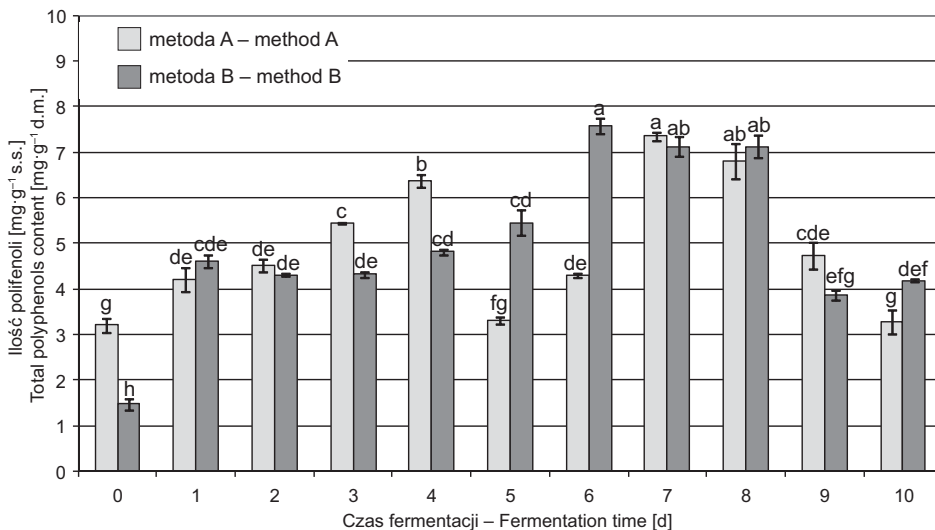
Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej przeprowadzono metodą z redukcją kationorodnika ABTS przez przeciwutleniacze zawarte w ekstraktach [Re i in. 1999]. Zdolności antyoksydacyjne obliczano na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej dla Troloxu. Wynik wyrażano w mg Troloxu g⁻¹ s.s.

Metody statystyczne

Do obliczenia istotnych różnic między średnimi z minimum trzech powtórzeń zastosowano pakiet Statistica 10 (StatSoft). Jednorodność wariancji badano testem Cochra, Hartleya i Bartletta a istotność różnic testem Tukeya, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Polifenole należą do związków, które mogą korzystnie oddziaływać na zdrowie ludzi. Możliwości oddziaływania poszczególnych związków należących do grupy polifenoli na organizm człowieka są różne, jednak suma ogólnej zawartość polifenoli może być pewną miarą potencjalnego prozdrowotnego oddziaływania produktu. Wśród surowców niefermentowanych (próbki oznaczone jako 0) mniejszą zawartość polifenoli oznaczono w nasionach fasoli poddanych klasycznej obróbce hydrotermicznej (rys. 1). Mogło to być spowodowane ich wymyciem w trakcie całonocnego moczenia. Największe zawartości polifenoli oznaczone metodą Chandlera obserwowano dla temph poddanego 7- i 8-dniowej fermentacji, niezależnie od rodzaju obróbki hydrotermicznej. W 3., 4. i 9. dniu fermentacji wyższe wartości polifenoli oznaczono w ekstraktach z temph poddanego obróbce hydrotermicznej metodą skróconą (rys. 1).

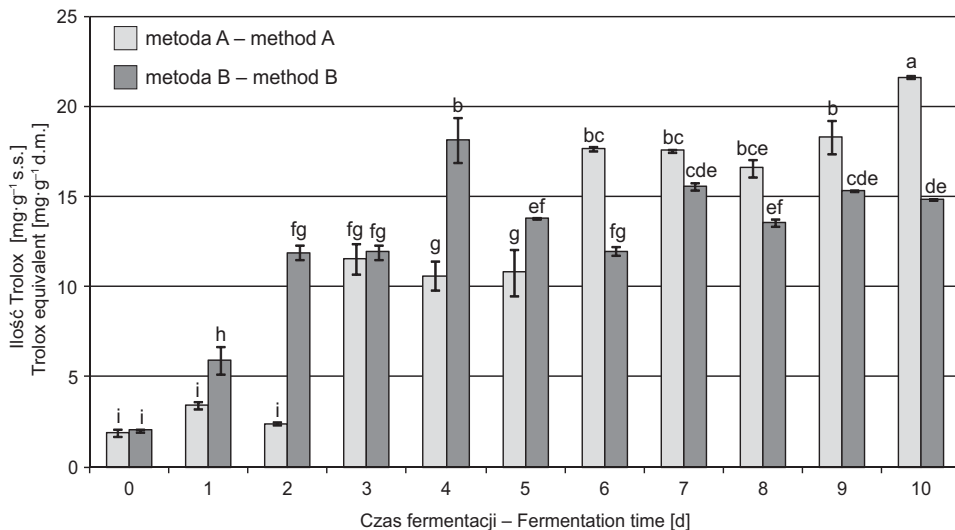


Rys. 1. Zmiany zawartości polifenoli oznaczanych metodą Chandlera (wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$)

Fig. 1. Changes in total polyphenols content by Chandler method (mean values denoted using the same letter do not differ statistically significantly at $\alpha = 0.05$)

W dostępnej literaturze nie opisywano dotychczas zmian zawartości polifenoli w tempeh z fasoli w trakcie dłuższej niż 24-godzinnej fermentacji. Bieżanowska-Kopeć i inni [2006] prowadzili 24-godzinną fermentację nasion fasoli z użyciem *Rhizopus microsporus v. oligosporus* sp. T3 i otrzymali produkt o zawartości polifenoli $3,27 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ s.s.}$ Różnice w oznaczonej zawartości polifenoli uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy i w badaniach Bieżanowskiej-Kopeć mogły być spowodowane zmiennością surowca, odmienną metodą obróbki hydrotermicznej surowca oraz innym sposobem ekstrakcji polifenoli (Bieżanowska-Kopeć i in. zastosowali 80-procentowy roztwór etanolu). Bieżanowska-Kopeć i inni do przygotowania krzywej wzorcowej zastosowali katechinę, a nie kwas galusowy, co mogło mieć wpływ na obliczoną ilość polifenoli. Kosińska i inni [2009] stwierdzili, że absorbancja odczynnika Folina-Ciocalteu w reakcji z kwasem galusowym jest nieco niższa niż z katechiną, przez co obliczone stężenie polifenoli może być mniejsze w przypadku użycia jako związku wzorcowego kwasu galusowego niż przy użyciu katechiny. Z badań tego zespołu wynika, że przelicznik zawartości polifenoli oznaczonych za pomocą kwasu galusowego w stosunku do zawartości polifenoli oznaczonych przy użyciu katechiny wynosi 1,36.

Ogólną zawartość polifenonoli oznaczano metodą z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteauga. Metoda ta pozwala na oznaczenie wszystkich polifenoli, niezależnie od ich struktury [Osziński 2007]. Inni autorzy twierdzą, iż zdolność związku fenolowego do redukcji odczynnika Folina-Ciocalteau zależy od jego struktury, obecności w pierścieniu grup hydroksylowych i metoksyłowych oraz od ich położenia [Kosińska i in. 2009]. Wzrost zawartości polifenoli obserwowany w trakcie fermentacji tempeh mógł być spowodowany uwolnieniem polifenoli z trwałych połączeń z innymi składnikami



Rys. 2. Zmiany właściwości antyoksydacyjnych w trakcie fermentacji (wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$)

Fig. 2. Changes in antioxidant activity during fermentation (mean values denoted using the same letter do not differ statistically significantly at $\alpha = 0.05$)

żywności, przez co była możliwa ich ekstrakcja, jak również zmianą struktury polifenoli, które przeszły w formy powodujące bardziej intensywną reakcję z odczynnikami Folina-Ciocalteauga.

Ocenę właściwości antyoksydacyjnych przeprowadza się, często używając testów z wykorzystaniem reagentów ABTS i DPPH. W związku z tym, że wyniki uzyskane podczas oznaczania właściwości przeciwutleniających produktów tempeh z użyciem obu tych metod były często zbliżone [Miszkiewicz i in. 2008, Starzyńska-Janiszewska i in. 2008], zdecydowano się wykorzystać tylko jedną z nich – ABTS. Potencjał antyoksydacyjny produktu jest również jednym z parametrów mogących być wyznacznikiem korzystnego oddziaływania żywności na organizm człowieka. Oznaczenie przebiegu zmian właściwości antyoksydacyjnych w trakcie fermentacji wykazało, że od 1. do 5. dnia fermentacji większym potencjałem przeciwutleniającym charakteryzowały się tempeh otrzymane za pomocą klasycznej obróbki hydrotermicznej (rys. 2). Z kolei po 6. dniu fermentacji większe właściwości antyoksydacyjne oznaczono dla tempeh otrzymanego za pomocą metody A. Jedynie w 3. dniu fermentacji typ obróbki hydrotermicznej nie miał wpływu na wartość potencjału antyoksydacyjnego.

Fermentacja powodowała wzrost właściwości przeciwutleniających, przy czym dla tempeh wytworzonego z surowca poddanego skróconej obróbce hydrotermicznej największą wartość potencjału antyoksydacyjnego oznaczono w 10. dniu fermentacji. Dla tempeh otrzymanego za pomocą metody B największe właściwości przeciwutleniające uzyskano natomiast w 4. dniu fermentacji i były one o 19% mniejsze od największych w tempeh poddanych obróbce za pomocą metody A.

Miskiewicz i inni [2008] podczas fermentacji nasion grochu przez szczep *R. oligosporus* NRRL 2710 w bioreaktorze obserwowali niewielkie zmniejszenie potencjału antyoksydacyjnego oznaczanego za pomocą zarówno testów z kationorodnikiem ABTS, jak i DPPH po pierwszym dniu fermentacji, a następnie wzrost właściwości antyoksydacyjnych. Podobnie wzrost potencjału antyoksydacyjnego obserwowali również Starzyńska-Janiszewska i inni [2008] po fermentacji typu tempeh nasion lędźwianu siewnego.

Niektórzy autorzy stwierdzili, że korelacja między zawartością polifenoli ogółem oznaczona metodą z odczynnikiem Folina-Ciocalteuga a aktywnością przeciwutleniającą oznaczoną m.in. metodą z rodnikiem ABTS wynika z podobieństwa tych metod opartych na reakcjach utlenienia i redukcji, niż z porównania rzeczywistej zawartości tych parametrów [Oszmiański 2007]. Dlatego postanowiono sprawdzić wzajemną korelację zmian polifenoli ogółem i wielkości potencjału antyoksydacyjnego. Wobec braku istotnej korelacji między tymi parametrami (tab. 1) przeprowadzono dodatkowe oznaczenia zawartości polifenoli ogółem, z wykorzystaniem do detekcji metody według Singleton i Rossi [1965]. Oznaczenia zawartości polifenoli ogółem według tej metody (rys. 3) charakteryzowały się większą korelacją ze zmianami potencjału antyoksydacyjnego (0,89 i 0,87).

Różnice w zawartości polifenoli oznaczonych różnymi metodami mogły być spowodowane odmiennymi warunkami reakcji barwnej z odczynnikiem Folina-Ciocalteuga, przez co produkt reakcji barwnej mógł powstawać z nieco innymi grupami związków.

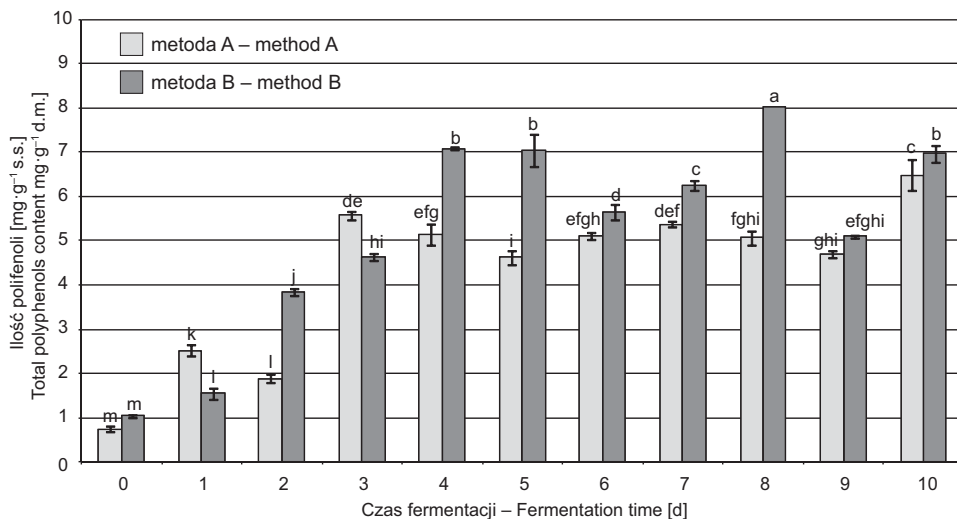
Tabela 1. Korelacja zmian aktywności antyoksydacyjnej i zawartości polifenoli w trakcie fermentacji

Table 1. Correlation of changes in antioxidant activity and polyphenols content during fermentation

	a	b	c	d	e	f	g
a	1						
b	0,95	1					
c	0,71	0,68	1				
d	0,23	0,28	0,51	1			
e	0,47	0,54	0,52	0,56	1		
f	0,79	0,89	0,80	0,37	0,57	1	
g	0,77	0,75	0,87	0,43	0,64	0,83	1

a – czas fermentacji; b – zmiany potencjału antyoksydacyjnego w tempeh uzyskanych za pomocą metody A; c – zmiany potencjału antyoksydacyjnego w tempeh uzyskanych za pomocą metody B; d – zawartość polifenoli w tempeh uzyskanych za pomocą metody A oznaczona metodą Chandlera; e – zawartość polifenoli w tempeh uzyskanych za pomocą metody B oznaczona metodą Chandlera; f – zawartość polifenoli w tempeh uzyskanych za pomocą metody A oznaczona metodą według Singleton i Rossi; g – zawartość polifenoli w tempeh uzyskanych za pomocą metody B oznaczona metodą według Singleton i Rossi.

a – fermentation time; b – changes of antioxidant activity in tempeh obtained by method A; c – changes of antioxidant activity in tempeh obtained by method B; d – changes in total polyphenols content by Chandler method in tempeh obtained by method A; e – changes in total polyphenols content by Chandler method in tempeh obtained by method B; f – changes in total polyphenols content by Singleton i Rossi method in tempeh obtained by method A; g – changes in total polyphenols content by Singleton i Rossi method in tempeh obtained by method B.



Rys. 3. Zmiany zawartości polifenoli oznaczanych metodą według Singleton i Rossi (wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$)

Fig. 3. Changes in total polyphenols content by Singleton and Rossi method (mean values denoted using the same letter do not differ statistically significantly at $\alpha = 0.05$)

Wyniki ogólnej zawartości polifenoli uzyskane przez Biezanowską-Kopeć i innych [2006] były nieco wyższe od wyników uzyskanych w niniejszej pracy przy oznaczeniu metodą według Singleton i Rossi [1965], a niższe od uzyskanych za pomocą metody Chandlera [Chandler i Dodds 1983, z modyfikacją Shetty i in. 1995]. Biezanowska-Kopeć i inni [2006] do oznaczania ogólnej zawartości polifenoli stosowali metodę z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteauga, lecz według opisu Swain i Hillis [1959].

Różnice w przeprowadzeniu reakcji barwnej przy oznaczeniu polifenoli determinują uzyskane wartości ogólnej zawartości polifenoli (rys. 1 i 2), jednak pozwalają stwierdzić, że pod wpływem fermentacji zawartość oznaczanych polifenoli zwiększała się. Zwiększenie zawartości oznaczanych polifenoli, spowodowane uwolnieniem z połączeń z innymi związkami, jest uznawane jako zwiększenie ich biodostępności w organizmie człowieka [Neumann i in. 2006, Hole i in. 2012]. O zwiększeniu właściwości prozdrowotnych tempeh świadczy również wzrost właściwości przeciwutleniających. W badaniach laboratoryjnych, w celu uzyskania zamierzonych właściwości i ocenie przemian, fermentację typu tempeh prowadzono nawet do 20 dni [Randhir i in. 2004]. W Indonezji, gdzie wytwarza się największe ilości tempeh, proces fermentacji trwa maksymalnie do 8 dni [Nout i Kiers 2005]. Tempeh dostępny na rynkach europejskich najczęściej poddany jest 1-dniowej fermentacji. Z tego względu opracowana skrócona metoda obróbki hydrotermicznej może być przydatna, gdyż nie stwierdzono jej wpływu na obniżenie ogólnej zawartości oznaczanych polifenoli po 1 dniu fermentacji w porównaniu do tempeh otrzymanego za pomocą klasycznej metody obróbki (rys. 1 i 3), aczkolwiek właściwości antyoksydacyjne tempeh po zastosowaniu klasycznej metody obróbki hydrotermicznej były większe (rys. 2).

WNIOSKI

1. Proces fermentacji istotnie zwiększa właściwości przeciwutleniające i ogólną zawartość oznaczanych polifenoli.
2. Rodzaj obróbki hydrotermicznej ma wpływ na przebieg zmian i początkową wielkość właściwości przeciwutleniających oraz ogólną zawartość oznaczanych polifenoli.
3. Wyższe wartości potencjału przeciwutleniającego i ogólnej zawartości polifenoli występują po trzecim dniu fermentacji.

LITERATURA

- Bieżanowska-Kopeć R., Franczyk M., Pisulewski P., Polaszczyk Sz., 2006. Wpływ fermentacji przez *Rhizopus microsporus oligosporus* sp. T3 oraz kiełkowania na zmiany zawartości składników nasion fasoli. Żywn. Nauk. Technol. Ja. 2 (47), 93–101.
- Chandler S.F., Dodds J.H., 1983. The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasidine in callus cultures of *Solanum lacinitum*. Plant Cell Rep. 2, 105–107.
- Chlebowska-Śmigiel A., Gientka I., Mroczek K., 2012. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej żywności typu tempeh. Bromatol. Chem. Toksyk. XLV, 3, 455–460.
- Hole A.S., Rud I., Grimmer S., Sigl S., Narvhus J., Sahlstrom S., 2012. Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. J. Agr. Food Chem. 60, 6369–6375.
- <http://faostat.fao.org/>
- Jarosz M., Respondek W., Wolnicka K., Sajór I., Wierzejska R., 2012. Zalecenia dotyczące żywienia i aktywności fizycznej. W: Jarosz M., 2012. Normy żywienia dla populacji polskiej – nowelizacja. Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa, 154–171.
- Kosińska A., Zduńczyk P., Karamać M., Amarowicz R., 2009. Porównanie zdolności wybranych związków fenolowych do redukcji odczynnika Folina-Ciocalteuga. XX Ogólnopolskie Sympozjum Bromatologiczne „Jakość Żywności i Żywienia oraz Przedmiotów Użytku”, Warszawa, 122–123.
- Kuligowski M., Nowak J., 2010. Ocena możliwości adaptacji i zastosowania tradycyjnych azjatyckich technologii w produkcji żywności na rynek polski. Aparat. Bad. Dyd. 15, 63–69.
- Menotti A., Kromhout D., Blackburn H., Fidanza F., Buzina R., Nissinen A., 1999. Food intake patterns and 25-year mortality from coronary heart disease: Cross-cultural correlations in the Seven Countries Study. Eur. J. Epidemiol. 15, 507–515.
- Miszkievicz H., Okrajni J., Bielecki S., 2008. Zmiany zawartości oraz aktywności przeciwutleniającej polifenoli i albumin grochu podczas fermentacji w bioreaktorze SSSR. Żywn. Nauk. Technol. Ja. 3 (58), 67–79.
- Neumann M., Goderska K., Grajek K., Grajek W., 2006. Modele przewodu pokarmowego *in vitro* do badań nad biodostępnością składników odżywczych. Żywn. Nauk. Technol. Ja. 1 (46), 30–45.
- Nout M.J.R., Kiers J.L., 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. J. Appl. Microbiol. 98, 789–805.

- Nowak J., 2006. Żywność fermentowana w kuchniach różnych narodów. W: Gawęcki J., Libudzisz Z., 2006. Mikroorganizmy w żywności i żywieniu. Wyd. Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań, 81–92.
- Oszmiański J., 2007. Metody oznaczania właściwości przeciwutleniających. W: Grajek W., Przewutleniające w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne. Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa, 295–310.
- Randhir R., Vattam D., Shetty K., 2004. Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA. *Innov. Food Sci. Emerg.* 5, 235–244.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free. Radical. Bio. Med.* 26 (9/10), 1231–1237.
- Shetty K., Curtis O.F., Levin R.E., Witkowsky R., Ang V., 1995. Prevention of vitrification associated with the in vitro shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *Journal of Plant Physiology* 147, 447–451.
- Singleton V.L., Rossi J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16, 144–158.
- Starzyńska-Janiszewska A., Stodolak B., Jamróza M., 2008. Antioxidant properties of extracts from fermented and cooked seeds of Polish cultivars of *Lathyrus sativus*. *Food Chem.* 109 (2), 285–292.
- Swain T., Hillis W.E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agr.* 10, 63–68.

AN ASSESSMENT OF THE IMPACT OF HYDROTHERMAL TREATMENT AND FERMENTATION ON POLYPHENOLS CONTENT AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF TEMPEH PRODUCTS

Summary. Tempeh is a product obtained from legumes through fermentation with participation of moulds from genus *Rhizopus*. The aim of this research was the estimation of hydrothermal treatment and fermentation impact on polyphenols content and antioxidant properties in bean tempeh products. Two hydrothermal methods of bean variety Igołomska pre-treatment were tested. In the method A seeds of bean were boiled for 5 minutes, dehulled, again cooked by 20 min and cooled. In method B seeds were overnight soaked, dehulled, cooked by 20 min and cooled. After that material was inoculated with the *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 spore suspension, placed on Petri dishes of 15 cm diameter and fermented for a period of up to 10 days at 37°C. Antioxidant activity was measured using the ABTS method. Total polyphenols content was determined using Folin Ciocalteu reagent described by Chandler and Dods and additionally by method described by Singleton and Rossi. The fermentation process significantly increases the antioxidant activity and the total polyphenols content. After three days of fermentation the antioxidant capacity and the total polyphenols content was higher than in the first days of fermentation. The largest increase in the amount of polyphenols was determined by Singleton and Ross method and it was 8.7 and 7.7 times higher for methods A and B (respectively). The content of polyphenols was the highest in 8 day fermented tempeh prepared using method B and amounted 8,01 mg·g⁻¹. The high correlation between

fermentation time, changes in antioxidant activity and total polyphenols content by Singleton and Rossi method was observed (0,89 and 0,87 for A and B method respectively). The type of the hydrothermal treatment has an impact on the course of changes and the initial antioxidative capacity as well as on the total polyphenols content. There was no influence on the reduction of total polyphenols content after 1 day of fermentation as compared to the tempeh prepared by the classical method of treatment. Most of the available on the European market tempeh is one day fermented product, therefore shortened hydrothermal treatments can be useful. Although the antioxidant properties of tempeh after the classical method of hydrothermal treatment were higher.

Key words: tempeh, fermentation, bean, antioxidative properties, polyphenols