

Henryk Bartoń¹, Kornelia Indyka¹, Maria Folta¹, Joanna Chłopicka¹,
Elżbieta Karczewska², Iwona Skiba-Kurek², Alicja Budak²

WPLYW MANGANU(II) NA PRZEBIEG FERMENTACJI MLEKOWEJ MAKI ŻYTNIEJ

¹ Pracownia Biopierwiastków, Zakład Bromatologii,
Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Kierownik: dr hab. P. Zagrodzki

² Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. A. Budak

*Celem pracy było zbadanie wpływu dodatku jonów manganu(II) na przebieg fermentacji mlekowej z użyciem naturalnych bakterii wyhodowanych z maki żytniej. Bakterie zostały zidentyfikowane jako *Lactobacillus buchneri*. Fermentację prowadzono przez 2 tygodnie w temp. 30°C, monitorując objętości wytwarzanych gazów, kwasowość całkowitą, pH oraz aktywność antyoksydacyjną. Dodatek manganu spowodował wzrost wytwarzania gazów i pH, natomiast obniżył znacznie kwasowość całkowitą, a na aktywność antyoksydacyjną wpływał umiarkowanie dodatnio. Wyniki te wskazują na modyfikację metabolizmu i dynamiki przez bakterie w obecności manganu.*

Hasła kluczowe: probiotyki, *Lactobacillus buchneri*, fermentacja mlekowa, żywność funkcjonalna, mangan.

Key words: probiotics, *Lactobacillus buchneri*, lactic acid fermentation, functional food, manganese.

Rola prawidłowej mikroflory jelit w utrzymaniu zdrowia człowieka została ostatecznie udokumentowana w badaniach poznania ludzkiego mikrobiomu (1). Skład mikrobiomu przewodu pokarmowego ulega modyfikacji w przebiegu wielu schorzeń, szczególnie w chorobach o nieustalonej etiologii (np. nieswoiste zapalenia jelit, zaburzenia autystyczne) (2). Podlega on też zmianom zależnym od rodzaju diety i pochodzenia żywności. Głównym siedliskiem mikroflory przewodu pokarmowego u człowieka jest jelito kręte i okrężnica (3,4).

Bakterie rodzaju *Lactobacillus* (*L.*) nie zawierają katalazy umożliwiającej neutralizację H₂O₂, dlatego są w znacznym stopniu odporne na ten utleniacz. Niektóre typy *L.* magazynują duże ilości manganu, który odgrywa rolę pseudokatalazy. Bakterie rodzaju *L.* są zdolne do wychwytu również innych metali ciężkich, dlatego podejmowane są badania w celu ich wykorzystania do detoksykacji wody oraz żywności z metali toksycznych, w tym także w warunkach *in vivo* (5).

Mangan odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu organizmu człowieka jako składnik enzymów biorących udział, między innymi, w syntezie proteoglikanów (tkanka

łączna, chrząstka) i w ochronie antyoksydacyjnej w postaci mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD). Mangan jest powszechnie obecny w żywności, dlatego nie jest obserwowany populacyjny niedobór tego mikroelementu (6). Przewodzone są jednak badania, obejmujące tak zapotrzebowanie, jak i niedobory u ludzi w różnych schorzeniach. Granice bezpieczeństwa jego spożycia, a w szczególności nadmiar manganu, jest przedmiotem uwagi ze względu na jego neurotoksyczność, zwłaszcza w związku z ryzykiem nadmiernego obciążenia tym pierwiastkiem noworodków i dzieci (7). Stężenie Mn jest ustawowo ograniczane w wodzie dostarczanej ludności i wodach handlowych przeznaczonych do spożycia (50 mikrogramów/L) (8). Wzrost zainteresowania suplementami diety nasuwa pytania dotyczące suplementacji mikroelementami, w tym manganem, stosowanym jako dodatek do innych suplementów diety (np. glukozamina + mangan).

Jako kontynuację badań nad wpływem mikroelementów na proces fermentacji mlekowej produktów roślinnych przedstawiamy obecnie pracę, której celem była wstępna ocena wpływu dodatku manganu w różnych stężeniach na przebieg fermentacji mlekowej mąki żytniej prowadzonej z użyciem naturalnej kultury bakterii rodzaju *Lactobacillus* (9–11).

MATERIAŁ I METODY

Materiał: Do badań zastosowano mąkę żytnią z pełnego przemiału z regionu podkarpackiego (2011 r.) i bakterie wyhodowane z tej mąki. Próbkę zawierającą wyhodowane bakterie poddano propagacji na drodze cyklicznej fermentacji inokulowanej mąki do uzyskania stanu stacjonarnego.

Odczynniki: Glicynian manganu(II) otrzymano w wyniku reakcji stechiometrycznych ilości siarczanu manganu(II) i zobojętnionej NaOH glicyny (11).

Monitorowanie fermentacji: Reaktory biologiczne do hodowli beztlenowej użyto do fermentacji i ciągłego pomiaru objętości wytwarzanych gazów oraz pobierania próbek (10). Objętość wytworzonych gazów mierzono w cylindrach miarowych, pojemność kwasową oznaczono metodą miareczkowania alkacymetrycznego 0,1 M NaOH wobec błękitu bromotymolowego, pomiaru pH dokonano za pomocą pehametru laboratoryjnego (CyberScan pH 510, Eutech Instruments), aktywność antyoksydacyjną oznaczono spektrofometrycznie w mikroplótkach (Synergy 2/Biotek, USA) w temp. 25°C metodą ABTS po 30-minutowej inkubacji w wodnym buforze pH 7,4 i DPPH po 60 min. inkubacji w metanolewym roztworze buforu octanowego. Wyniki z obu metod analitycznych wyznaczono metodą ekstrapolacji do stężenia zero i wyrażono w postaci równoważników troloksu (12).

Fermentacja: Mieszaniny 30 g drobnej frakcji mąki żytniej, 40 ml zakwasu starterowego i 0,2 L wody, umieszczono w cieplarni (30°C) na 24 h. Do reaktorów dodano kolejno wzrastające ilości glicynianu manganu(II) odpowiadające 0, 10, 20 oraz 40 mg manganu na 100 g mąki oraz uzupełniono glicynianem sodu do uzyskania jednakowego stężenia glicyny i uzupełniono wodą do objętości 0,3 L, podłączono do przewodów i wypełniono argonem. Proces fermentacji prowadzono w temperaturze 30°C przez dwa tygodnie. próbki pobrane w trakcie fermentacji (10 mL) odwirowano i zamrożono do czasu analizy.

Identyfikacja bakterii: Badania wykonano za pomocą testu API (ang. Analytical Profile Index) określającego profil metabolizmu cukrów (13).

Opracowanie wyników: W celu standaryzacji uzyskane wyniki wyrażono w przeliczeniu na 100 g mąki użytej do fermentacji.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wartości parametrów monitoringu próby kontrolnej (bez dodatku manganu) w czasie dwutygodniowej fermentacji zawiera tabela I. Wzmożoną produkcję gazów obserwowano w ciągu początkowych dwu dni fermentacji. W próbie kontrolnej produkcja gazów po 2 tygodniach podwoiła się i wyniosła 200 mL/100g mąki.

Tabela I. Wartości parametrów kontrolnej fermentacji mąki żytniej w trakcie 2-tygodniowego monitorowania procesu

Table I. Parameter values of control fermentation of rye meal during two-week's process monitoring

Dzień fermentacji	Gazy mL/100g	pH	Kwasowość ogólna mmol/100g	DPPH (25°C, 30') $\mu\text{M Trx}/100\text{g}$	ABTS (25°C, 60') $\mu\text{M Trx}/100\text{g}$
0	0	3,48	45	38	89
1	83	3,41	94	44	111
2	107	3,49	68	29	102
3	140	3,50	65	32	114
5	140	3,56	78	36	121
7	173	3,59	88	50	129
13	200	3,63	105	49	179

* dane w przeliczeniu na 100 g mąki; Trx – równoważnik troloksu

Wskaźnik pH dla próby kontrolnej praktycznie ustalił się już w początkowym dniu fermentacji, a wartość końcowa po 2 tygodniach była wyższa tylko o 0,15. Oznacza to niewielką alkalizację mieszaniny, prawdopodobnie w wyniku rozkładu (np. dekarboksylacji) kwasów o wyższej mocy powstających w pierwszym etapie fermentacji lub wzrost stężenia zasadowych metabolitów buforujących.

Kwasowość ogólna i aktywność antyoksydacyjna (DPPH) osiągnęła wartość zbliżoną do końcowej już po pierwszym dniu fermentacji. Jednak aktywność antyoksydacyjna oznaczona metodą ABTS w drugim tygodniu znacząco wzrosła w tej próbie.

W próbach z dodatkiem manganu dodawane ilości Mn: 10, 20, 40 mg/100g mąki wielokrotnie przewyższały naturalną zawartość Mn w nasionach żyta 2,58 mg/100g (14). Wpływ dodatku manganu na badane parametry zestawiono w tabeli II.

W próbkach z dodatkiem manganu stwierdzono podwyższenie objętości wydzielonych gazów o 22–47%. Parametr pH wzrastał proporcjonalnie do stężenia manganu ($R^2=1,00$), natomiast kwasowość ogólna obniżała się wraz ze wzrostem stężenia manganu. Aktywność antyoksydacyjna DPPH wzrastała ze wzrostem stężenia manganu i znacząco wzrosła przy najwyższym stężeniu Mn.

Tabela II. Monitorowane parametry i ich zmiana po 2-tygodniowej fermentacji mąki żytniej z dodatkiem różnych ilości glicynianu manganu(II)

Table II. Monitored parameters and their changes after two-week fermentation of rye meal with addition of different amounts of manganese(II) glycinate

Parametr	Jednostki						
Dodatek Mn	mg/100g*	0	0	10	20	40	
		Wartość	Względny wpływ dodatku Mn				R ²
Gazy	mL/100g	200	0%	43%	47%	22%	0,06
pH	–	3,63	0%	6%	11%	22%	1,00
Kwasowość ogólna	mmol/100g	105	0%	–7%	–13%	–50%	0,94
DPPH	μM/100g	49	0%	10%	13%	83%	0,88
ABTS	μM/100g	179	0%	–5%	4%	26%	0,82

* w przeliczeniu na 100 g mąki; R² – współczynnik determinacji dla korelacji pomiędzy stężeniami dodanego manganu a względnymi zmianami parametrów wobec próby bez dodatku Mn

W celu dalszej analizy danych wyznaczono wskaźniki determinacji dla korelacji pomiędzy różnymi badanymi parametrami dla próby kontrolnej (A) i z najwyższym dodatkiem Mn (B) (tabela III).

Tabela III. Korelacje oznaczonych parametrów w czasie 2-tygodniowej fermentacji mąki żytniej bez dodatku Mn (A) i z dodatkiem glicynianu manganu(II) (B)

Table III. Correlations of estimated parameters during two-weeks fermentation of rye meal without Mn addition (A) and with addition manganese(II) glycinate (B)

A (0 mg Mn)	R ²				
Parametr	Gazy	pH	Kwasowość ogólna	DPPH	ABTS
Gazy	–	0,92	0,84	0,27	0,72
pH	0,92	–	0,94	0,19	0,61
Kwasowość ogólna	0,84	0,94	–	0,81	0,90
DPPH	0,27	0,19	0,81	–	0,45
ABTS	0,72	0,61	0,90	0,45	–
B (40 mg Mn)					
Gazy	–	0,86	0,51	0,32	0,76
pH	0,86	–	0,43	0,09	0,78
Kwasowość ogólna	0,51	0,43	–	0,44	0,21
DPPH	0,32	0,09	0,44	–	0,19
ABTS	0,76	0,78	0,21	0,19	–

Korelacje Pearsona dla parametrów monitoringu fermentacji dla grupy kontrolnej i mieszaniny o najwyższym stężeniu manganu zawiera tabela III. W korelacjach pominięto parametry początkowe monitorowania fermentacji ze względu na brak ustalenia się jeszcze równowagi pomiędzy fazą stałą a wodną, na co wskazywały duże odchylenia od wartości spodziewanych. Wszystkie korelacje były dodatnie.

Ogólnie, korelacje parametrów dla próby kontrolnej były silniejsze od prób z dodatkiem manganu. Najwyższe współczynniki determinacji wykazała korelacja par pH i kwasowość ogólna oraz pH i objętość gazów w próbie kontrolnej, natomiast w próbie z dodatkiem manganu (B) tylko korelacja pH z objętością gazów. Uwzględniając fakt, że wykładnik pH jest liczbowo miarą alkaliczności, wydzielanie gazów i wzrost pH można interpretować jako spowodowane równoległym zachodzeniem dekarboksylacji kwasów i w konsekwencji wzrostem alkaliczności. Na proces ten nie wpływa znacząco obecność manganu, co widoczne jest z danych w tabeli II. W próbie kontrolnej pH skorelowane jest silnie z kwasowością, co oznacza produkcję słabszych kwasów w trakcie dalszej fermentacji, niż wytworzonych początkowo. Dodatek manganu znacznie osłabia tę korelację.

Aktywność antyoksydacyjna ABTS (oraz DPPH) była skorelowana z kwasowością ogólną w próbie kontrolnej, ale korelacje te zostały znacząco osłabione przy dodatku manganu. Mangan jest pierwiastkiem przejściowym zdolnym do uczestniczenia w reakcjach redox (np. Fentona), zwłaszcza w niższych stężeniach. Wyniki przedstawione w tabeli II dotyczące wpływu Mn na aktywność antyoksydacyjną potwierdzają taką interpretację w odniesieniu do ABTS. Wpływ wysokiego stężenia Mn na wzrost aktywności antyoksydacyjnej wymaga jednak odrębnego wyjaśnienia. Hipotetycznie bakterie mogły zwiększyć aktywność enzymów antyoksydacyjnych z udziałem manganu, co mogło ochraniać antyoksydanty egzogenne obecne w środowisku fermentacyjnym.

Wyniki wskazały, że dodatek jonów manganu powoduje ograniczenie wytwarzania kwasów jako metabolitów, wzrost wytwarzania gazów oraz umiarkowany wzrost aktywności antyoksydacyjnej. Obserwowany wzrost aktywności antyoksydacyjnej był znaczny przy najwyższym stężeniu Mn. Wyniki wskazują na przyspieszenie i modyfikację metabolizmu bakterii przez dodatek manganu. Wzrost aktywności antyoksydacyjnej wywołany dodatkiem manganu wymaga wyjaśnienia.

H. Bartoń, K. Indyka, M. Fołta, J. Chłopicka, E. Karczewska,
I. Skiba-Kurek, A. Budak

INFLUENCE OF MANGANESE(II) ON LACTIC ACID FERMENTATION OF RYE MILL

Summary

The aim of the study was to investigate the effect of the addition of the manganese ions (II) on the fermentation of lactic acid with natural bacteria grown from rye flour. The bacteria were identified as *Lactobacillus buchneri*. The fermentation was carried out for two weeks at 30°C, while monitoring the volume of produced gas, a total acidity, pH, and antioxidant activity. The addition of manganese caused the increase in the production of gases and pH, and significantly reduced the total acidity, while the antioxidant activity was moderately positively affected. These results indicate a modification of metabolism of the bacteria and its dynamic in the presence of manganese.

PIŚMIENNICTWO

1. Radwan P., Radwan-Kwiatek K., Skrzydło-Radomańska B.: Rola mikroflory jelitowej w nieswoistych zapaleniach jelit. *Przeegl. Gastroenterol.*, 2009; 4(1): 1-6. – 2. Benach L.J., Li E., McGovern M.M.: A microbial association with autism. *M. Bio.*, 2012; 3(1): 1-3. – 3. Szewczyk K.: Wpływ dodatku miedzi

i cynku na fermentację mlekową mąki żytniej, w tym na metabolity kwasowe, aktywność antyoksydacyjną i solubilizację składników mineralnych. Praca Magisterska, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków, 2012. – 4. *Fortuna M.*: Właściwości antyoksydacyjne kwasu chlebowego i wybranych produktów fermentowanych. Praca Magisterska, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków 2011. – 5. *Mrvičić J., Stanzer D., Stolic E., Stehlik-Tomas V.*: Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012; 28: 2771-2782. – 6. *Bolesławska I., Maruszewska M., Przysławski J.*: Ocena spożycia wybranych mikropierwiastków występujących w całodziennych racjach pokarmowych kobiet i mężczyzn z regionu Wielkopolski. *Now. Lek.*, 2005; 74(4): 366-368. – 7. *Milatovic D., Zaja-Milatovic S., Gupta R. C., Yu Y., Aschner M.*: Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2009; 240: 219-225. – 8. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2015 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, Dz.U. 2015, poz. 1989. – 9. *Szewczyk K., Sitek A.*: The effect of addition of copper and zinc on quantitative and qualitative composition of the organic acids produced during lactic acid fermentation of rye flour. *Przeegl. Lek.*, 2013; 70(Supl. 1): 22. – 10. *Bartoń H., Fortuna M., Folta M., Chłopicka J.*: Wpływ procesu fermentacji mlekowej na stężenie cynku i miedzi w zakwasach uzyskanych z przetworów różnych rodzajów zbóż i pseudozbóż. *Brom. Chem. Toksykol.*, 2015; 48(3): 229-235.

11. *Podkowa K, Bartoń H, Folta M., Dobrowolska-Iwanek J.*: Wpływ dodatku kompleksu chelatowego miedzi z glicyną na zawartość kwasów organicznych powstających w wyniku procesu fermentacji mąki żytniej. *Brom. Chem. Toksykol.*, 2014; 47(3): 681-686. – 12. *Barton H. J.*: A “zero sample concentration approach”. Standardization of methods for the estimation of total antioxidant activity by the use of extrapolation to zero sample concentration. A novel standard. Part 1. ABTS cation radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.*, 2010; 58(16): 8918-8926. – 13. Analytical Profile Index: API® 50 CH. <http://www.biomerieux.pl>. – 14. USDA Search for Widows, v.1, database v. SR24(<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>).

Adres: ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków