

ANNA CHLEBOWSKA-ŚMIGIEL, MAŁGORZATA GNIEWOSZ

PRÓBA ZASTOSOWANIA PULLULANU JAKO STYMULATORA WZROSTU WYBRANYCH BAKTERII PROBIOTYCZNYCH I POTENCJALNIE PROBIOTYCZNYCH

Streszczenie

Badano wpływ dodatku pullulanu na stymulację wzrostu 12 szczepów bakterii probiotycznych oraz potencjalnie probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus*. Hodowle prowadzono przez 48 h, z wykorzystaniem automatycznego analizatora wzrostu Bioscreen C, na podłożach kontrolnych MRS z glukozą (od 0,5 do 2,0 %), doświadczalnych MRS z pullulanem (od 0,5 do 2,0 %) oraz MRS zawierających 2,0 % glukozy i 2,0 % pullulanu. Nie zaobserwowano większego wzrostu bakterii na podłożach zawierających pullulan, natomiast wszystkie badane szczepy wykazywały dużo lepszy wzrost na podłożach z glukozą, suplementowanych 2-procentowym dodatkiem pullulanu. Najlepszy efekt stymulujący uzyskano w stosunku do szczepu *Lactobacillus plantarum* 44. Równolegle prowadzono analizę zmian pH i kwasowości ogólnej po 24 i 48 h hodowli. Nie stwierdzono różnic w wartościach pH oraz kwasowości ogólnej podłoża MRS zawierającego 2,0 % glukozy oraz MRS zawierającego 2,0 % glukozy i 2,0 % pullulanu, zarówno po 24, jak i po 48 h hodowli. Jedynie w hodowli szczepu *L. acidophilus* CH-5 stwierdzono wyższą kwasowość ogólną podłoża MRS suplementowanego pullulanem, zarówno po 24, jak i po 48 h hodowli. Równocześnie dodatek pullulanu stymulował wzrost tego szczepu.

Słowa kluczowe: : pullulan, *Lactobacillus*, stymulacja wzrostu

Wprowadzenie

Pullulan jest polisacharydem (neutralnym α -glukanem) wytwarzanym pozakomórkowo przez grzyby z gatunku *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud. Związek ten zbudowany jest z regularnie powtarzających się trimerów α -(1 \rightarrow 4)Glup- α -(1 \rightarrow 4)Glup- α -(1 \rightarrow 6)Glup, tworzących długie liniowe cząsteczki o dużej masie molekularnej, mieszczącej się w granicach $4,5 \cdot 10^4$ do $6 \cdot 10^5$ Da [2, 17]. Biosynteza pullulanu zaczyna się pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu populacji *A. pullulans* i zachodzi głównie w formach przetrwanych tj. chlamydosporach i komórkach wzdętych

Dr inż. A. Chlebowska-Śmigiel, prof. dr hab. M. Gniewosz, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

grzyba [1, 18, 19]. W formie handlowej pullulan jest białym niehigroskopijnym proszkiem, dobrze rozpuszczalnym w zimnej i gorącej wodzie, bez smaku i zapachu. Wodne roztwory pullulanu są lepkie, ale nie tworzą żelu. Pullulan jest związkami nietoksycznym i niemutagennym, w Japonii jest stosowany jako dodatek do żywności od ponad 30 lat, a w Stanach Zjednoczonych od 2002 r. Powszechnie jest uważany za bezpieczny (ma status GRAS). W 2004 r. EFSA pozytywnie zaopiniowała zastosowanie pullulanu do tworzenia powłok suplementów żywnościowych [4]. W Unii Europejskiej zastosowanie pullulanu jest obecnie ograniczone do produkcji listków odświeżających oddech, w których stanowi ciekłą, dobrze rozpuszczalną w ustach powłokotwórczą bazę. Jednak możliwości zastosowania tego polisacharydu w gospodarce człowieka są znacznie większe, zwłaszcza w farmacji i technologii żywności [4, 8]. W przemyśle farmaceutycznym w USA i Kanadzie pullulan i jego pochodne stosuje się głównie do wytwarzania kapsułek produktów farmaceutycznych i nutraceutycznych oraz do powlekania leków w postaci tabletek [2]. W produkcji żywności pullulan może być użyty m.in. jako stabilizator i spoiwo składników past spożywczych, środek poprawiający lepkość napojów, sosów i majonezów oraz częściowy zamiennik skrobi w makaronach i pieczywie [17].

Pullulan dostarcza tylko 2,05 kcal/g (8,79 kJ/g), ze względu na dużą oporność na enzymy trawienne przewodu pokarmowego ssaków. W badaniach *in vitro* wykazano, że amylazy ślinowe i trzustkowe rozkładają pullulan do mniejszych molekuł. Sugerowano, że mogą być one następnie fermentowane przez mikroflorę okrężnicy do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych [12]. Jednak wyniki badań przeprowadzonych *in vivo* nie dostarczyły jednoznacznych dowodów na potwierdzenie tej hipotezy. Nieliczne są również badania dotyczące wpływu pullulanu na liczbę mikroflory jelitowej. Pullulan podawany w diecie ośmiu dorosłym wolontariuszom w dawce 10 g/dzień przez 14 dni spowodował przyrost masy kału (ze 129 g/dzień do 188 g/dzień) i przyczynił się do zwiększenia w kale procentowej zawartości bifidobakterii (z 12 do 25 %) w stosunku do próbek kału osób stanowiących grupę kontrolną [11]. Właściwości te mogą wskazywać również na możliwość zastosowania pullulanu jako prebiotyku. Z definicji podanej przez Roberfroida [14] wynika, że prebiotyk to niestrawny składnik żywności, selektywnie fermentowany przez mikroflorę jelitową, który powoduje korzystne zmiany w składzie i/lub aktywności mikroflory przewodu pokarmowego o działaniu korzystnym na stan zdrowia oraz samopoczucia gospodarza. Dobrze scharakteryzowanymi prebiotykami są fruktooligosacharydy (FOS), w tym inulina i oligofruktoza, następnie oligosacharydy sojowe, galaktooligosacharydy, glukozylosacharoza, laktozosacharoza, izomaltooligosacharydy, palatinozooligosacharydy i ksylooligosacharydy [9]. W licznych badaniach wykazano wpływ tych związków na stymulację wzrostu bakterii probiotycznych z rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* [3, 6, 7,

13]. W dostępnej literaturze światowej dane na temat właściwości prebiotycznych pullulanu są bardzo ograniczone.

Celem pracy było określenie wpływu pullulanu na wzrost wybranych szczepów z rodzaju *Lactobacillus*, hodowanych w zmodyfikowanym podłożu MRS, o właściwościach probiotycznych lub potencjalnie probiotycznych w badaniach modelowych.

Material i metody badań

Materiałem do badań były: handlowy pullulan (Focubase, Chiny) oraz szczepy bakterii probiotycznych lub potencjalnie probiotycznych: *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919, *Lactobacillus plantarum* 44, *Lactobacillus plantarum* NCAIM B. 01149, *Lactobacillus plantarum* NCAIM B. 01834, *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Lactobacillus acidophilus* Bauer 1, *Lactobacillus acidophilus* CH-2, *Lactobacillus acidophilus* CH-5, *Lactobacillus acidophilus* Lac 4, *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactobacillus arabinosus* ATCC 8014. Badane 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 % glicerolu w temp. -87 °C.

W celu przygotowania inokulum zamrożone kultury przenoszono jałowo do płynnego podłoża MRS (Biolacta, Polska) i inkubowano w zależności od preferencji temperaturowych szczepu w temp. 30 °C (wszystkie szczepy z gatunku *L. plantarum* i szczep *L. arabinosus*) lub w temp. 37 °C (szczepy z gatunku *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei* i *L. paracasei*) przez 24 h. Następnie komórki odwirowywano w wirówce laboratoryjnej (Eppendorf, Francja) przy 11 000×g przez 1 min. Po zdekantowaniu supernatantu biomasę komórkową przemywano jałowym roztworem soli fizjologicznej i powtórnie odwirowywano. Następnie biomasę komórkową zawieszano w roztworze soli fizjologicznej tak, aby stężenie komórek wynosiło 10⁶ jtk/ml. Tak przygotowane zawiesiny szczepów przenoszono do uprzednio przygotowanych podłoży kontrolnych i doświadczalnych.

Jako kontrolne stosowano płynne podłoża MRS, ze zróżnicowaną zawartością glukozy [%]: 0,5, 1,0, 1,5 lub 2,0 oraz pozostałymi składnikami [g/100 ml]: 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 [15]. Podłoże kontrolne MRS bez glukozy zawierało wszystkie składniki znajdujące się w podłożu MRS, oprócz glukozy.

Jako doświadczalne stosowano płynne podłoża MRS, w których glukozę zastąpiono pullulanem w ilości [%]: 0,5; 1,0; 1,5 lub 2,0. Zastosowano także podłoże MRS zawierające równocześnie 2,0 % glukozy i 2,0 % pullulanu.

Podłoża kontrolne oraz doświadczalne (bez pullulanu) poddawano sterylizacji w autoklawie w temp. 121 °C przez 20 min. Wodny roztwór pullulanu wyjaławiano poprzez filtrację (zastosowano jałowe krążki bibuły filtracyjnej o średnicy porów 0,47 µm firmy Whatman, Niemcy) i dodawano do ostudzonych po sterylizacji podłoży.

Hodowlę szczepów przeprowadzano w zautomatyzowanym analizatorze wzrostu mikroorganizmów Bioscreen C firmy Yo AB Ltd, Growth Curves (Helsinki, Finlandia) przez 48 h w dwóch zakresach temp.: 30 lub 37 °C, w zależności od wymagań temperaturowych badanych szczepów. Hodowle prowadzono w płaskodennych przezroczystych płytkach, zawierających po 100 studzienek o jednakowej roboczej objętości wynoszącej 400 µl. Do każdej studzienki przenoszono po 360 µl podłoża, które inokulowano 40 µl badanego szczepu. Każde doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach. Wzrost szczepów mierzono przy użyciu turbidymetrycznej metody z zastosowaniem filtra szerokopasmowego (420 - 580 nm), który jest mniej wrażliwy na zmianę barwy podłoża. Absorbancję mierzono co 2 h przez 48 h hodowli, po uprzednim automatycznym wytrząsaniu próbek przez 20 s przed każdym odczytem.

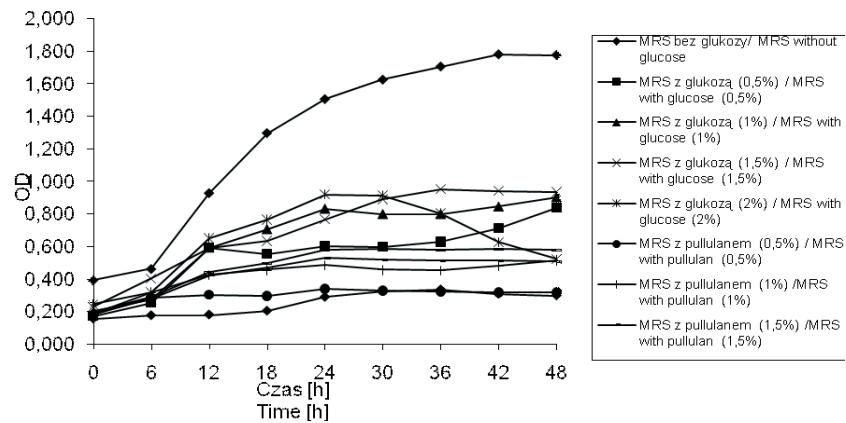
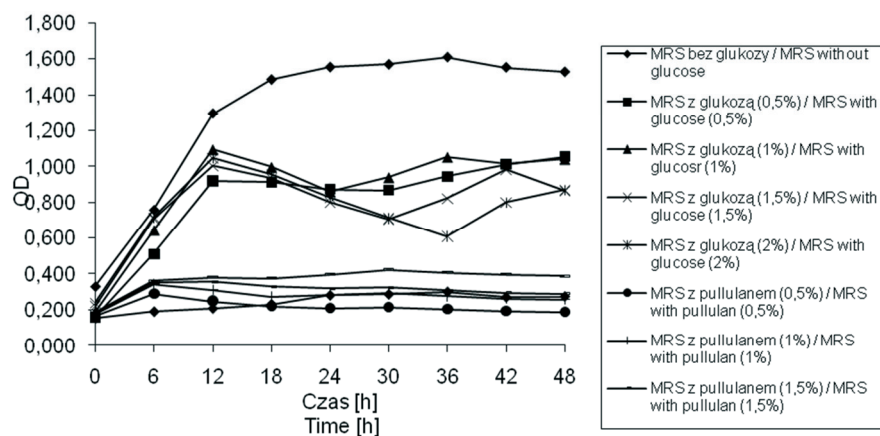
Równolegle prowadzono hodowle badanych bakterii w kolbach, w podłożach kontrolnych i doświadczalnych o objętości 50 ml, z zachowaniem takich samych warunków temperatury i czasu hodowli. Po 24 i 48 h hodowli oznaczano pH oraz kwasowość ogólną.

Pomiar pH wykonywano za pomocą pehametru Elmetron (Polska), po jego wcześniejszym wyskalowaniu z uwzględnieniem temperatury podłoża. Kwasowość ogólną oznaczano metodą miareczkową. W tym celu pobierano jałowo 5 ml hodowli, odwirowywano biomasę komórkową, a płyn pohodowlany miareczkowano przy użyciu 0,1 M NaOH w obecności fenoloftaleiny do pierwszej zmiany barwy na amarantową. Wynik miareczkowania przeliczano na kwas mlekowy, a wynik wyrażano w g kwasu mlekowego w 100 ml płynu pohodowlanego.

Wszystkie doświadczenia wykonywano w minimum trzech powtórzeniach. Wartości średnie oraz odchylenia standardowe obliczono z wykorzystaniem programu Microsoft Excel.

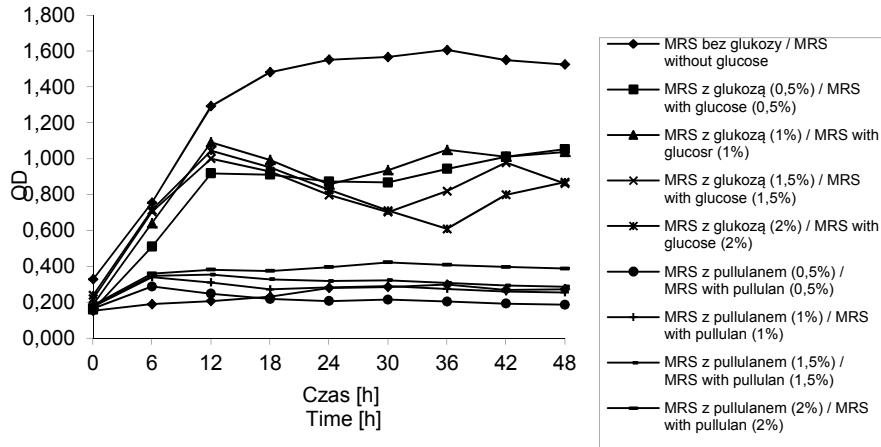
Wyniki i dyskusja

W badaniach wykorzystano 12 szczepów bakterii kwasu mlekowego, które hodowano w podłożach zawierających glukozę i pullulan. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 1.

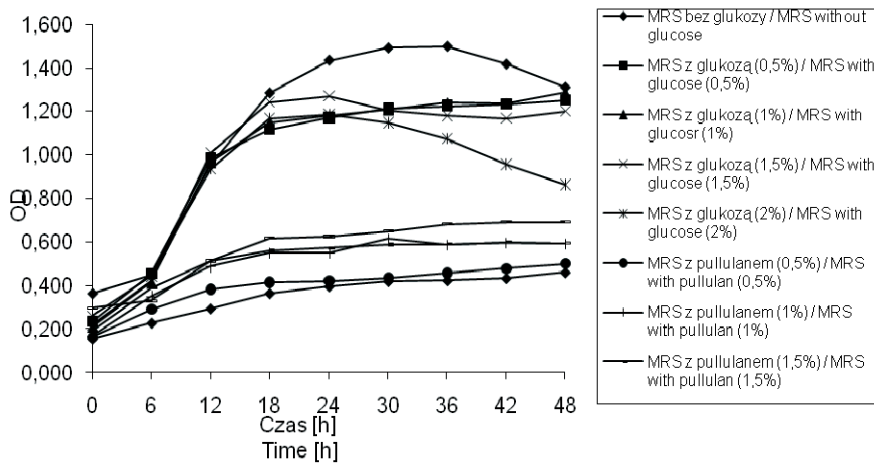
A. *Lactobacillus plantarum* 44.B. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

Rys. 1A, B. Zmiany gęstości optycznej (OD) podłoża hodowlanych podczas 48 h hodowli bakterii *Lactobacillus*.

Fig. 1A, B. Changes in optical density (OD) of culture media during 48 h incubation of bacteria *Lactobacillus*.



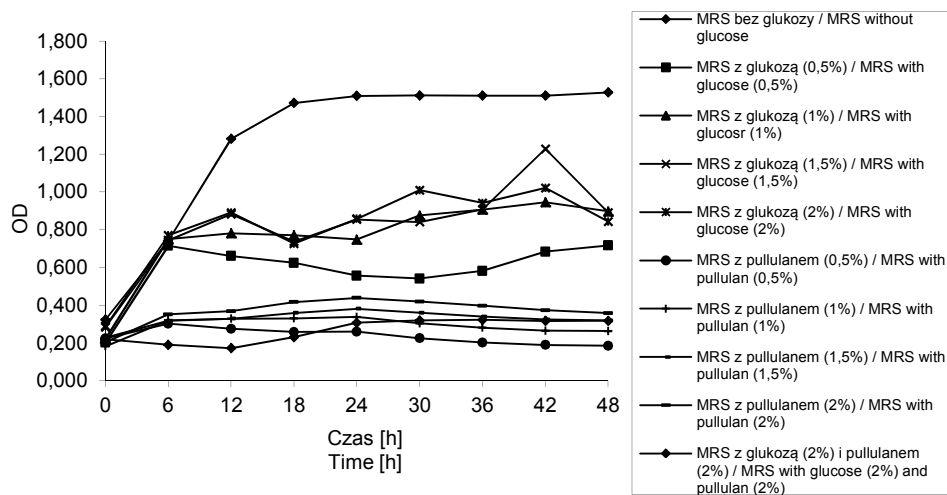
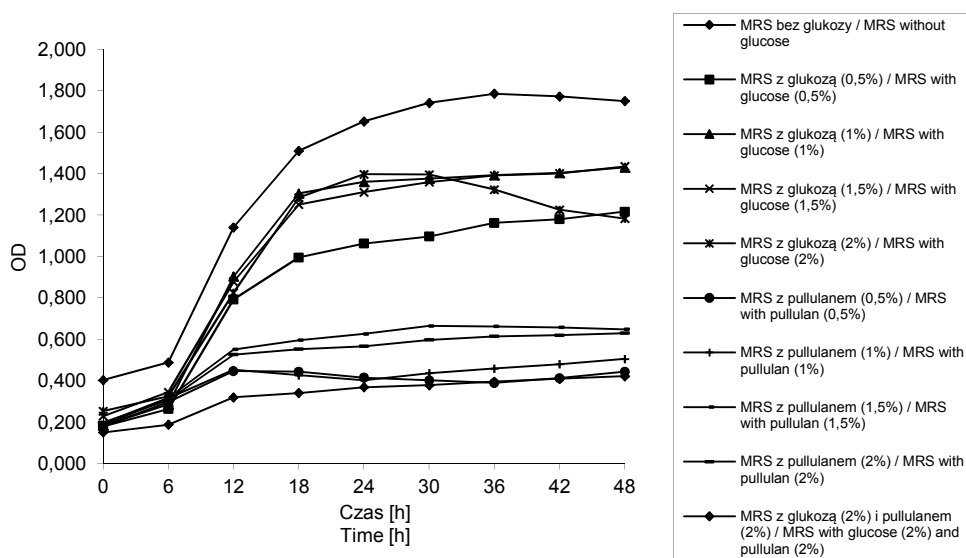
C. *Lactobacillus acidophilus* Lac 4.



D. *Lactobacillus plantarum* NCAIM B.01834.

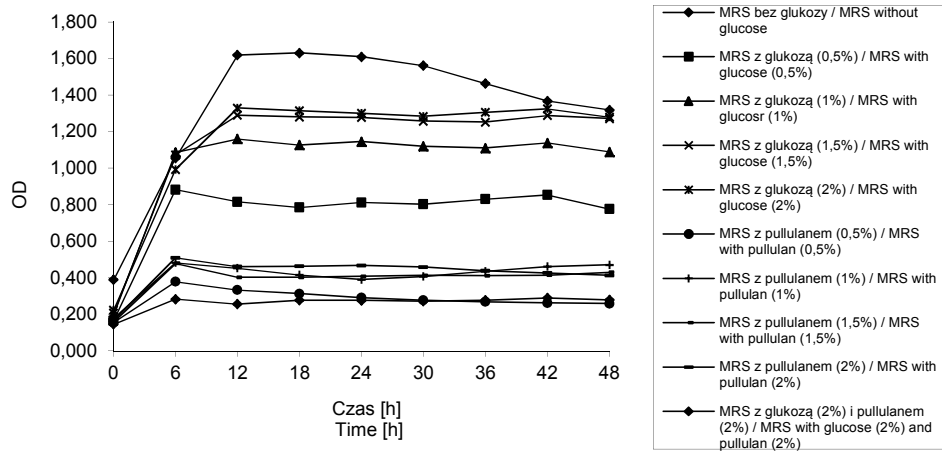
Rys. 1C, D. Zmiany gęstości optycznej (OD) podłoży hodowlanych podczas 48 h hodowli bakterii *Lactobacillus*.

Fig. 1C, D. Changes in optical density (OD) of culture media during 48 h incubation of bacteria *Lactobacillus*.

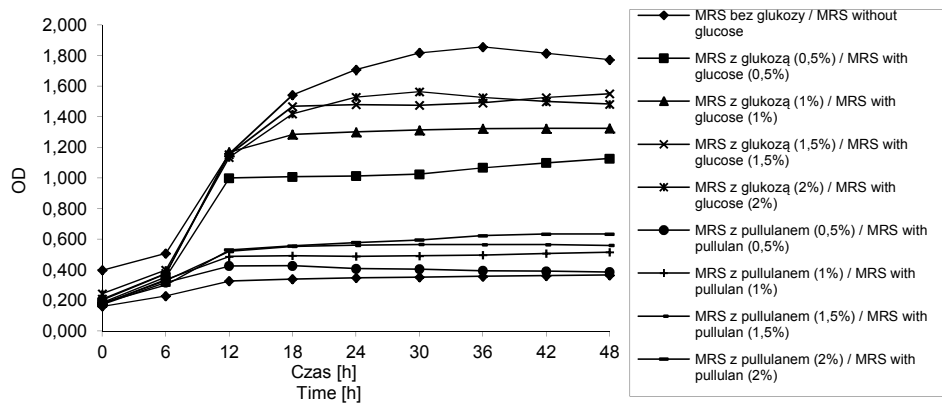
E. *Lactobacillus arabinosus* ATCC 8014.F. *Lactobacillus plantarum* NCAIM B. 01149.

Rys. 1E, F. Zmiany gęstości optycznej (OD) podłoża hodowlanych podczas 48 h hodowli bakterii *Lactobacillus*.

Fig. 1E, F. Changes in optical density (OD) of culture media during 48 h incubation of bacteria *Lactobacillus*.



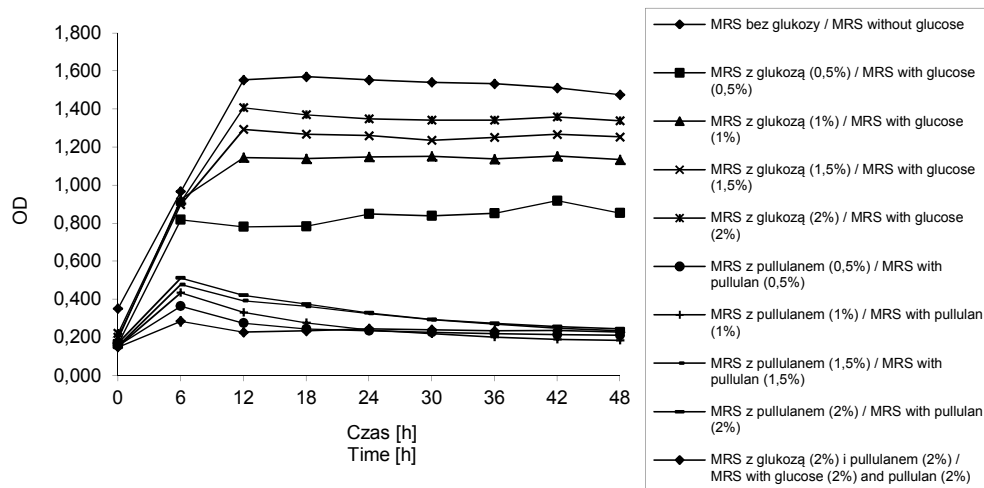
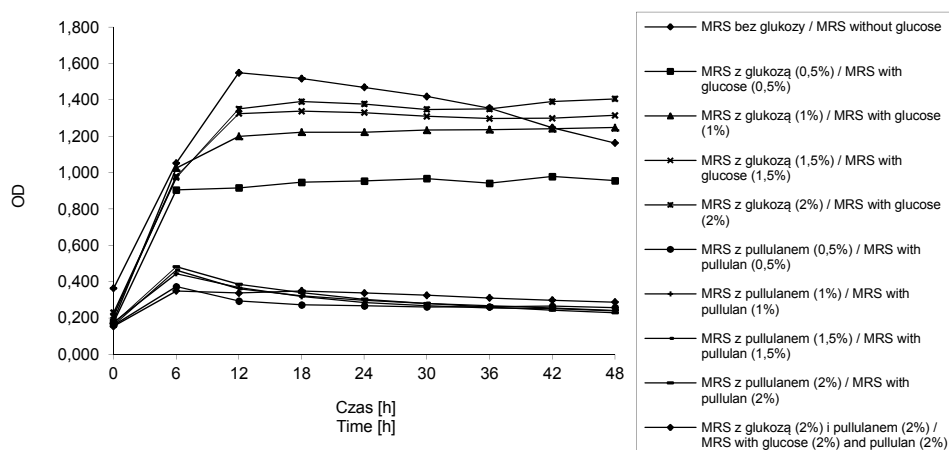
G. *Lactobacillus acidophilus* CH-5.



H. *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080.

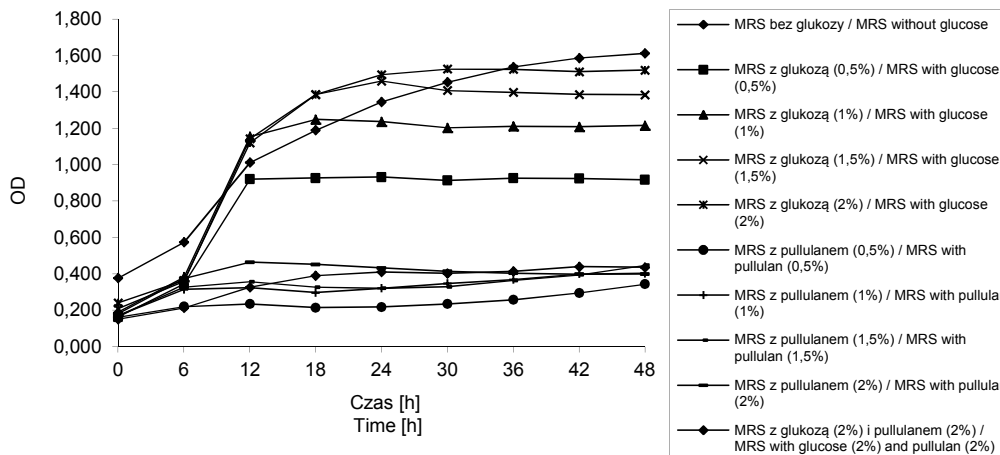
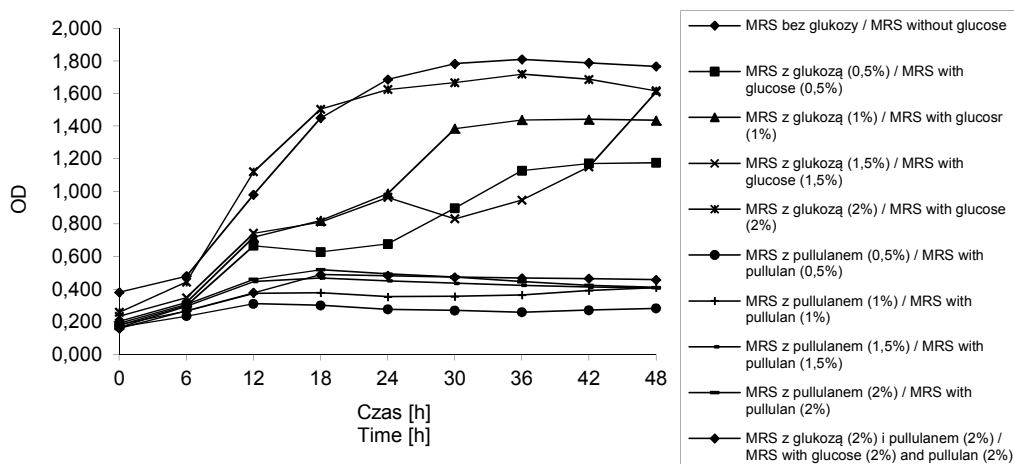
Rys. 1G, H. Zmiany gęstości optycznej (OD) podłoży hodowlanych podczas 48 h hodowli bakterii *Lactobacillus*.

Fig. 1G, H. Changes in optical density (OD) of culture media during 48 h incubation of bacteria *Lactobacillus*.

I. *Lactobacillus acidophilus* CH-2.J. *Lactobacillus acidophilus* Bauer 1.

Rys. 1I, J. Zmiany gęstości optycznej (OD) podłoży hodowlanych podczas 48 h hodowli bakterii *Lactobacillus*.

Fig. 1I, J. Changes in optical density (OD) of culture media during 48 h incubation of bacteria *Lactobacillus*.

K. *Lactobacillus paracasei* ŁOCK 0919.L. *Lactobacillus casei* ATCC 393.

Rys. 1K, L. Zmiany gęstości optycznej (OD) podłoży hodowlanych podczas 48 h hodowli bakterii *Lactobacillus*.

Fig. 1K, L. Changes in optical density (OD) of culture media during 48 h incubation of bacteria *Lactobacillus*.

Analizując przedstawione wykresy zmian gęstości optycznej (OD) podczas 48 h hodowli można zauważyć, że pullulan, jako źródło węgla, dodany w stężeniu 0,5, 1,0, 1,5 lub 2,0 %, powodował niewielki wzrost biomasy badanych szczepów bakterii. Uzyskane wartości OD mieściły się w granicach od 0,4 (szczepy z gatunków *L. casei*, *L. arabinosus*, *L. acidophilus*) do nieznacznie powyżej 0,6 (szczepy *L. plantarum* i *L.*

rhamnosus). Większy wzrost biomasy badanych bakterii obserwowano w pożywkach kontrolnych, tj. MRS z różną zawartością glukozy (0,5 - 2,0 %). Maksymalne wartości OD w tych hodowlach zawierały się w przedziale 0,8 - 1,5 w zależności od szczepu bakterii. Porównując otrzymane wartości OD podłoży kontrolnych i doświadczalnych można wnioskować, że pullulan był w małym stopniu wykorzystany przez badane szczepy bakterii, czego powodem była prawdopodobnie ich słaba zdolność do enzymatycznej hydrolizy pullulanu do glukozy. Potwierdzają to również Ryan i wsp. [16], którzy wykazali, że tylko nieliczne szczepy *Bifidobacterium* wytwarzają pullulanazy rozkładające ten związek. W przeprowadzonych badaniach autorzy wykazali, że spośród 42 szczepów *Bifidobacterium* tylko 11 było zdolnych do wykorzystania pullulanu jako źródła węgla.

Porównując hodowle badanych szczepów bakterii w podłożu MRS, zawierającym równocześnie 2,0 % glukozy i 2,0 % pullulanu, zaobserwowano zdecydowanie wyższe wartości OD w przypadku dziesięciu z nich (rys. 1 A - J). Maksymalne wartości gęstości optycznej były wyższe niż uzyskane w tym samym czasie w podłożu MRS, zawierającym tylko 2,0 % glukozy, i mieściły się w granicach od 1,4 do 1,8 w zależności od szczepu.

Najlepszy efekt stymulujący wzrost stwierdzono w przypadku szczepu *L. plantarum* 44 (rys. 1A). Najwyższą wartość OD uzyskano po 48 h hodowli i była ona 2,5-krotnie wyższa od wartości OD podłoża MRS tylko z 2-procentową zawartością glukozy. Najniższy wynik stymulacji wzrostu uzyskano w stosunku do szczepu *L. casei* ATCC 393 i *L. paracasei* LOCK 0919 (rys. 1 G, H). Po 48 h hodowli wartości OD podłoża z glukozą i pullulanem były wyższe tylko od 6 do 9 % w porównaniu z podłożem z glukozą.

Dodatek pullulanu do podłoża spowodował wydłużenie fazy logarytmicznego wzrostu badanych szczepów już między 12. a 15. godziną hodowli. Efekt stymulacji wzrostu większości badanych bakterii obserwowano maksymalnie do 24. godziny hodowli. Wyjątek stanowiły szczepy *L. plantarum* 44 i *L. plantarum* NCAIM B.01149, w hodowli których log-faza przedłużona była do 36. godziny.

Przeprowadzono także badanie zmian pH oraz kwasowości ogólnej po 24 i 48 h hodowli testowanych bakterii. Wyniki zamieszczone w tab. 1 przedstawiają wartości uzyskane tylko w dwóch podłożach: MRS z 2,0 % zawartością glukozy oraz MRS zawierającym 2,0 % glukozy i 2,0 % pullulanu, ze względu na najlepszy wzrost szczepów w tych podłożach.

Różnice w wartościach pH pomiędzy hodowlami w obu podłożach nie były duże, ale statystycznie istotne. Po 24 h hodowli wartość pH w podłożu z glukozą wynosiła od 3,68 (*L. plantarum* NCAIM B. 01149) do 3,9 (*L. acidophilus* CH-5), a po 48 godzinach od 3,56 (*L. plantarum* ATCC 4080) do 3,79 (*L. casei* ATCC 393). W przypadku podłoża z dodatkiem pullulanu wartość pH po 24 h hodowli wynosiła od 3,8 (*L. plantarum* NCAIM B. 01149) do 4,06 (*L. plantarum* 44) oraz od 3,61 (*L. plantarum*

ATCC 4080) do 3,83 (*L. plantarum* 44). Nie zaobserwowano także większych różnic w kwasowości bez względu na zastosowane podłoże, co może świadczyć o braku fermentacji pullulanu przez badane szczepy bakterii. Jedynie w hodowli szczepu *L. acidophilus* CH-5 stwierdzono wyższą ogólną kwasowość podłoża MRS z zawartością 2,0 % glukozy i 2,0 % pullulanu zarówno po 24, jak i po 48 h hodowli. Równocześnie wzrost tego szczepu był stymulowany przez dodatek pullulanu.

Tabela 1

Wartość pH i kwasowość ogólna badanych podłoży.
Changes in pH and total acidity of media studied.

Szczep bakterii Strain of bacteria	pH $\bar{x} \pm s / SD$				Kwasowość ogólna [g kwasu mlekowego/100 ml] Total acidity [Lactic acid g/100 ml] $\bar{x} \pm s / SD$			
	MRS +2 % glukozy		MRS +2 % glukozy i 2 % pullulanu		MRS +2 % glukozy		MRS +2 % glukozy i 2 % pullulanu	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>Lactobacillus plantarum</i> 44	3,81 ± 0,04	3,63 ± 0,02	4,06 ± 0,01	3,83 ± 0,01	1,10 ± 0,01	1,58 ± 0,01	1,01 ± 0,01	1,49 ± 0,02
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCAIM B. 01149	3,68 ± 0,02	3,59 ± 0,01	3,8 ± 0,01	3,68 ± 0,03	0,95 ± 0,01	1,14 ± 0,02	0,92 ± 0,01	1,22 ± 0,01
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCAIM B. 01834	3,79 ± 0,03	3,67 ± 0,02	3,95 ± 0,02	3,78 ± 0,02	1,13 ± 0,02	1,64 ± 0,01	0,97 ± 0,01	1,36 ± 0,03
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	3,66 ± 0,05	3,58 ± 0,03	3,85 ± 0,02	3,79 ± 0,01	1,03 ± 0,01	1,42 ± 0,01	1,15 ± 0,02	1,46 ± 0,01
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Bauer 1	3,9 ± 0,01	3,76 ± 0,01	3,87 ± 0,01	3,78 ± 0,01	1,09 ± 0,01	1,66 ± 0,03	0,95 ± 0,01	1,5 ± 0,01
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 4080	3,76 ± 0,01	3,56 ± 0,01	3,9 ± 0,01	3,61 ± 0,02	1,05 ± 0,03	1,41 ± 0,01	0,99 ± 0,01	1,37 ± 0,02
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	3,83 ± 0,02	3,79 ± 0,01	3,97 ± 0,01	3,79 ± 0,02	1,16 ± 0,01	1,22 ± 0,01	1,14 ± 0,01	1,26 ± 0,02
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH-5	3,90 ± 0,01	3,59 ± 0,02	3,84 ± 0,03	3,76 ± 0,01	1,05 ± 0,01	1,44 ± 0,02	1,26 ± 0,03	1,53 ± 0,01
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH-2	3,87 ± 0,04	3,76 ± 0,02	3,88 ± 0,02	3,77 ± 0,03	1,09 ± 0,02	1,54 ± 0,01	1,19 ± 0,01	1,41 ± 0,01
<i>Lactobacillus arabinosus</i> ATCC 8014	3,76 ± 0,02	3,62 ± 0,03	3,99 ± 0,02	3,76 ± 0,02	1,08 ± 0,01	1,55 ± 0,01	1,18 ± 0,03	1,45 ± 0,01
<i>Lactobacillus paracasei</i> ŁOCK 0919	3,80 ± 0,02	3,79 ± 0,01	3,97 ± 0,01	3,79 ± 0,01	0,1 ± 0,01	1,42 ± 0,01	0,82 ± 0,01	1,31 ± 0,01
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Lac 4	3,70 ± 0,01	3,58 ± 0,01	3,83 ± 0,03	3,76 ± 0,02	1,22 ± 0,02	1,55 ± 0,02	1,19 ± 0,02	1,51 ± 0,21

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s / SD$ – wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation; n = 6.

Uzyskane wyniki badań wskazują na korzystny wpływ pullulanu na wzrost i metabolizm bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, co może sugerować, że związek ten wykazuje właściwości prebiotyczne. Goderska i wsp. [5] oraz Matijević i wsp. [10], po przebadaniu wpływu dobrze zdefiniowanych prebiotyków, jak oligofruktoza, inulina i laktuloza na szczepy probiotyczne, uzyskali nie tylko znaczne zwiększenie liczby komórek tych szczepów w hodowlach, ale także lepsze ich działanie kwasotwórcze. Dlatego też celowe jest podjęcie dalszych badań właściwości prebiotycznych pullulanu.

Wnioski

1. Dodatek pullulanu do podłoża MRS stymulował wzrost większości badanych szczepów z rodzaju *Lactobacillus*.
2. W podłożach MRS zawierających glukozę i pullulan obserwowano wydłużenie fazy logarytmicznego wzrostu tych szczepów w porównaniu z podłożem niesuplementowanym pullulanem.
3. Pullulan dodany w stężeniu 2,0 % do podłoża MRS najlepiej stymulował wzrost i aktywność fermentacyjną szczepu *L. acidophilus* CH-5.

Literatura

- [1] Campbell B.S., Siddique A-B.M., McDougall B.M., Seviour R.J.: Which morphological forms of the fungus *Aureobasidium pullulans* are responsible for pullulan production? FEMS Microbiol. Let., 2004, **232**, 225-228.
- [2] Cheng K.C., Demirci A., Catchmark J.M.: Pullulan: biosynthesis, production, and applications. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, **92**, 29-44.
- [3] Ghoddusi H.B., Grandison M.A., Grandison A.S., Tuohy K.M.: In vitro study on gas generation and prebiotic effects of some carbohydrates and their mixtures. Anaerobe, 2007, **13**, 193-199.
- [4] Gniewosz M.: Pullulan – nowy dodatek do żywności. Przem. Spoż., 2009, **5 (63)**, 24-27.
- [5] Goderska K., Nowak J., Czarnecki Z.: Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment., 2008, **7 (2)**, 5-20.
- [6] Hernandez-Hernandez O., Muthaiyan A., Moreno F.J., Montilla A., Sanz M.L., Ricke S.C.: Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. Food Microbiol., 2012, **30**, 355-361.
- [7] Jałosińska M.: Przeżywalność szczepu probiotycznego w napoju bananowo-mlecznym w zależności od dodatku różnych prebiotyków. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2007, **6 (55)**, 127-137.
- [8] Leathers T.D.: Biotechnological production and applications of pullulan. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003, **62**, 468-473.
- [9] Libudzisz Z.: Probiotyki i prebiotyki w fermentowanych napojach mlecznych. Pediaatria Współczesna, 2002, **1 (4)**, 19-25.
- [10] Matijević B., Božanić R., Tratnik L.: The influence of lactulose on growth and survival of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reconstituted sweet whey. Mijekarstvo, 2009, **1 (59)**, 20-27.
- [11] Mitsuhashi M., Yoneyama M., Sakai S.: Growth promoting agent for bacteria containing pullulan with or without dextran. European Patent Specification 1990, EP 0 382 355 B1.

- [12] Okada K., Yoneyama M., Mandai T., Aga H., Sakai S., Ichikawa T.: Digestion and fermentation of pullulan. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 1990, **43**, 23-29.
- [13] Pompei A., Cordisco L., Raimondi S., Amaretti A., Pagnoni U.M., Matteuzzi D., Rossi M.: *In vitro* comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. *Anaerobe*, 2008, **14**, 280-286.
- [14] Roberfroid M.B.: Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.*, 2007, **3 (137)**, 830-837S.
- [15] 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.
- [16] 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, **72 (80)**, 5289-5296.
- [17] Singh R.S., Saini G.K., Kennedy J.F.: Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydr. Polym.*, 2008, **73**, 515-531.
- [18] Simon I., Bouchet B., Caye-Vaugien C., Gallant D.J.: Pullulan elaboration and differentiation of the resting forms in *Aureobasidium pullulans*. *Can. J. Microbiol.*, 1995, **41**, 35-45.
- [19] Simon I., Caye-Vaugien C., Bouchonneau M.: Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: New observations. *J. Gen. Microbiol.*, 1993, **9**, 979-985.

ATTEMPT TO APPLY PULLULAN AS GROWTH STIMULATOR FOR SELECTED PROBIOTIC AND POTENTIALLY PROBIOTIC BACTERIA

S u m m a r y

The effect was studied of the addition of pullulan on the growth stimulation of 12 strains of probiotic and potentially probiotic bacteria of a *Lactobacillus* genus. The cultures were incubated for 48h with the use of an automatic growth analyzer 'Bioscreen C' in MRS control media with glucose (0.5 to 2.0 %), in experimental MRS media with pullulan added (from 0.5 to 2.0 %), and in MRS media containing 2.0 % of glucose and 2.0 % of pullulan. It was found that the bacteria studied did not grow better in the media containing pullulan; however, the strains studied grew much better in the media with glucose and supplemented with 2.0 % of pullulan. The best stimulating effect was achieved for the *L. plantarum* 44 strain. At the same time, changes in pH and total acidity of the culture media were analyzed after a period of 24 and 48 h of incubation. No differences were reported in the values of pH and total acidity as regards the MRS medium with 2.0 % of glucose and the MRS with 2.0 % of glucose and 2.0 % of pullulan, equally after 24 and 48 h of their incubation. A culture of *L. acidophilus* CH-5 was the only one to show a higher acidity of the MRS medium with 2.0 % of glucose and 2.0 % of pullulan, equally after 24 and 48 h of their incubation. At the same time, the addition of pullulan stimulated the growth of the latter bacterial strain.

Key words: pullulan, *Lactobacillus*, stimulation of growth ☒