

Fenolinių rūgščių kiekis skirtingą laiką fermentuotuose siauralapio gauromečio (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub) lapuose

Marius Lasinskas,

Elvyra Jarienė

Vytauto Didžiojo universitetas,
Žemės ūkio akademija,
Donelaičio g. 58, 44248 Kaunas
El. paštas: marius.lasinskas@vdu.lt;
elvyra.jariene@vdu.lt

Tyrimo tikslas – ištirti ir nustatyti skirtingos trukmės kietafazės fermentacijos įtaką fenolinių rūgščių kitimui gauromečio lapuose. Tirti biodinaminiam ūkyje natūraliai augančių siauralapių gauromečių (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub) lapai, surinkti 2017 metais. Žaliava iš įvairių augimvietės vietų atsitiktine tvarka surinkta liepos mėn. masinio žydėjimo pradžioje. Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademijos Žemės ūkio ir maisto mokslų instituto laboratorijoje susmulkinti gauromečio lapai buvo fermentuojami anaerobinėmis sąlygomis 30 °C temperatūroje uždaroje tamsioje patalpoje 24 arba 48 valandas. Eksperimentas buvo vykdytas trimis pakartojimais. Po fermentacijos žaliava išdžiovinta 40 °C temperatūroje. Fenolinių rūgščių kiekis nustatytas aukšto slėgio skysčių chromatografijos (ASSC) metodu. Tyrimų duomenys buvo statistiškai apdoroti naudojant dispersinės analizės (ANOVA) metodą. Statistinis skirtumų tarp vidurkių reikšmingumas įvertintas Fišerio LSD testu ($p < 0,05$). Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad po 24 val. kietafazės fermentacijos padaugėjo benzoinės ir *p*-kumaro rūgščių, o sumažėjo – galo, chlorogeninės ir elago rūgščių kiekiai. Po 48 val. fermentavimo gauti priešingi tyrimų rezultatai, t. y. galo rūgšties padaugėjo, o chlorogeninės, *p*-kumaro, elago ir benzoinės rūgščių kiekiai – sumažėjo.

Raktažodžiai: siauralapis gaurometis, fenolinės rūgštys, kietafazė fermentacija

ĮVADAS

Vienas iš augalų, galinčių padėti išspręsti sveikatos ir mitybos problemas, yra siauralapis gaurometis (*Chamerion angustifolium* L. Holub). Tai vienas geriausiai žinomų vaistinių augalų Lietuvoje ir visame pasaulyje (Lasinskas ir kt., 2018). Gauromečio lapai naudojami tradicinėje ir liaudies medicinoje, pasižymi įvairiais farmakologiniais poveikiais: priešūždegiminiu, antioksidaciniu, analgetiniu, priešvėžiniu ir kt. (Vitalone et al., 2001; Vitalone et al., 2003a; Vitalone et al., 2003b). Gausu duomenų apie gauromečio lapų arbatos teigiamą poveikį migreniniams galvos skausmams, anemijai, infekcijoms ir peršalimo ligoms gydyti. Gauromečio arbata tinka skrandžio opai, dvyli-

kapirštės žarnos opai, gastritui, kolitui, įvairiems virškinimo trakto sutrikimams gydyti, prostatos ir šlapimo problemoms mažinti (Prasad et al., 2018). Šiuo metu mokslininkai ieško būdų, kaip jį panaudoti efektyvių preparatų ir maisto produktų gamybai. Todėl labai svarbu žinoti gauromečio lapų cheminę sudėtį. Fenolinės rūgštys yra vienos iš dažniausiai identifikuojamų biologiškai aktyvių junginių gauromečio lapuose. Dominuoja galo rūgštis (3,4,5-trihidroksibenzoinė rūgštis) ir jos metilo esteris, protokatechino rūgštis (3,4-dihidroksibenzoinė rūgštis), elago rūgštis, oktil galatas, 5-O-kafeoil-kvino rūgštis, 6-O-galoilgliukozė, 1,2,6-O-trigaloil-gliukozė ir 1,2,3,4,6-O-pentagaloil-gliukozė (Kiss et al., 2011; Stolarczyk et al., 2013; Karakurt et al., 2016).

Vienas iš būdų pagerinti gauromečio lapų produktų kokybę ir sukurti fitocheminius sveikatinančius profilius, yra kietafazė fermentacija (Pandey, 1992, 1994, 2003; Pandey et al., 2000, 2001). Tačiau tyrimų apie skirtingą kietafazės fermentacijos trukmės įtaką gauromečio lapų cheminei sudėčiai nėra. Šio darbo tikslas – ištirti kietafazės fermentacijos skirtingos trukmės įtaką išgaunamam fenolinių rūgščių kiekiui iš gauromečio lapų. Remdamiesi šiais tyrimo rezultatais galėtume pateikti gamintojams rekomendacijas, kaip gaminti aukštos kokybės produktus iš gauromečio lapų.

TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

Tyrimui pasirinkti Švenčionių rajone, Daukšių kaime, Aušrinės Šėmienės biodinaminiam ūkyje natūraliai augančių siauralapių gauromečių (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub) lapai, surinkti 2017 metais. Žaliava iš įvairių augimvietės vietų atsitiktine tvarka buvo surinkta liepos mėn. masinio žydėjimo pradžioje. Jungtinis lapų mėginys sudarė 5,4 kg. Laboratoriniam eksperimentui jis buvo padalytas į tris dalis: kontrolei – 1,8 kg (džiovinti nefermentuoti lapai), 3,6 kg – kietosios fazės fermentacijai, kurios trukmė 24 val. ir 48 val. Kontrolei skirti gauromečio lapai nebuvo fermentuojami, bet saugomi numatytą laiką.

Anaerobinės kietafazės fermentacijos procesui vykdyti šviežių gauromečių lapai susmulkinti specialiais plastikiniais peiliais ir gauta žaliava padalyta po 0,600 kg. Fermentacijai paruošta masė buvo standžiai supresuota į stiklinius indus ir sandariai uždengta. Fermentacijos procesas vyko 30 °C temperatūroje uždaroje tamsioje patalpoje 24 arba 48 valandas. Eksperimentas buvo vykdytas trimis pakartojimais. Po fermentacijos žaliava išdžiovinta 40 °C temperatūroje ir buvo saugoma popieriniuose maišuose tamsioje, sausoje, vėsioje ir vėdinamoje patalpoje. Visi cheminiai tyrimai buvo atlikti trimis pakartojimais.

Gauromečio lapų cheminė sudėtis buvo tirta Varšuvos gyvybės mokslų universiteto Biocheminių tyrimų laboratorijoje. Sausojoje medžiagoje buvo nustatytas polifenolių atskyrimas ir identifikavimas.

Polifenolių junginiai buvo išmatuoti aukšto slėgio skysčių chromatografijos (ASSC) metodu, kurį anksčiau išsamiai aprašė A. Ponderis ir E. Hallmannas (2019). 100 mg džiovintų augalų lapų

miltelių sumaišoma su 5 ml 80 % metanolio ir suplakama su „Micro-Shaker 326“ („Marki“, Lenkija). Tada visi mėginiai buvo ekstrahuojami ultragarso vonioje (10 min., 30 °C, 5,5 kHz). Po 15 min. ekstrahavimo mėginiai buvo centrifuguojami (10 min., 3780 × g, 5 °C). Supernatantas buvo atsargiai surenkamas į švarų plastikinį mėgintuvėlį ir vėl centrifuguojamas (5 min., 31180 × g, 0 °C). Iš viso į ASSC buteliuką buvo perpilta 850 µl viršnuosėdinio skysčio. Polifenolių junginiams atskirti ir identifikuoti buvo naudojama „Synergi Fusion-RP 80i Phenomenex“ kolonėlė (250 × 4,60 mm). Analizė atlikta naudojant „Shimadzu“ įrangą (JAV Manufacturing Inc, Libanas, IN, JAV: du siurbliai LC-20AD, valdiklis CBM-20A, kolonėlės krosnis SIL-20AC, spektrometras UV/Vis SPD-20 AV). Fenoliniai junginiai buvo atskirti gradiento sąlygomis tėkmės greičiu 1 mL min⁻¹. Buvo naudojamos dvi gradiento fazės: 10 % (V:V) acetonitrilo ir ypač gryno vandens (A fazė); 55 % (V:V) acetonitrilo ir ypač gryno vandens (B fazė). Fazės parūgština mos ortofosforo rūgštimi (pH 3,0). Bendras analizės laikas siekė 38 min. Fazinio laiko programa buvo tokia: 1,00–22,99 min., 95 % A fazės ir 5 % B fazės; 23,00–27,99 min., 50 % A fazės ir 50 % B fazės; 28,00–28,99 min., 80 % A fazės ir 20 % B fazės; 29,00–38,00 min., 95 % A fazės ir 5 % B fazės. Bangos ilgis buvo 250 nm flavonoliams ir 370 nm fenolio rūgštims. Fenolio junginiai identifikuoti naudojant 99,9 % grynumo standartus (Sigma-Aldrich, Szalągowska, Lenkija) ir standartų analizės laiką.

Visi duomenys buvo statistiškai apdoroti naudojant dispersinės analizės (ANOVA) metodą iš programinės įrangos paketo STATISTIKA (Statistica 10; StatSoft, Inc., Tulsa, OK, JAV). Duomenys buvo išreikšti kaip aritmetiniai vidurkiai. Statistinis skirtumų tarp vidurkių reikšmingumas įvertintas Fišerio LSD testu ($p < 0,05$).

TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Kietafazės fermentacijos metu vykstantis mikrobinis metabolizmas ir išskiriami fermentai turi reikšmingą įtaką fermentuotų produktų sudėčiai, nes makromolekuliniai komponentai (polisacharidai, proteinai, lipidai) suskaldomi į mažesnės molekulinės masės junginius (dekstrinus, cukrus, peptidus, amino rūgštis, laisvasias riebalų rūgštis). Susidaro antriniai metabolizmo produktai – rūgštys,

alkoholiai, esteriai, aldehidai, ketonai, vitaminai ir kt. (Farnworth, 2008).

Gaurometyje randamos galo, chlorogeninė, *p*-kumaro, elago, benzoinė ir kitos fenolinės rūgštys, kurios gali būti naudojamos maisto pramonėje.

Bendras fenolinių rūgščių kiekis abiem atvejais sumažėjo iš esmės, palyginti su kontrole: po 24 val. kietafazės fermentacijos – 24,4 %, o po 48 val. kietafazės fermentacijos – net 56,6 % (lentelė).

Galo rūgštis yra trihidroksibenzoinė fenolinė rūgštis ($C_6H_2(OH)_3COOH$). Ji randama ir kaip laisvoji, ir kaip hidrolizuojamų taninų dalis. Galo rūgšties funkcinės grupės paprastai yra sujungtos, kad susidarytų dimerai, tokie kaip elago rūgštis. Hidrolizuojami taninai suskaidomi hidrolizės metu į galo rūgštį ir gliukozę arba elago rūgštį ir gliukozę, atitinkamai vadinami galotaniniais ir elagotaniniais (Pengelly, 2004).

Galo rūgšties kiekis, palyginti su kontrole, iš esmės padidėjo (net 50,6 %) po 48 val. kietafazės fermentacijos (lentelė). Tai galima paaiškinti tuo, kad dėl padidėjusio fermentų aktyvumo ir suintensyvjusios elago rūgšties bei galotanınų mikrobinio

metabolizmo daugiau dimerų ir taninų buvo suskaidyta į mažesnės molekulinės masės junginius.

Elago rūgštis yra heksahidroksidifeno rūgšties dilaktonas ($C_{14}H_6O_8$). Augalai gamina elago rūgštį hidrolizuodami taninus, tokius kaip elagotanas ir geranijinas (Seigler et al., 1998).

Iš pateiktų duomenų matome, kad elago rūgštis sudaro didžiausią dalį fenolinių rūgščių, esančių siauralapio gauromečio lapuose. Kietafazė fermentacija iš esmės mažino elago rūgšties kiekį tiek po 24 val., tiek po 48 val. fermentacijos (atitinkamai 27 % ir 57,6 %) (lentelė).

Elago rūgšties sumažėjimą galima paaiškinti tuo, kad fermentacijos metu suintensyvjus mikrobiniam metabolizmui bei fermentų veiklai dalis elago rūgšties suskaidoma iki galo rūgšties.

Benzoinė rūgštis $C_7H_6O_2$ natūraliai atsiranda daugelyje augalų ir yra tarpininkė kai kurių antrinių metabolitų biosintezėje. Kaip ir kiti nitrilai ir amidai, benzonitrilas ir benzamidas gali būti hidrolizuojami iki benzoinės rūgšties arba jos konjugotos bazės rūgštinėmis ar šarminėmis sąlygomis (Maki, Takeda, 2000).

Lentelė. Fenolinių rūgščių kiekiai sausojoje medžiagoje $mg\ 100\ g^{-1}$ gauromečio lapuose
Table. Amount of phenolic acids in dry matter ($mg\ 100\ g^{-1}$) in fireweed leaves

Biologiškai aktyvios medžiagos Biologically active compounds	Fermentacijos trukmė val. Fermentation duration, h		
	Kontrolė (nefermentuota) Control (nonfermented)	Kietafazė fermentacija 24 val. Solid-phase fermentation 24 h	Kietafazė fermentacija 48 val. Solid-phase fermentation 48 h
	Kiekis $mg\ 100\ g^{-1}$ Quantity, $mg\ 100\ g^{-1}$		
Bendras fenolinių rūgščių kiekis Amount of total phenolic acids	2495,72 ab*	1886,54 c	1082,75 d
Galo rūgštis Gallic acid	6,66 c	3,85 d	10,03 b
Chlorogeninė rūgštis Chlorogenic acid	9,36 b	4,59 d	7,59 c
<i>P</i> -kumaro rūgštis <i>P</i> -coumaric acid	82,03 d	112,60 b	56,02 e
Elago rūgštis Ellagic acid	2376,01 ab	1734,38 c	1006,25 d
Benzoinė rūgštis Benzoic acid	21,66 b	31,12 a	2,86 f

Pastaba: reikšmės su skirtingomis raidėmis skiriasi iš esmės ($P < 0,05$).

Note: Values with different letters differ significantly ($P < 0,05$).

Benzoinės rūgšties kiekį gauromečio lapuose iš esmės didino 24 val. kietafazė fermentacija (43,7 %), o 48 val. kietafazė fermentacija šios fenolinės rūgšties kiekį iš esmės sumažino (net 86,8 %) (lentelė).

Benzoinės rūgšties reikšmingus pokyčius galima būtų paaiškinti tuo, kad anaerobinėmis sąlygomis vykstantis bakterijų metabolizmas ir aktyvi fermentų veikla fermentacijos pradžioje (per pirmąsias 24 val.) paskatino benzoinės rūgšties susidarymą iš makromolekulinių junginių, tačiau vėliau, per kitas 24 val., benzoinė rūgštis įsijungė į kitus junginius (pvz., padaugėjo galo rūgšties (lentelė)).

Chlorogeninė rūgštis yra kofeino rūgšties ir chininės rūgšties esteris, veikiantis kaip tarpinis produktas lignino biosintezės metu. Terminas „chlorogeninės rūgštys“ reiškia giminingą polifenolių esterių šeimą, įskaitant hidroksicinaminių rūgščių (kofeino rūgštis, ferulinė rūgštis ir *p*-kumaro rūgštis) esterius su chinine rūgštimi (Clifford et al., 2003).

Biosintetinis chlorogeninės rūgšties pirmtakas yra 4-kumaroil-CoA, turintis vieną hidroksilo grupę ant arilo žiedo, kuris savo ruožtu yra gaminamas iš cinamono rūgšties.

Chlorogeninės rūgšties kiekis iš esmės sumažėjo tiek po 24 val., tiek po 48 val. kietafazės fermentacijos (atitinkamai 50,9 % ir 18,9 %), palyginti su kontrole (lentelė).

P-kumaro rūgštis yra hidroksicinaminė rūgštis (C₉H₈O₃). Tai organinis junginys, kuris yra cinamono rūgšties hidroksi darinys.

P-kumaro rūgšties po 24 val. kietafazės fermentacijos kiekis iš esmės padidėjo nuo 82 mg 100 g⁻¹ (kontrolė) iki 113 mg 100 g⁻¹, taigi padaugėjo 37,8 %. Tačiau fermentuojant toliau, t. y. po 48 val., *p*-kumaro rūgšties kiekis sumažėjo du kartus (lentelė).

Tarp chlorogeno ir *p*-kumaro rūgščių yra glaudus ryšys, nes abiejų metabolizme dalyvauja cinamono rūgštis. Vykstant fermentacijai anaerobinėmis sąlygomis chlorogeno rūgšties sumažėjo po 24 val. (5 pav.), o *p*-kumaro – padaugėjo (6 pav.). Toliau vykdant fermentaciją po 48 val. prasidėjo priešingas procesas: chlorogeno rūgšties padaugėjo, bet sumažėjo *p*-kumaro rūgšties.

S. R. Couto ir kt. (2006) teigė, kad kietafazės fermentacijos proceso galutinei tiriamos žalia-

vos kokybei įtakos gali turėti ne tik fermentacijos trukmė, bet ir kiti veiksniai, pavyzdžiui, tam tikri mikroorganizmai: bakterijos, grybai, mielės ir pan.

IŠVADOS

Kietafazė fermentacija gali būti naudojama siekiant gauti didesnius tam tikrų fenolinių rūgščių kiekius: po 24 val. trukmės kietafazės fermentacijos padaugėjo benzoinės ir *p*-kumaro rūgšties, o po 48 val. – galo rūgšties.

Tikslinga ir toliau tęsti tyrimus, kai modeliuojant įvairius kietafazės fermentacijos proceso parametrus būtų vertinami ir kiti gauromečio lapuose esantys biologiškai aktyvūs junginiai, pavyzdžiui, flavonoidai, taninai ir kiti.

Gauta 2019 10 11
Priimta 2019 11 29

LITERATŪRA

1. Clifford M. N., Johnston K. L., Knigh S., Kuhnert N. 2003. Hierarchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 51. No. 10. P. 2900–2911.
2. Couto S. R., Sanroman A. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry. A review. *Journal of Food Engineering*. Vol. 76. P. 291–302.
3. Farnworth E. R. 2008. The evidence to support health claims for probiotics. *The Journal of Nutrition*. Vol. 138. No. 6. P. 1250S–1254S.
4. Karakurt S., Semiz A., Celik G., Gencler-Ozkan A. M., Sen A., Adali O. 2016. Contribution of ellagic acid on the antioxidant potential of medicinal plant *Epilobium* sp. *Nutrition and Cancer*. Vol. 68. P. 173–183.
5. Kiss A. K., Bazylko A., Filipek A., Granica S., Jaszewska E., Kiarszys U., Kosmider A., Piwo-warski J. 2011. Oenothien B's contribution to the antiinflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp. *Phytomedicine*. Vol. 18. P. 557–560.
6. Lasinskas M., Jarienė E. 2018. Siauralapio gauromečio (*Chamerion angustifolium* L.) panaudojimo galimybės: tyrimų apžvalga. *Žemės ūkio mokslai*. T. 25. Nr. 3. P. 125–130.
7. Maki T., Takeda K. 2000. Benzoic acid and derivatives. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. P. 52.
8. Pandey A. 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. Vol. 27. No. 2. P. 109–117.
9. Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 13. P. 81–84.

10. Pandey A., Soccol C. R., Rodriguez-Leon J. A., Nigam P. 2001. *Solid-state Fermentation in Biotechnology – Fundamentals and Applications*. New Delhi: Asiatech Publishers Inc. 221 p.
11. Pandey A., Soccol C. R., Mitchell D. A. 2000. New developments in solid-state fermentation. I. Bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. Vol. 35. No. 10. P. 1153–1169.
12. Pandey A. 1994. Solid-state fermentation: an overview. In: *Solid State Fermentation* (ed. Pandey A.). New Delhi, India: Wiley. P. 3–10.
13. Pengelly A. 2004. An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. In: *The constituents of Medicinal Plants* (2nd ed.). Allen & Unwin. P. 29–30.
14. Ponder A., Hallmann E. 2019. Phenolics and carotenoid contents in the leaves of different organic and conventional raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars and their *in vitro* activity. *Antioxidants*. Vol. 8. No. 458. P. 1–12.
15. Prasad K., Manohar P., Kavita Y. 2018. A review on phytopharmacopial potential of *Epilobium angustifolium*. *Pharmacognosy Journal*. Vol. 10. No. 6. P. 1076–1078.
16. Seigler D. S. 1998. *Plant Secondary Metabolism*. New York: Springer Science & Business Media. 208 p.
17. Stolarczyk M., Piwowarski J. P., Granica S., Stefańska J., Naruszewicz M., Kiss A. K. 2013. Extracts from *Epilobium* sp. herbs, their components and gut microbiota metabolites of *Epilobium* ellagitannins, urolithins, inhibit hormone-dependent prostate cancer cells-(LNCaP) proliferation and PSA secretion. *Phytotherapy Research*. Vol. 27. P. 1842–1848.
18. Vitalone A., Bordi F., Baldazzi C., Mazzanti G., Saso L., Tita B. 2001. Anti-proliferative effect on a prostatic epithelial cell line (PZ-HPV-7) by *Epilobium angustifolium* L. *IL Farmaco*. Vol. 56. P. 483–489.
19. Vitalone A., Guizzetti M., Costa L. G., Tita B. 2003a. Extracts of various species of *Epilobium* inhibit proliferation of human prostate cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Vol. 55. P. 683–690.
20. Vitalone A., McColl J., Thome D., Costa L. G., Tita B. 2003b. Characterization of the effect of *Epilobium* extracts on human cell proliferation. *Pharmacology*. Vol. 69. P. 79–87.

Marius Lasinskas, Elvyra Jarienė

THE CONTENT OF PHENOLIC ACIDS IN THE DIFFERENT DURATION FERMENTED LEAVES OF FIREWEED (*CHAMERION ANGUSTIFOLIUM* (L.) HOLUB)

Summary

The purpose of this study was to investigate and determine the effect of different duration of solid-phase fermentation on the change of phenolic acids in fireweed leaves. The leaves of fireweed (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub), naturally growing in a biodynamic farm, were studied in 2017. The raw material was randomly collected from different places of the site in July, at the beginning of mass flowering. In the laboratory of the Institute of Agriculture and Food Sciences Agriculture Academy of Vytautas Magnus University crushed fireweed leaves were fermented under anaerobic conditions at 3°C in a closed dark room for 24 h or 48 h. The experiment was done in three replications. After the fermentation, the raw material was dried at 40°C. The amounts of phenolic acids were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). The study data were statistically processed using the analysis of variance (ANOVA). The statistical significance of differences between the means was assessed by Fishers LSD test ($p < 0.05$). The results of the study indicate that after 24 h duration of solid-phase fermentations the amounts of benzoic and *p*-coumaric acids increased, but the quantities of gallic, chlorogenic and ellagic acids decreased. After 48 h the opposite results of solid-phase fermentation were observed, that is, the amount of gallic acid increased, while the quantities of chlorogenic, *p*-coumaric, ellagic and benzoic acids decreased.

Keywords: fireweed, phenolic acids, solid-phase fermentation