

KATARZYNA ŚLIŻEWSKA, ZDZISŁAWA LIBUDZISZ

FORMA OPTYCZNA KWASU MLEKOWEGO TWORZONA PRZEZ BAKTERIE Z RODZAJU *LACTOBACILLUS* W PODŁOŻU ZAWIERAJĄCYM RÓŻNE ŹRÓDŁO WĘGLA

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu inuliny (preparaty Raftiline[®]) oraz fruktoooligosacharydów (preparaty Raftilose[®]) na poziom tworzonoego kwasu mlekowego i jego izomerów, przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Kontrolne hodowle prowadzono w obecności monosacharydów (glukoza, galaktoza, fruktoza) oraz disacharydów (laktoza, sacharoza). Zawartość form optycznych kwasu mlekowego określono przy zastosowaniu testów enzymatycznych firmy Boehringer Mannheim.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że ilość kwasu mlekowego wytworzonego przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w pożywce MRS, zawierającej fruktoooligosacharydy, wynosiła średnio 2,62 g/l i była znacznie niższa niż w pożywkach z mono- lub disacharydami (9,31 g/l). Średnia ilość L(+) kwasu mlekowego wyniosła od 0,70 g/l (w podłożu z Raftiline[®]HP) do 7,69 g/l (w podłożu z glukozą). Stosunek izomeru L(+) do izomeru D(-) w przypadku hodowli z zastosowaniem fruktoooligosacharydów wynosił średnio 3,11 a przy zastosowaniu cukrów prostych 3,14.

Wstęp

Preparaty Raftiline[®] i Raftilose[®] firmy ORAFTI (Belgia) są rozpuszczalnymi włóknami spożywczymi, stymulującymi rozwój jelitowych bakterii mlekowych. Właściwości te kwalifikują je do grupy prebiotyków. Preparaty te poprawiają ponadto konsystencję, wygląd oraz walory sensoryczne wielu produktów spożywczych, co sprawia, że dzięki połączeniu zalet dietetycznych oraz technologicznych stwarzają możliwości opracowywania nowych produktów w przemyśle mleczarskim.

Kwas mlekowy to jeden z najwcześniej poznanych kwasów organicznych. Występuje głównie w kwaśnym mleku (stąd jego nazwa), a powstaje w wyniku fermentacji laktozy wywołanej przez bakterie fermentacji mlekowej, np. *Lactococcus lactis*. Kwas mlekowy wg IUPAC jest nazywany kwasem 2-hydroksypropionowym. Jest on

najprostszym kwasem hydroksykarboksylowym zawierającym asymetryczny atom węgla. Ten szczegół jego budowy sprawia, że kwas mlekowy, a co ważniejsze – wszystkie jego pochodne, występują w trzech odmianach o zróżnicowanych właściwościach fizycznych i chemicznych. Jako kwas α -hydroksykarboksylowy, w roztworze wodnym ulega samoistnej równowagowej przemianie chemicznej do estrów wewnętrznych, różniących się znacznie od monomerycznego kwasu mlekowego swoimi właściwościami [2, 5, 6].

W przyrodzie występuje w postaci izomerów optycznych: kwas L(+) mlekowy i D(-) mlekowy, natomiast w wyniku syntezy chemicznej powstaje mieszanina racemiczna – kwas D,L – mlekowy – forma nieaktywna optycznie. Organizmy wyższe wytwarzają tylko formę L(+) kwasu mlekowego, gdyż ich zespół enzymatyczny nie wydziela D(-) dehydrogenazy mleczanowej, warunkującej metabolizm formy D(-). Forma L(+) ulega całkowicie przemianom metabolicznym w organizmach wyższych, natomiast izomery D(-) kwasu mlekowego zawarte w pokarmach człowieka ulegają wolniej wchłanianiu i pozostają dłużej w przewodzie pokarmowym, a po przedostaniu się do krwi mogą przejściowo się tam nagromadzać powodując zakwaszenie (laktacjemia). Dlatego w odróżnieniu od kwasu L(+) i jego soli sodowej, potasowej czy wapniowej, które mogą być spożywane w nieograniczonych ilościach (Quantum stasis), w świetle ustawodawstwa Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dzienną dawkę kwasu D(-) mlekowego ogranicza się do 100 mg /kg masy ciała, a z diety dzieci i niemowląt wyklucza się go całkowicie [1, 3, 4].

Celem badań było określenie wpływu inuliny (preparatów Raftiline[®]) oraz fruktooligosacharydów (preparatów Raftilose[®]) na poziom tworzonych kwasu mlekowego i udział jego izomerów, przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, w tym również szczepów o udokumentowanych cechach probiotycznych i stosowanych w handlowych produktach fermentowanych. Kontrolne hodowle prowadzono w obecności monosacharydów (glukoza, galaktoza, fruktoza) oraz disacharydów (laktoza, sacharoza).

Badania są prowadzone w celu opracowania produktu synbiotycznego, czyli zawierającego bakterie probiotyczne i sacharydy stymulujące wzrost LAB. Za takie są uznawane inulina i fruktooligosacharydy.

Material i metody badań

Materiałem badawczym było 15 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* o symbolach: *Lb. acidophilus* H1, Jn3, 1nd1, CH-5, CH-2, ros,2537, 2538, *Lb. casei*-NCDO 206, *Lb. casei*-Shirota, *Lb. crispatus* NCFB 2752, *Lb. delbruecki ssp. lactis* 2543, *Lb. gasseri*, *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53105, *Lb. thermophilus* 094 11.78-NCDO 489. Szczepy te pochodziły z Kolekcji czystych kultur Zakładu Rhodia-Food Biolacta w Olsztynie, z Wyższej Szkoły Chemiczno-Technologicznej w Pradze oraz z

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (szczepy o uznanych właściwościach probiotycznych).

W badaniach modelowych przeprowadzono fermentację podłoży MRS, zawierających jako źródło węgla handlowe preparaty inuliny i oligofruktozy: Raftiline® HP (99,5% inuliny), Raftiline® ST (92% inuliny), Raftilose®P95 (93,2% oligofruktozy) oraz Raftilose®L60 (60% oligofruktozy) firmy ORAFTI (Belgia). Próbkami kontrolnymi były hodowle bakterii w podłożach z: glukozą, galaktozą, fruktozą, laktozą, sacharozą lub odczynnikową inuliną.

Zawartość form optycznych kwasu mlekowego określano przy zastosowaniu testów enzymatycznych firmy Boehringer Mannheim.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że ilość kwasu mlekowego wytworzonego przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, po 24 godzinach hodowli, była zróżnicowana w zależności od stosowanego źródła węgla. W podłożach MRS, zawierających handlowe preparaty inuliny i fruktooligosacharydów, ilość kwasu mlekowego była niska i wynosiła od 1,06 g/l (podłoże z Raftiline® HP) do 6,25 g/l (podłoże z Raftilose®L60). Ilość ta była znacznie wyższa w pożywkach zawierających mono- i disacharydy, gdzie wynosiła od 8,42 g/l (podłoże z galaktozą) do 10,09 g/l (podłoże z glukozą). Widoczna jest również międzyszczepowa zmienność aktywności kwasotwórczej w zależności od źródła węgla. Stosunkowo małe zróżnicowanie aktywności wystąpiło przy zastosowaniu jako źródła węgla preparatów inuliny i fruktooligosacharydów. Duże różnice otrzymano przy zastosowaniu mono- i disacharydów. Przeprowadzone badania wykazały ponadto, że niektóre szczepy wykazują dość dużą elastyczność w przystosowaniu się do różnych źródeł węgla, np. *Lb. acidophilus* H1, czy szczep probiotyczny *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53105, dla których uzyskano bardzo dobrą aktywność kwasotwórczą, niezależnie od zastosowanego cukru.

Średnia ilość L(+) kwasu mlekowego w pożywkach zawierających handlowe preparaty inuliny i fruktooligosacharydów wyniosła od 0,70 g/l (podłoże z Raftiline® HP) do 4,38 g/l (podłoże z Raftilose®L60). Ilość ta była znacznie wyższa w pożywkach zawierających mono- i disacharydy, gdzie wynosiła średnio 6,78 g/l.

Stosunek izomeru L(+) do izomeru D(-) w przypadku hodowli z zastosowaniem fruktooligosacharydów wynosił średnio 3,11, a przy zastosowaniu cukrów prostych 3,14. Udział kwasu L(+) mlekowego w obecności fruktooligosacharydów wynosił średnio 71,8%, i wahał się zależnie od szczepu od 50,6% do 90,3%, natomiast w obecności cukrów prostych wynosił średnio 72,9%, a w zależności od szczepu i rodzaju cukru wahał się od 52,2% do 88,1%.

Tworzenie kwasu mlekowego i jego izomeru L(+) przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zostało przedstawione w tab. 1. oraz w formie rysunków 1–2. Wykresy te

obrazują produkcję kwasu mlekowego w podłożu MRS zawierającym jako źródło węgla handlowe preparaty inuliny i oligofruktozy oraz mono- i disacharydy. Każdy wykres umożliwia jednoczesny odczyt stężenia kwasu mlekowego oraz jego izomeru L(+) jak i procentowego udziału tego izomeru (wartości te zostały podane w etykietach danych).

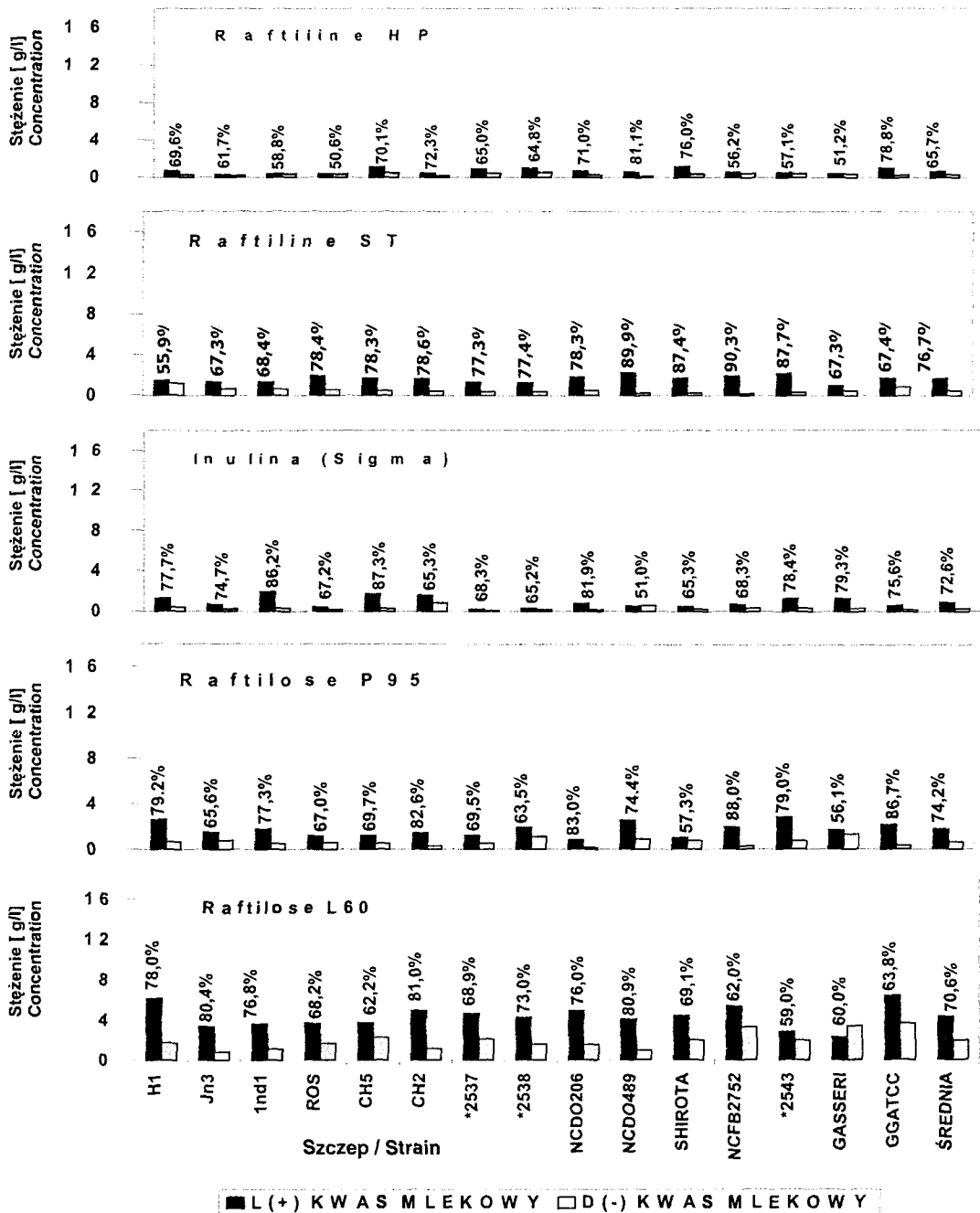
Tabela 1

Produkcja kwasu mlekowego i jego izomeru L(+) przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*.
Production of lactic acid and its isomer L(+) by *Lactobacillus* strains.

Źródło węgla Carbon source	Kwas mlekowy [g/l] lactic acid		L(+) kwas mlekowy [g/l] L(+) lactic acid		L(+)/D(-)	
	przedział* range	wartości średnie mean level	przedział* range	wartości średnie mean level	przedział* range	wartości średnie mean level
Raftiline® HP	0,47-1,59	1,06	0,29-1,19	0,70	1,03-4,28	2,16
Raftiline® ST	1,46-2,68	2,15	0,98-1,94	1,64	1,27-9,50	4,22
Inulina Inulin	0,34-2,30	1,29	0,23-1,98	0,96	1,03-7,00	3,17
Raftilose® P95	1,0-3,56	2,37	0,83-2,81	1,73	1,27-7,46	3,35
Raftilose® L60	4,20-10,05	6,25	2,81-6,41	4,38	1,43-4,26	2,66
Glukoza Glucose	5,23-19,21	10,09	3,79-15,29	7,69	1,66-7,43	3,71
Galaktoza Galactose	6,20-13,70	8,42	3,71-10,73	6,22	1,49-7,16	3,37
Fruktoza Fructose	5,78-16,24	8,96	4,42-13,74	6,90	2,08-5,50	3,37
Laktoza Lactose	7,04-13,90	9,14	5,13-11,80	7,04	2,04-6,03	3,57
Sacharoza Sucrose	8,11-13,00	9,96	4,92-9,36	6,09	1,07-2,77	1,70

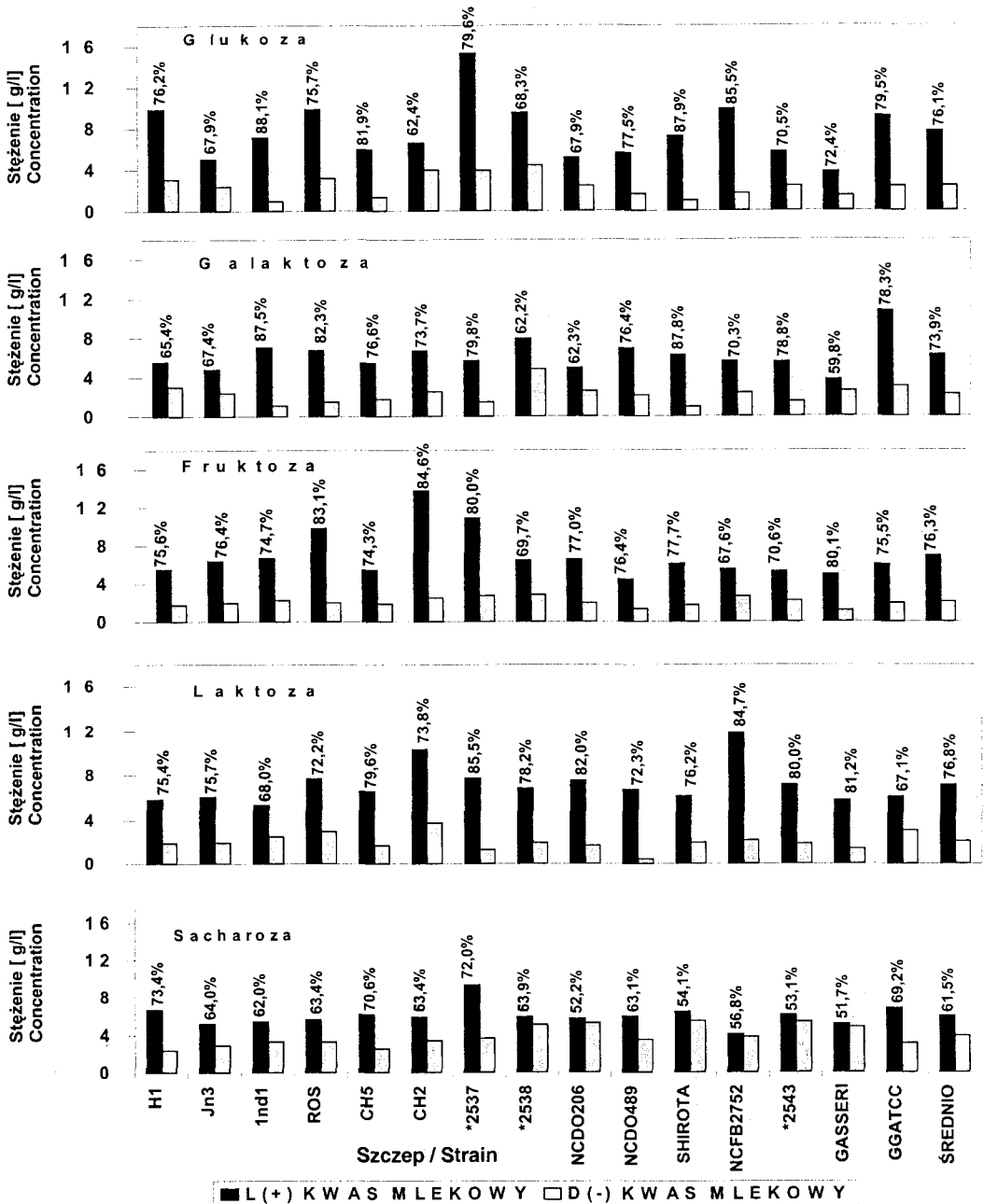
zależnie od szczepu / depending on the strain

Zdaniem Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), szczepy wyselekcjonowane do sporządzania produktów fermentowanych powinny być zdolne do produkcji co najmniej 50–60% formy L(+) kwasu mlekowego. Izomer ten jest całkowicie metabolizowany w organizmie człowieka, podczas gdy izomer D(-) bardzo słabo, a nadmierne jego spożycie może powodować metaboliczne nieprawidłowości [1]. Należy jednak zwrócić uwagę, że forma D(-) kwasu mlekowego pełni również ważną funkcję dietetyczną, ponieważ odznaczając się słabą przyswajalnością przez organizm przechodzi z treścią do dalszych odcinków jelita obniżając pH, które hamuje rozwój patogenów [7].



Rys. 1. Produkcja kwasu mlekowego i jego izomeru L(+) przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w podłożu zawierającym preparaty inuliny i oligofruktozy.

Fig. 1. Production of lactic acid and its isomer L(+) by *Lactobacillus* strains in a medium containing inulin and oligofruktose.



Rys. 2. Produkcja kwasu mlekowego i jego izomeru L(+) przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w podłożu zawierającym mono- i disacharydy.

Fig. 2. Production of lactic acid and its isomer L(+) by *Lactobacillus* strains in a medium containing mono- and disaccharides.

Badane szczepy *Lactobacillus acidophilus* wytwarzały, niezależnie od zastosowanego źródła węgla, zalecane przez WHO ilości formy L(+) kwasu mlekowego. Badania Nahaisi [5] wykazały, że badane przez niego szczepy *Lactobacillus acidophilus* produkowały od 0% do 10% formy D(-) kwasu mlekowego, natomiast Żbikowski [7], stosując mieszane kultury *Lactobacillus acidophilus* wykazał od 19,7% do 23,2% tej formy kwasu mlekowego.

Można więc stwierdzić, że zastosowanie inuliny (preparaty Raftiline[®]HP oraz Raftiline[®]ST) oraz fruktooligosacharydów (preparaty Raftilose[®]P95 oraz Raftilose[®]L60) miało wpływ głównie na aktywność kwasotwórczą badanych szczepów, w mniejszym natomiast stopniu na proporcję izomerów kwasu mlekowego.

Produkcja żywności z dodatkiem LAB i prebiotyków wymaga stosowania takich szczepów bakterii i sacharydów, które zapewniają gromadzenie głównie kwasu L(+) mlekowego. Badania wykazały znaczną zmienność szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i dowiodły konieczności selekcji kultur o wysokiej aktywności dehydrogenazy L-mleczanowej oraz wskazały, które z nich mogą być wykorzystane w produkcji żywności fermentowanej.

Wnioski

1. Rodzaj źródła węgla miał dla większości badanych szczepów istotny wpływ na aktywność kwasotwórczą, w mniejszym natomiast stopniu zmieniał proporcję izomerów kwasu mlekowego.
2. Ilość kwasu mlekowego wytworzonego przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w pożywce MRS zawierającej fruktooligosacharydy wynosiła średnio 2,62 g/l i była znacznie niższa niż w pożywkach z mono- lub disacharydami (9,31 g/l).
3. Średnia ilość L(+) kwasu mlekowego wyniosła od 0,70 g/l (w podłożu z Raftiline[®]HP) do 7,69 g/l (w podłożu z glukozą).
4. Stosunek izomeru L(+) do izomeru D(-), w przypadku hodowli z wykorzystaniem fruktooligosacharydów jako źródła węgla, wynosił średnio 3,11, a przy wykorzystaniu cukrów prostych 3,14.
5. Niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wykazywały dość dużą elastycznością w przystosowaniu się do różnych źródeł węgla, np. *Lb. acidophilus* H1, czy *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53105. Szczepy te cechowały się bardzo dobrą aktywnością kwasotwórczą niezależnie od zastosowanego cukru.

Literatura

- [1] Gurr M.I.: Nutritional aspects of fermented milk products. FEMS Microbiol. Rev., **46**, 1987, 337.
- [2] Jankiewicz M.: Zastosowanie kwasu mlekowego i jego pochodnych. PTTŻ, Oddział Wielkopolski, Poznań 1995.

- [3] Kurman J.A.: Therapeutic properties of fermented milks. ed. Elsevier Applied Sci. London, 1991, 117.
- [4] Nahaisi M.H.: *Lactobacillus acidophilus*: Therapeutic properties, products and enumeration, in "Developments In Food Microbiology" (ed R.K. Robinson). Elsevier Applied Sci. Publisher, 1986, 153.
- [5] Rutkowski A.: Stosowanie kwasu mlekowego i jego pochodnych w świetle ustawodawstwa. Przem. Spoż., 3, 1998, 3.
- [6] Warchalewski J.R.: Kwas mlekowy w przemianach biochemicznych i jego praktyczne zastosowanie w przemyśle spożywczym. Przem. Spoż., 7, 1998, 40.
- [7] Żbikowski Z.: Badania nad zastosowaniem *Bifidobacterium bifidum* i *Lactobacillus acidophilus* do produkcji jogurtu. Zesz. Nauk. ART. Olsztyn, Technologia Żywności, 16, 1981, 1.

AN OPTICALLY ACTIVE FORM OF LACTIC ACID PRODUCED BY *LACTOBACILLUS* STRAINS IN A MEDIUM CONTAINING VARIOUS SOURCES OF CARBON

S u m m a r y

The goal of the research was to evaluate the effects of inulin (Raftiline®) and fructooligosaccharides (Raftilose®) on the production of lactic acid and its isomers by *Lactobacillus* strains. Control cultures were grown in the presence of monosaccharides (glucose, galactose, fructose) and disaccharides (lactose, sucrose). The levels of L(+) and D(-) lactic acids were evaluated using the enzymatic tests of Boehringer Mannheim.

It was found that the amount of lactic acid produced by *Lactobacillus* strains in MRS medium with fructosaccharides was 2.62 g/l on the average, which was much less than in the case of using media with mono – or disaccharides (9.31 g/l). The average amount of L(+) lactic acid varied from 0.70 g/l (in the medium with Raftiline®HP) to 7.69 g/l (in the medium with glucose). The ratio of isomer L(+) to isomer D(-) in the medium with fructooligosaccharides was 3.11 on the average, while in the medium with monosugars it was 3.14. ☒