

ANNA CHLEBOWSKA-ŚMIGIEL, MAŁGORZATA GNIEWOSZ,
JACEK WILCZAK, DARIUSZ KAMOLA

WPLYW DODATKU PULLULANU NA WZROST I ZDOLNOŚCI FERMENTACYJNE WYBRANYCH BAKTERII Z RODZAJU *LACTOBACILLUS*

Streszczenie

Badano wpływ dodatku pullulanu na wzrost i zdolności fermentacyjne dziewięciu szczepów bakterii kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*. Hodowle wgłębne prowadzono przez 24 h, w podłożu kontrolnym MRS oraz doświadczalnym MRS z dodatkiem 2 % pullulanu. W ciągu 24 h obserwowano wzrost bakterii, z początkowej liczby 10^4 jtk/cm³ do $10^7 \div 10^9$ jtk/cm³, w zależności od badanego szczepu. Nie stwierdzono istotnych różnic między liczbami bakterii hodowanych w podłożu kontrolnym a doświadczalnym z pullulanem. W celu porównania zdolności fermentacyjnych szczepów w czasie „0” i po zakończeniu ich hodowli w podłożach oznaczono zawartości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) metodą HPLC. Stwierdzono obecność kwasu mrówkowego, mlekowego, octowego, hydroksymaślowego i propionowego. W podłożu kontrolnym MRS uzyskano większą zawartość SCFA ogółem niż w podłożu doświadczalnym MRS. Dodatek pullulanu do podłoża MRS przyczynił się do większego wytworzenia kwasu mlekowego przez 2 szczepy LAB oraz kwasu octowego przez 5 z 9 badanych szczepów.

Słowa kluczowe: LAB, pullulan, SCFA, fermentacja mlekowa, liczba bakterii

Wprowadzenie

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) mają szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach przemysłu spożywczego i są od lat wykorzystywane przez ludzi do produkcji żywności. Powszechnie stosowane są w przemyśle mleczarskim. Dzięki ich właściwościom fermentacyjnym wytwarzane są jogurty, kefir, sery czy masło. LAB odgrywają także znaczącą rolę w produkcji fermentowanych przetworów mięsnych, sojowych,

Dr inż. A. Chlebowska-Śmigiel, prof. dr hab. M. Gniewosz, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, dr J. Wilczak, mgr inż. D. Kamola, Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydz. Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa. Kontakt: anna_chlebowska_smigiel@sggw.pl

ryb, zbóż, żywności orientalnej oraz w produkcji pieczywa żytniego. Ważną rolę organizmy te odgrywają również w przetwórstwie warzyw, szczególnie w produkcji kiszonych ogórków czy kapusty [17]. Jednocześnie stanowią one naturalną mikroflorę układu pokarmowego ludzi. Mają zdolność do tworzenia witamin z grupy B, które odgrywają istotną rolę w procesach metabolicznych organizmu [1]. LAB przeprowadzają fermentację sacharydów, w wyniku której powstaje głównie kwas mlekowy, ale także kwas octowy, aldehyd octowy, ditlenek węgla, diacetyl, acetoina czy butanodiol [11]. Powstające podczas fermentacji produkty przemiany materii, szczególnie kwasy organiczne oraz niskocząsteczkowe kwasy tłuszczowe, pełnią rolę konserwującą i zapobiegają wielu chorobom [10]. Ich korzystny wpływ na zdrowie człowieka powoduje, że zarówno bakterie kwasu mlekowego, jak też produkty powstałe z ich udziałem są chętnie spożywane przez konsumentów.

Wzrost popytu na żywność prozdrowotną jest przyczyną pojawiania się na rynku nowych produktów spożywczych o takich właściwościach [12]. Zastosowanie probiotyków nie jest nową koncepcją. Zostały one odkryte i po raz pierwszy zastosowane przez Miecznikowa [7]. Żywność fermentowana, zarówno pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego, zawierająca bakterie probiotyczne określana jest mianem żywności funkcjonalnej [17]. Mikroorganizmy wykorzystywane jako probiotyki muszą spełniać wiele kryteriów, ale przede wszystkim muszą być bezpieczne dla zdrowia konsumenta oraz występować w odpowiednio dużej liczbie. Według Międzynarodowej Federacji Mleczarskiej liczba bakterii probiotycznych w produkcie powinna wynosić min. 10^7 jtk/cm³ [20]. Inni autorzy podają, że korzystny wpływ na organizm człowieka wywierają bakterie obecne w liczbie od 10^8 do 10^{10} komórek/g produktu, którego codzienne spożycie to min. 100 g lub 100 cm³ [5].

Odpowiednio zbilansowana dieta jest głównym czynnikiem zapobiegającym wielu chorobom przewlekłym, np. osteoporozie czy chorobom układu krążenia, a dobrze poznany związek między składnikami diety a ogólnym stanem zdrowia człowieka pozwala wykorzystywać w sposób racjonalny składniki żywności [4]. Dodawane do wyrobów składniki bioaktywne, m.in. błonnik, laktuloza, inulina czy fruktooligosacharydy, prowadzą do zmian zarówno w składzie, jak i aktywności mikroflory przewodu pokarmowego, co przynosi korzyści dla zdrowia i samopoczucia konsumenta [2]. Obok znanych i stosowanych już związków o udokumentowanych właściwościach prebiotycznych wciąż poszukuje się nowych substancji, które mogą odpowiadać kryteriom stawianym prebiotykom. Jednym z nich jest pullulan [19].

Pullulan jest zewnątrzkomórkowym polisacharydem wytwarzanym wyłącznie na drodze mikrobiologicznej w hodowli wglębnej grzyba *Aureobasidium pullulans* [3]. Podstawową jednostkę struktury pullulanu stanowią trzy cząsteczki glukozy połączone wiązaniem α -1,4-glikozydowym w maltotriozy, które z kolei połączone są między sobą

wiązaniami α -1,6-glikozydowymi [9, 13]. Przeprowadzone dotychczas badania wykazały, że pullulan m.in. stymuluje wzrost szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* [19, 21].

Celem pracy było określenie wpływu dodatku pullulanu do podłoża na wzrost i aktywność fermentacyjną bakterii z rodzaju *Lactobacillus*.

Material i metody badań

Material do badań stanowiło 9 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*: *Lactobacillus brevis* ZBM 11, *Lactobacillus plantarum* 44, *Lactobacillus plantarum* NCAIM B. 01149, *Lactobacillus plantarum* NCAIM B.01834, *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080, *Lactobacillus acidophilus* CH- 2, *Lactobacillus acidophilus* CH-5, *Lactobacillus casei* ATCC 393 i *Lactobacillus arabinosus* ATCC 8014. Szczepy pochodziły z kolekcji Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej, kolekcji Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii oraz Zakładu Biotechnologii Mleka SGGW w Warszawie. Szczepy przechowywano w 25-procentowym glicerolu w temp. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. W badaniach użyto także pullulanu firmy Focubase (Chiny).

Inokulum do badań przygotowywano przenosząc jałowo zamrożone kultury do płynnego podłoża MRS (Biolacta, Polska). Inkubację prowadzono w zależności od preferencji temperaturowych szczepu: w temp. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (wszystkie szczepy z gatunku *L. plantarum* i szczep *L. arabinosus*) lub w temp. $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (szczepy z gatunku *L. acidophilus* i *L. casei*) przez 24 h. Po tym czasie komórki odwirowywano w wirówce laboratoryjnej (Eppendorf, Francja) przy $11\ 000 \times g$ przez 1 min. Po zlanii supernatantu biomasę komórkową przemywano jałowym roztworem soli fizjologicznej i powtórnie odwirowywano. Biomasę komórkową zawieszano w roztworze soli fizjologicznej, aby uzyskać zawiesinę o gęstości optycznej $0,5\text{ }^{\circ}\text{McF}$ (Densimat firmy bioMérieux, Włochy), co odpowiada liczbie komórek 10^8 jtk/cm^3 . Następnie wykonywano rozcieńczenia dziesiętne tak, aby liczba komórek bakterii wynosiła 10^5 jtk/cm^3 . Uzyskane zawiesiny szczepów przenoszono w objętości 5 cm^3 do uprzednio przygotowanych podłoży kontrolnych i doświadczalnych.

Podłożem kontrolnym było płynne podłoże MRS [$\text{g}/100\text{ cm}^3$]: glukoza 2,0; ekstrakt drożdżowy 0,5; ekstrakt mięsny 1,0; pepton 1,0; fosforan potasu 0,2; cytrynian amonu 0,2; Tween 80 0,11; fosforan potasu 0,2; octan sodowy 0,50; siarczan magnezu 0,02; siarczan manganu 0,005 [18]. Podłożem doświadczalnym było płynne podłoże MRS, do którego dodano 2,0 % pullulanu.

Podłoża kontrolne oraz doświadczalne (bez dodatku pullulanu) poddawano sterylizacji w autoklawie w temp. $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 20 min. Wodny roztwór pullulanu wyjąłwano metodą filtracji przy użyciu jałowych krążków bibuły filtracyjnej o średnicy porów $0,47\text{ }\mu\text{m}$ (Whatman, Niemcy) i dodawano do podłoży ostudzonych po sterylizacji. Hodowle badanych bakterii w podłożach kontrolnych i doświadczalnych prowa-

dzono w kolbach o pojemności 150 cm³ wypełnionych 50 cm³ podłoża, z zachowaniem takich samych warunków temperatury, jak przy przygotowaniu inokulum.

Liczbę komórek bakterii w czasie „0” i po 24 h hodowli sprawdzano metodą płytkową. W tym celu pobierano 1 cm³ hodowli, wykonywano dziesięciokrotne rozcieńczenia używając jałowej soli fizjologicznej i wykonywano posiew wgłębnny, zalewając materiał biologiczny odpowiednio stałym podłożem MRS lub MRS z dodatkiem 2 % pullulanu. Badania przeprowadzano w dwóch seriach. Po okresie inkubacji liczono wyrosłe kolonie, zgodnie z PN-ISO 4833-1998 [15]. Liczbę bakterii wyrażano w postaci jednostek tworzących kolonie w 1 cm³ podłoża [jtk/cm³].

W celu przygotowania materiału do oznaczenia ilościowego i jakościowego krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) komórki bakterii odwirowywano w wirówce laboratoryjnej (Eppendorf, Francja) przy 11 000 × g przez 1 min. Oznaczenie SCFA wykonywano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzęgniętej z detektorem UV (HPLC-UV). Stosowano chromatograf cieczowy firmy Dionex (USA) sprzęgnięty z detektorem UV (Beckman Coulter, USA). Próbkę przygotowywano poprzez filtrację badanego medium przez filtr strzykawkowy. Rozdział związków prowadzono w kolumnie Hypersil BDS 150 × 4,6 mm, 5 μm (Sigma-Aldrich), w warunkach izokratycznych przy użyciu fazy woda : metanol (v/v 98 : 2) przy długości fali 254 nm. Chromatogramy opracowywano identyfikując badane związki na podstawie posiadanych wzorców i powierzchni pików chromatograficznych na podstawie czasu retencji.

Z uzyskanych wyników obliczono wartości średnie i odchylenia standardowe. Wyniki opracowano statystycznie w programie Statgraphics 4.1 plus. Zastosowano test t-Studenta i jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem Tukeya, na poziomie istotności p = 0,05.

Wyniki i dyskusja

Po 24 h hodowli w podłożu doświadczalnym z dodatkiem pullulanu oraz w podłożu kontrolnym MRS (tab. 1) zaobserwowano wzrost badanych szczepów LAB. Liczba bakterii wzrosła z 10⁴ jtk/cm³ do 10⁷ ÷ 10⁹ jtk/cm³, w zależności od szczepu bakterii.

Nie zaobserwowano istotnych (p = 0,05) różnic między liczbami większości bakterii hodowanych w podłożu kontrolnym i doświadczalnym z pullulanem. Nieznacznie wyższą liczbę bakterii w podłożu doświadczalnym stwierdzono w przypadku dwóch szczepów: *L. acidophilus* (CH-5 i CH-2) oraz *L. plantarum* NCAIM B. 01149. Różnice wynosiły odpowiednio 0,11, 0,09 i 0,08 jednostki logarytmicznej. Ramnani i wsp. [16] uważają, że w obecności prebiotyku liczba bakterii zwiększa się o około 1 cykl logarytmiczny w porównaniu z warunkami hodowli bez prebiotyku. Wyniki własne wskazują, że pullulan nie wpłynął stymulująco na wzrost populacji badanych szczepów

Lactobacillus. Do podobnych wniosków doszły Szydłowska i Kołożyn-Krajewska [22], które do fermentacji przecieru z dyni z dodatkiem 1,5, 3 i 4,5 % inuliny stosowały szczep *L. casei* KN 291. Liczba komórek w inokulum wynosiła 7,93 log jtk/g, a po 26 h hodowli autorki wykazały wzrost liczby bakterii do 9,55 ÷ 9,90 log jtk/g. Dodatek inuliny do przecieru przyczynił się, zdaniem autorek, do zwiększenia liczby bakterii w fermentowanych przecierach. Gustaw i wsp. [8] do fermentacji jogurtu z 1-, 2- i 3-procentowym dodatkiem fruktooligosacharydów (FOS) oraz inuliny użyli szczepów *Str. thermophilus*, *Lb. acidophilus* i *Bifidobacterium sp.* Przy 1-procentowym dodatku FOS liczba badanych bakterii wzrosła odpowiednio do 9,0 log jtk/g, 7,8 log jtk/g i 7,7 log jtk/g. Dodatek 1 % inuliny spowodował wzrost tylko paciorkowców i bifidobakterii, odpowiednio do poziomu: 8,8 log jtk/g i 7,5 log jtk/g, ale nie przyczynił się do

Tabela 1. Zmiany liczby komórek bakterii kwasu mlekowego podczas hodowli w podłożu kontrolnym MRS i MRS z dodatkiem pullulanu [log jtk/cm³].

Table 1. Changes in the number of LAB cells grown in the MRS control medium and MRS medium with pullulan additive [log CFU/ cm³].

Szczep bakterii LAB strain	MRS MRS medium ($\bar{x} \pm s / SD$)		MRS + 2 % pullulanu MRS medium + 2 % of pullulan added ($\bar{x} \pm s / SD$)	
	Czas [h] / Time [h]			
	0	24	0	24
<i>L. acidophilus</i> CH-2	4,04 ^a ± 0,1	9,08 ^b ± 0,1	4,04 ^a ± 0,1	9,17 ^c ± 0,1
<i>L. acidophilus</i> CH-5	4,12 ^a ± 0,3	9,29 ^b ± 0,8	4,09 ^a ± 0,3	9,40 ^b ± 0,6
<i>L. brevis</i> ZBM 11	4,08 ^a ± 0,2	9,11 ^b ± 0,5	4,06 ^a ± 0,2	9,10 ^b ± 0,4
<i>L. casei</i> ATCC 393	4,14 ^a ± 0,6	7,74 ^b ± 0,4	4,11 ^a ± 0,5	7,79 ^b ± 0,4
<i>L. plantarum</i> NCAIM B. 01149	4,02 ^a ± 0,3	9,51 ^b ± 0,1	4,09 ^a ± 0,6	9,59 ^c ± 0,2
<i>L. plantarum</i> NCAIM B. 01834	4,16 ^a ± 0,4	8,66 ^b ± 0,9	4,05 ^a ± 0,8	8,65 ^b ± 0,7
<i>L. plantarum</i> ATCC 4080	4,28 ^a ± 0,4	9,21 ^c ± 0,6	4,21 ^a ± 0,3	8,41 ^b ± 0,5
<i>L. plantarum</i> 44	4,31 ^a ± 0,3	9,53 ^c ± 0,4	4,25 ^a ± 0,2	8,46 ^b ± 0,7
<i>L. arabinosus</i> ATCC 8014	4,15 ^a ± 0,6	9,42 ^b ± 0,4	4,07 ^a ± 0,3	9,49 ^b ± 0,5

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\bar{x} – wartość średnia / mean value; s – odchylenie standardowe / SD – standard deviation; n = 6;
a, b – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w wierszach nie różnią się statystycznie istotnie (p = 0,05) / mean values denoted by the same letters in the rows do not differ statistically significantly (p = 0.05).

zwiększenia liczby komórek szczepu *L. acidophilus*. Na podstawie wyników cytowanych autorów można wnioskować, że poszczególne prebiotyki mają bardzo zróżnicowany wpływ na szczepy LAB i stymulują wzrost tylko wybranych. Do podobnych wniosków doszli Pan i wsp. [14], którzy badali wpływ fruktooligosacharydów (FOS), chitooligosacharydów (COS), mannanoligosacharydów (MOS) i galaktooligosacharydów (GOS) na zmiany mikroflory jelita ślepego myszy. Po 14 dniach stosowania diety autorzy stwierdzili, że badane oligosacharydy mają różny wpływ na skład mikroflory jelitowej. Spośród nich tylko FOS przyczynił się do zwiększenia liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, która wynosiła $9,3 \pm 0,21 \log \text{ jtk/g}$.

Do jeszcze innych konkluzji doszli Ramnani i wsp. [16], którzy badali wpływ zdegradowanych polisacharydów o niskiej masie molekularnej, uzyskanych z wodorostów, na liczbę pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* sp. wśród mikroflory kałowej ludzi. Zdaniem autorów, związki o małych masach cząsteczkowych mają większą zdolność modulującą liczbę bakterii jelitowych. Na tej podstawie można przypuszczać, że na poprawę stymulacji wzrostu badanych bakterii w niniejszej pracy mógłby lepiej wpłynąć pullulan zhydrolizowany do mniejszych molekuł. Badania na temat możliwości hydrolizy cząsteczek pullulanu przez LAB są nieliczne. Zidentyfikowano pięć typów enzymów z grupy pullulanaz, pochodzących z różnych drobnoustrojów, które są w stanie rozłożyć cząsteczkę pullulanu [6]. Ryan i wsp. [19] scharakteryzowali zaledwie kilka szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* wytwarzających pullulanazy rozkładające ten polisacharyd do mniejszych fragmentów, które mogą być metabolizowane przez komórki.

W tab. 2. przedstawiono zmiany zawartości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) podczas hodowli w podłożu MRS i MRS wzbogaconym pullulanem. Całkowita suma SCFA wytworzonych podczas hodowli przez badane szczepy LAB w podłożu MRS była statystycznie istotnie większa ($p \leq 0,05$) niż uzyskana w podłożu z dodatkiem pullulanu (tab. 2). Jedynie *L. casei* ATCC 393 wytworzył istotnie więcej SCFA w hodowli w podłożu z pullulanem. W badanych hodowlach stwierdzono obecność kwasu mrówkowego, mlekowego, octowego, hydroksymasłowego i propionowego. Otrzymane wyniki wskazują, że wszystkie badane szczepy LAB w większych ilościach wytworzyły kwas mlekowy i octowy, a w mniejszych – kwas mrówkowy, propionowy i hydroksymasłowy (tab. 2). W podłożu MRS stwierdzono zawartość kwasu mlekowego w zakresie od $32,30 \pm 0,43$ do $53,08 \pm 0,61 \text{ mM}$, a kwasu octowego w zakresie od $8,78 \pm 0,49$ do $90,55 \pm 3,46 \text{ mM}$. Na podłożu z dodatkiem pullulanu większość badanych szczepów wytworzyła statystycznie istotnie mniejszą ($p \leq 0,05$) zawartość kwasu mlekowego. Otrzymane wartości mieściły się w granicach od $33,28 \pm 0,39$ do $52,56 \pm 1,35 \text{ mM}$. Tylko dwa szczepy, tj. *L. casei* ATCC 393 i *L. acidophilus* CH-5 w badanym podłożu zsyntetyzowały statystycznie istotnie większe ($p \leq 0,05$) zawartości kwasu mlekowego niż w podłożu MRS.

Najbardziej korzystny efekt wzbogacenia podłoża MRS pullulanem był widoczny w przypadku kwasu octowego. W podłożu tym aż 5 spośród badanych szczepów: *L. brevis* ZBM 11 i *L. arabinosus* ATCC 8014 oraz trzy szczepy *L. plantarum* (NCAIM B. 01834, ATCC 4080 i 44) wytworzyło statystycznie istotnie więcej ($p \leq 0,05$) tego kwasu. Zawartość kwasu octowego w hodowli *L. plantarum* 44 i *L. arabinosus* ATCC 8014 była dwukrotnie większa niż w hodowli kontrolnej. Z kolei różnice pod względem zawartości tego kwasu w hodowlach szczepów *L. plantarum* NCAIM B.01149 i *L. plantarum* ATCC 4080 wynosiły ok. 10 mM, a *L. brevis* – ok. 5mM.

Wzbogacenie podłoża pullulanem nie wpłynęło na statystycznie istotne zwiększenie ($p \leq 0,05$) zawartości kwasu mrówkowego. Najmniej tego kwasu w podłożu MRS wytworzył *L. acidophilus* CH-2 ($9,68 \pm 1,45$ mM), a najwięcej – *L. plantarum* ATCC 4080 ($21,38 \pm 0,54$ mM). W podłożu z dodatkiem pullulanu wartości te były istotnie niższe i mieściły się w granicach od $0,75 \pm 0,14$ do $9,83 \pm 0,09$ mM. Kwas propionowy był obecny w hodowlach szczepów LAB w jeszcze mniejszych ilościach. W podłożu MRS jego zawartość wynosiła od $3,24 \pm 0,02$ do $8,84 \pm 0,09$ mM. W podłożu wzbogaconym pullulanem dwa szczepy: *L. acidophilus* CH-2 i *L. arabinosus* ATCC 8014 wytworzyły istotnie więcej ($p = 0,05$) kwasu propionowego niż w podłożu MRS i było to odpowiednio: $11,40 \pm 0,03$ i $5,48 \pm 0,21$ mM. Z kolei *L. brevis* ZBM 11 w podłożu z dodatkiem pullulanu w ogóle nie wytworzył kwasu propionowego. Po 24 h hodowli LAB, zarówno w podłożu MRS, jak też MRS wzbogaconym pullulanem najmniej było kwasu hydroksymasłowego, odpowiednio od $2,53 \pm 0,07$ do $6,09 \pm 0,08$ mM i od $1,17 \pm 0,14$ do $5,38 \pm 0,15$ mM (tab. 2).

Analizując otrzymane wyniki zawartości SCFA wytworzonych w podłożu MRS z dodatkiem pullulanu można zauważyć, że jego dodatek miał korzystny wpływ na 8 z 9 badanych szczepów bakterii. *L. acidophilus* CH-5 i *L. casei* ATCC 393 charakteryzowały się zwiększonym wytwarzaniem kwasu mlekowego, a *L. brevis* ZBM 11, *L. arabinosus* ATCC 8014 oraz trzy szczepy *L. plantarum* (NCAIM B. 01834, ATCC 4080, 44) wytworzyły więcej kwasu octowego niż w podłożu MRS. Z kolei w hodowli *L. acidophilus* CH-2 otrzymano najwięcej kwasu propionowego. Podobnie, więcej kwasu propionowego wytworzył szczep *L. arabinosus* ATCC 8014. Jedynie szczep *L. plantarum* NCAIM B. 01149 wykazywał zdecydowanie słabsze właściwości fermentacyjne w hodowli z dodatkiem pullulanu niż w podłożu kontrolnym MRS.

Otrzymane różnice zawartości wytworzonych kwasów w dwóch badanych podłożach mogą być wynikiem odmiennego metabolizmu fermentacyjnego badanych szczepów LAB [11], choć można zauważyć pewne tendencje. Wśród testowych szczepów były zarówno bakterie homo- jak i heterofermentatywne. Bakterie, takie jak *L. acidophilus* i *L. casei*, prowadzące proces homofermentacji glukozy, której produktem jest przede wszystkim kwas mlekowy [11], w podłożu z dodatkiem pullulanu

Tabela 2. Zmiany zawartości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) podczas hodowli w podłożu kontrolnym MRS i w podłożu MRS z dodatkiem pullulanu [mM].

Table 2. Changes in the content of SCFA during batch culture in MRS control medium and in MRS medium with pullulan added [mM].

Szczepy / Strains	Suma SCFA Total of SCFA ($\bar{x} \pm s / SD$)		Kwas mrówkowy Formic acid ($\bar{x} \pm s / SD$)		Kwas mlekowy Lactic acid ($\bar{x} \pm s / SD$)		Kwas octowy Acetic acid ($\bar{x} \pm s / SD$)		Kwas hydroksymasłowy Hydroxybutyric acid ($\bar{x} \pm s / SD$)		Kwas propionowy Propionic acid ($\bar{x} \pm s / SD$)	
	MRS	MRS+P	MRS	MRS+P	MRS	MRS+P	MRS	MRS+P	MRS	MRS+P	MRS	MRS+P
	[0 h]											
	27,57 ^a ± 1,09	27,51 ^a ± 1,09	0,79 ^A ± 0,17	0,73 ^A ± 0,05	1,32 ^x ± 0,09	1,66 ^x ± 0,31	23,94 ^x ± 1,03	23,67 ^x ± 0,42	1,52 ^z ± 0,32	1,45 ^z ± 0,31	0 ^v	0 ^v
[24 h]												
<i>L. acidophilus</i> CH-2	85,78 ^b ± 0,24	82,26 ^a ± 0,57	9,68 ^B ± 1,45	5,63 ^A ± 0,02	53,08 ^x ± 0,61	52,56 ^x ± 1,35	11,12 ^y ±0,01	8,89 ^x ± 0,17	4,42 ^z ± 0,09	3,78 ^v ± 0,01	6,23 ^v ± 0,12	11,40 ^z ± 0,03
<i>L. acidophilus</i> CH-5	78,65 ^b ±0,91	71,79 ^a ± 2,16	10,67 ^B ± 0,26	4,90 ^A ± 0,15	42,00 ^x ± 0,43	43,81 ^y ± 1,37	13,25 ^y ± 0,62	9,80 ^x ± 0,01	6,09 ^z ± 0,08	5,38 ^v ± 0,15	6,65 ^v ± 0,05	6,30 ^v ± 0,73
<i>L. brevis</i> ZBM 11	163,12 ^b ± 1,47	149,34 ^a ± 1,75	13,46 ^B ± 0,59	4,90 ^A ± 0,15	46,78 ^y ± 0,71	43,98 ^x ± 0,56	90,31 ^x ± 0,18	95,83 ^y ± 1,97	4,04 ^z ± 0,01	3,08 ^v ± 0,18	8,53 ^z ± 0,03	0 ^v
<i>L. casei</i> ATCC 393	63,27 ^a ± 0,21	67,13 ^b ± 1,53	9,80 ^B ± 0,37	0,75 ^A ± 0,14	32,30 ^y ± 0,43	51,62 ^x ± 1,22	13,08 ^x ± 0,11	12,39 ^x ± 0,76	2,99 ^z ± 0,05	1,17 ^v ± 0,14	5,1 ^z ± 0,09	1,26 ^v ± 0,18
<i>L. plantarum</i> NCAIM B. 01149	162,11 ^b ± 3,51	143,43 ^a ± 3,39	17,28 ^B ± 0,55	8,83 ^A ± 0,35	42,92 ^x ± 0,93	42,54 ^x ± 1,77	90,55 ^x ± 3,46	86,92 ^x ± 1,53	2,57 ^z ± 0,02	1,86 ^v ± 0,02	8,79 ^z ± 0,35	3,29 ^v ± 0,24
<i>L. plantarum</i> NCAIM B. 01834	136,93 ^a ± 0,81	134,25 ^a ± 1,81	17,29 ^B ± 0,39	8,14 ^A ± 1,04	42,94 ^y ± 1,21	41,44 ^x ± 0,13	65,48 ^x ± 1,48	80,67 ^y ± 0,95	2,53 ^z ± 0,07	1,85 ^v ± 0,15	8,68 ^z ± 0,08	2,15 ^v ± 0,11

<i>L. plantarum</i> ATCC 4080	162,33 ^b ± 0,05	146,92 ^a ± 1,21	21,38 ^B ± 0,54	9,83 ^A ± 0,09	43,48 ^y ± 0,28	38,37 ^x ± 0,13	83,40 ^x ± 1,04	93,25 ^Y ± 0,72	5,24 ^z ± 0,26	1,92 ^v ± 0,05	8,84 ^Z ± 0,09	3,55 ^V ± 0,49
<i>L. plantarum</i> 44	86,11 ^b ± 0,27	65,05 ^a ± 0,18	14,43 ^B ± 1,02	8,00 ^A ± 0,23	50,47 ^y ± 0,83	33,28 ^x ± 0,39	8,78 ^x ± 0,49	17,42 ^Y ± 0,02	3,69 ^z ± 0,01	1,69 ^v ± 0,06	8,74 ^Z ± 0,56	4,67 ^V ± 0,02
<i>L. arabinosus</i> ATCC 8014	76,29 ^b ± 1,84	66,23 ^a ± 0,4	17,12 ^B ± 1,43	5,04 ^A ± 0,46	41,67 ^y ± 0,01	34,65 ^x ± 0,25	9,70 ^x ± 0,01	18,71 ^Y ± 0,20	4,56 ^z ± 0,40	1,99 ^v ± 0,18	3,24 ^V ± 0,02	5,48 ^Z ± 0,21

Objaśnienia: / Explanatory notes:

MRS / MRS medium; (MRS+P): MRS + 2 % pullulanu / MRS medium + 2 % of pullulan added;

\bar{x} – wartość średnia / mean value; s – odchylenie standardowe / SD – standard deviation ; n = 6; a, b, A, B, x, y, X, Y, v, z, V, Z – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w wierszach nie różnią się statystycznie istotnie (p = 0,05) / mean values denoted by the same letters in the rows do not differ statistically significantly (p = 0.05).

zwiększyły wytwarzanie tego kwasu. Z kolei bakterie bezwzględnie heterofermentatywne, jak *L. brevis* czy względnie heterofermentatywne, jak *L. plantarum*, fermentujące glukozę do kwasu mlekowego i octowego, zwiększyły syntezę obu tych rodzajów kwasów.

Analizując sumę SCFA można zauważyć dużą rozpiętość wyników, w zależności od użytego szczepu oraz podłoża (tab. 2). W podłożu MRS najniższą wartość sumy SCFA po 24-godzinnej hodowli uzyskano w przypadku szczepu *L. casei* ATCC 393, która wynosiła tylko 63,08 mM, a najwyższą – szczepu *L. brevis* ZBM 11, tj. 163,95 mM. Równie dużo SCFA wytworzyły szczepy *L. plantarum* ATCC 4080 (162,33 mM) i *L. plantarum* NCAIM B. 01149 (162,11 mM). Sumy SCFA w podłożu z dodatkiem pullulanu otrzymane po 24-godzinnej hodowli poszczególnych szczepów były mniejsze i wynosiły od 65,05 mM – *L. plantarum* 44 do 149,34 mM w przypadku *L. brevis* ZBM 11. Większą niż w podłożu MRS wartość sumy SCFA uzyskano tylko w przypadku szczepu *L. casei* ATCC 393 (67,47 mM).

Pan i wsp. [14] sprawdzili poziom SCFA wytworzony przez myszy karmione przez 2 tygodnie paszą zawierającą frukto-, chito-, mannano- i galaktooligosacharydy. Suma wytworzonych SCFA zawierała się w granicach od $49,59 \pm 3,67$ do $63,58 \pm 4,70$ mM. Najkorzystniejszy wynik uzyskano przy zastosowaniu frukto- i galaktoligosacharydów, odpowiednio: $63,58 \pm 4,70$ i $61,54 \pm 3,82$. Z kolei Ramnani i wsp. [16] badali wytwarzanie SCFA przez mikroflorę kałową osób dorosłych, stosując jako potencjalne prebiotyki zdegradowane polisacharydy o niskiej masie molekularnej, otrzymane z wodorostów. Uzyskane w badaniach tych autorów sumy SCFA po 24-godzinnej hodowli mikroflory kałowej były bardzo zróżnicowane i wynosiły od $2,0 \pm 0,06$ mM do $73,46 \pm 6,44$ mM. Autorzy stwierdzili, że tylko w obecności zdegradowanych polisacharydów pozyskanych z *Gelidium sesquipedale* istotnie wzrosło wytwarzanie SCFA, a w szczególności kwasu octowego i propionowego.

Reasumując, można stwierdzić, że w wyniku zastosowania dodatku pullulanu jako substancji potencjalnie prebiotycznej uzyskano zadowalający efekt tylko w przypadku zwiększenia zawartości poszczególnych SCFA, wytwarzanych przez badane szczepy *Lactobacillus*.

Wnioski

1. Wszystkie badane szczepy LAB po 24-godzinnej hodowli wykazywały wzrost i zdolności fermentacyjne na podłożu wzbogaconym pullulanem.
2. Dodatek pullulanu w ilości 2 % do podłoża MRS nie wpłynął stymulująco na zwiększenie liczby komórek badanych szczepów bakterii *Lactobacillus*, natomiast wpłynął na zwiększenie zawartości niektórych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

3. Kwas octowy został wytworzony w większych ilościach w podłożu MRS z dodatkiem pullulanu niż w podłożu MRS przez 5 z 9 badanych szczepów: *L. brevis* ZBM 11, *L. plantarum* NCAIM B. 01834, *L. plantarum* ATCC 4080, *L. plantarum* 44 i *L. arabinosus* ATCC 8014.
4. Zwiększoną wydajnością wytwarzania kwasu mlekowego charakteryzowały się, *L. acidophilus* CH-5 i *L. casei* ATCC 393, a w hodowli *L. acidophilus* CH-2 i *L. arabinosus* ATCC 8014 otrzymano więcej kwasu propionowego.

Literatura

- [1] Arnoldi A.: Functional Foods. Cardiovascular Disease and Diabetes. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, 2004, pp. 450-451.
- [2] Charalampopoulos D., Rastall R.A.: Prebiotics in foods. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2012, **23**, 187-191.
- [3] Cheng K-Ch., Demirci A., Catchmark J.M.: Pullulan: biosynthesis, production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **92**, 29-44.
- [4] Cieślak E., Gębusia A.: Żywność funkcjonalna z dodatkiem fruktanów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **2 (75)**, 27-37.
- [5] Dolatowski Z.J., Kołożyn-Krajewska D.: Bakterie probiotyczne w produktach mięsnych. *Przem Spoż.*, 2010, **64**, 21-24.
- [6] Doman-Pytka M., Bardowski J.: Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2004, **30**, 107-121.
- [7] Fric P.: Probiotics and prebiotics – renaissance of a therapeutic principle. *Cent. Eur. J. Med.*, 2007, **2 (3)**, 237-270.
- [8] Gustaw W., Kordowska-Wiater M., Kozioł J.: The influence of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria for bio-yogurt production. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2011, **10 (4)**, 455-466.
- [9] Karim M.R., Lee H.W., Hyun M.J., Park J.H., Yeum J.H.: Electrospinning preparation and characterization of pullulan/montmorillonite nanofiber mats in aqueous solution. *Carbohydr. Polym.*, 2009, **78 (2)**, 336-342.
- [10] Klewicka E., Libudzisz Z., Czajka D., Kuc K.: Antagonistyczna aktywność bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus acidophilus*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1999, **4 (21)**, 168-175.
- [11] Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (Red.): *Mikrobiologia techniczna tom II*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2008, ss. 25-59.
- [12] Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., Saarela M.: Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.*, 2002, **12**, 173-182.
- [13] Myszka K., Czaczyk K.: Rola egzopolisacharydów mikrobiologicznych w technologii żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **4 (41)**, 18-29.
- [14] Pan X., Chen F., Wu T., Tang H., Zhao Z.: Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 2009, **10 (4)**, 258-263.
- [15] PN-ISO 4833:1998. Ogólne zasady oznaczania liczby drobnoustrojów. Metoda płytkowa w 30 °C.
- [16] Ramnani P., Chitarrari R., Tuohy K., Grant J., Hotchkiss S., Philp K., Campbell R., Gill Ch., Rowland I.: *In vitro* fermentation and prebiotic potential of low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe*, 2012, **18**, 1-6.
- [17] Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navarro Y.: Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol.*, 2010, **27**, 1-11.
- [18] Rousseau V., Lepargneur J.P., Roques C., Remaud-Simeon M., Paul F.: Prebiotic effect of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. *Anaerobe*, 2005, **11**, 145-153.

- [19] Ryan S.M., Fitzgerald G.F., van Sinderen D.: Screening for and identification of starch-, amylopectin-, and pullulan-degrading activities in *Bifidobacterial* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 5289-5296.
- [20] Sadaghdar Y., Mortazavian M., Ehsani M.R.: Survival and activity of 5 probiotic lactobacilli strains in 2 types of flavored fermented milk. *Food Sci. Technol.*, 2012, **21 (1)**, 151-157.
- [21] Singh R.S., Saini G.K., Kennedy J.F.: Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carb. Pol.*, 2008, **73**, 515-531.
- [22] Szydłowska A., Kołożyn-Krajewska D.: Zastosowanie bakterii potencjalnie probiotycznych do fermentacji przecieru z dyni. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **6 (73)**, 109-119.

EFFECT OF PULLULAN ADDITIVE ON GROWTH AND FERMENTATION CAPACITY OF SOME SELECTED BACTERIA OF GENUS *LACTOBACILLUS*

S u m m a r y

The effect was studied of pullulan additive on the growth and fermentation capacity of nine strains of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus*. Deep batch cultures were grown during a period of 24 h in an MRS control and experimental medium with 2.0 % of pullulan added. During that 24 h period, it was reported that the bacteria grew from the initial number of 10^4 cfu/cm³ to the count of $10^7 \div 10^9$ cfu/cm³ depending on the strain studied. No significant differences were reported between the count of bacteria cultured in the control medium and in the experimental medium with pullulan added. In order to compare the fermentation capacity of strains at time "0" and at the end of growing those bacteria in the two media, a content of short chain fatty acids (SCFA) was determined using an HPLC method. The following acids were found: formic acid, lactic acid, acetic acid, propionic acid, and hydroxybutyric acid. A higher total content of SCFA was reported in the MRS control medium compared to the MRS experimental medium. The pullulan additive added to the MRS medium contributed to an increased production of lactic acid by the two strains of LAB and of acetic acid by 5 of the 9 LAB strains analyzed.

Key words: LAB, pullulan, SCFA, lactic fermentation, count of bacteria 