

*Dorota Zaręba, Małgorzata Ziarno*

## WPLYW CZASU HODOWLI NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH *LB. RHAMNOSUS* GG I *LB. ACIDOPHILUS* LA-5 W ASPEKCIE CHEMOTAKSONOMICZNEJ IDENTYFIKACJI\*

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności  
Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie,  
Kierownik: prof. dr hab. *M. Gniewosz*

*Celem badań było wykazanie różnic w profilu kwasów tłuszczowych biomasy hodowanej przez 24 godz. i 48 godz. w temp. 37°C, na przykładzie *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 i *Lb. acidophilus* LA-5. Analiza ilościowa wykazała różnice w zawartości poszczególnych kwasów między badanymi szczepami. Do wykazania wpływu czasu inkubacji na możliwości chemotaksonomicznego różnicowania bakterii fermentacji mlekowej wykorzystano chemometryczną analizę składowych głównych (PCA). Analiza ta wykazała brak istotnego wpływu czasu inkubacji na chemotaksonomiczne różnicowanie badanych szczepów.*

Hasła kluczowe: LAB, kwasy tłuszczowe, GC-MS.

Key words: LAB, fatty acids, GC-MS.

Podstawowym źródłem kwasów tłuszczowych wchodzących w skład komórki bakterii fermentacji mlekowej jest błona cytoplazmatyczna. Skład profilu kwasów błony cytoplazmatycznej zależy od wielu czynników środowiskowych, do których należą m.in. temperatura, pH, ciśnienie osmotyczne, dostęp do składników odżywczych i czas inkubacji. Bakterie fermentacji mlekowej wykazują zdolność syntezy kwasów tłuszczowych o długości łańcucha węglowego od C12 do C21. Wśród dominujących kwasów w profilu kwasów tłuszczowych biomasy LAB wymienić można: C16:0, C18:1 i cyc C19:0 (1, 2). Ustalenie różnic w składzie kwasów tłuszczowych poszczególnych gatunków bakterii fermentacji mlekowej wymaga zastosowania optymalnych warunków inkubacji pozwalających na uzyskanie odtwarzalnych wyników profilu kwasów tłuszczowych.

Celem niniejszych badań było sprawdzenie, czy skrócenie czasu hodowli z 48h do 24h wpłynie na profil bakteryjnych kwasów tłuszczowych i na ich chemotaksonomiczne różnicowanie.

### MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były monokultury: *Lb. acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen), *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103. Wymienione szczepy były namnażane na MRS agar (Merck) przez 24h i przez 48h w temp. 37°C. Do ekstrakcji kwasów tłuszczowych pobierano 40-50 mg biomasy. Biomagę poddawano procesowi zmydlenia lipidów

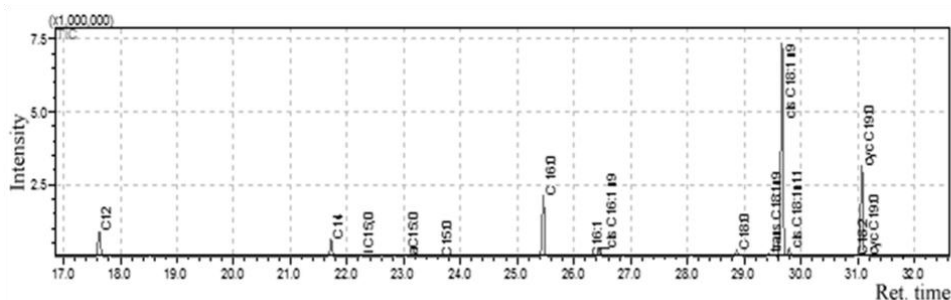
\* Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2010-2012 jako projekt badawczy nr N N312 121739.

w roztworze zmydlającym (NaOH : metanol : woda), ogrzewano w temp. 100°C przez 30 min. W następnej kolejności prowadzono metylację (HCl : metanol) w temp. 80°C przez 10 min. Estrы metylowe ekstrahowano przy użyciu mieszanki heksanu i eteru metylowego tert-butyłu. Warstwę górną przemywano wodnym roztworem NaOH i wodą, a następnie przenoszono do mikrofiolki chromatograficznej. Charakterystykę jakościową i ilościową kwasów tłuszczowych wykonywano metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Rozdział chromatograficzny estrów metylowych kwasów tłuszczowych prowadzono w kolumnie polarnej Quadrex 007-23 (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm). Próbkę nastrzykiwano w trybie dzielnikowym przy stosunku podziału 1 : 25 w temp. dozownika 230°C. Rozdział chromatograficzny przebiegał w następujących warunkach GC: temp. początkowa kolumny 60°C, izoterma 2 min, wzrost temp. o 3°C/min do 220°C, izoterma 1 min. Gazem nośnym był hel o przepływie 0,75 cm<sup>3</sup>/min. Stosowano następujące warunki pracy MS: temp. źródła jonów 200°C, temp. linii łączącej GC z MS 200°C, jonizacja elektronami o energii 70 eV, napięcie detektora 1,3 kV, zakres przemieszczania filtru kwadrupolowego 50-400 m/z. Identyfikacji kwasów tłuszczowych dokonano przy wykorzystaniu standardu wewnętrznego BAME (Sigma) oraz bibliotek WILEY7N2, NIST147 i PAL600K. Do analizy statystycznej wykorzystywano pakiet Statistica 8.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

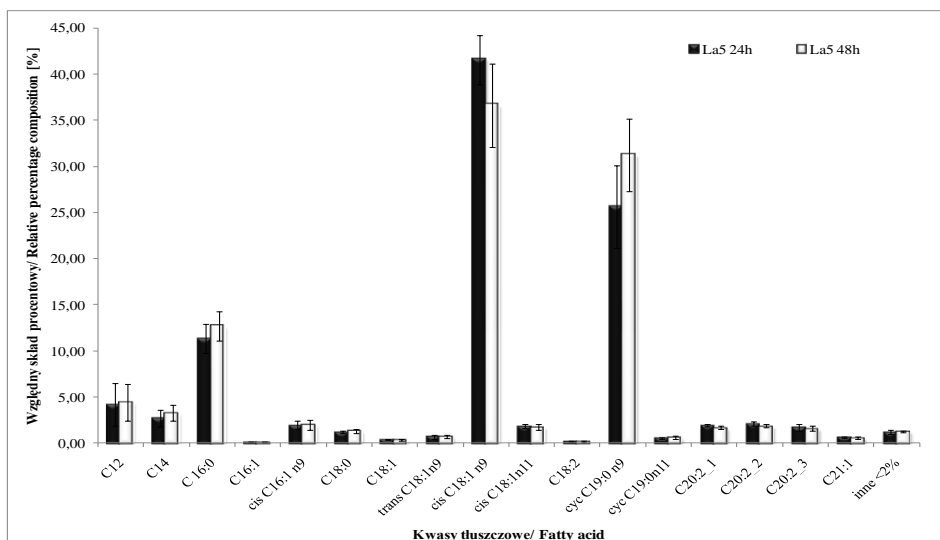
Przeprowadzone doświadczenia wykazały różnice w zawartości kwasów tłuszczowych między *Lb. acidophilus* LA-5 i *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53130. Kompozycja składu kwasów tłuszczowych biomasy *Lb. acidophilus* LA-5 zawierała następujące rodzaje kwasów: C12:0, C14:0, iC15:0, aC15:0, C15:0, C16:0, C16:1, C18:0, trans C18:1n9, cis C18:1n9, C18:2, cyc-C19:0n9, cyc-C19:0n11, C20:2 oraz C21:1 (ryc. 1). Dominujące związki zidentyfikowano jako kwas oleinowy (cis C18:1n9), kwas sterkulinowy (cyc-C19:0n9) i kwas palmitynowy (C16:0), których względna koncentracja wynosiła odpowiednio: 41,53% ± 2,66, 31,26 ± 3,94, 12,72% ± 1,62 (ryc. 2). Obecność wszystkich wymienionych powyżej kwasów u *Lb. acidophilus* RD758 wykazali także inni badacze (3, 4). Hodowla 24h i 48h godzinna *Lb. acidophilus* LA-5 nie wykazały istotnych różnic w zawartości udziałów poszczególnych kwasów (ryc. 2).

W przypadku szczepu *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 stwierdzono obecność kwasów: C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, 2OH-C12:0, cyc-C17:0, C18:0, trans C18:1n9, cis C18:1n9, cyc-C19:0n9, cyc-C19:0n11, C20:2 oraz C21:1 (ryc. 3). Najwyższy udział oznaczono dla kwasów: C16:0, cyc-C19:0n9, trans C18:1n9, cyc-C19:0n11 oraz cis C18:1n9. Udział izomerów kwasów C18:1 i cyc C19:0 na podobnym poziomie w profilu *Lb. rhamnosus* GG wykazali *Kankaanpaa* i współpracownicy (5).



Ryc. 1. Profil kwasów tłuszczowych lipidów *Lb. acidophilus* LA-5.

Fig. 1. Fatty acid composition of lipids of *Lb. acidophilus* LA-5.

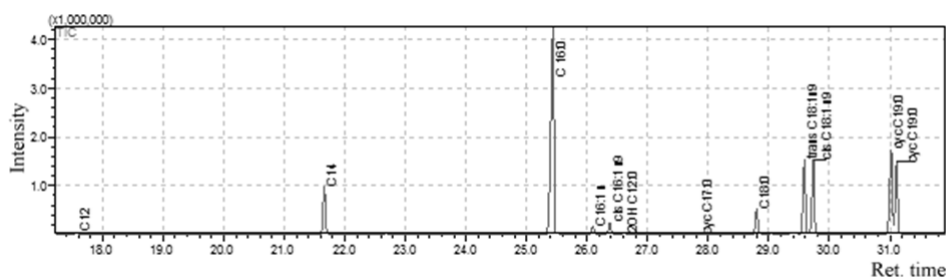


Ryc. 2. Zmiana względnych udziałów procentowych kwasów tłuszczowych w profilu komórek *Lb. acidophilus* LA-5 w zależności od czasu hodowli.

Fig. 2. The changes of relative percentage composition lipids of *Lb. acidophilus* LA-5 cells according to culturing time.

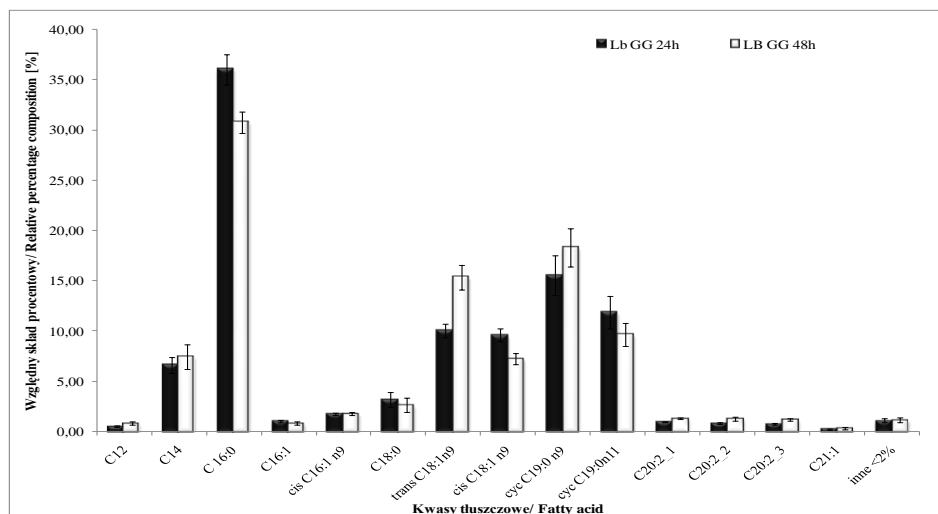
Względny udział procentowy tych kwasów zależał od czasu inkubacji i tak w przypadku 24h inkubacji w 37°C wynosił odpowiednio: 36,04 ± 1,52, 15,55 ± 1,97, 10,04 ± 0,70, 11,86 ± 1,64, 9,58 ± 0,64 (ryc. 4). Z kolei po 48h inkubacji w 37°C wykazano statystycznie istotne (p-value=0,00), w stosunku do krótszego czasu hodowli, zróżnicowanie udziału w ogólnym profilu kwasów: C16:0, trans C18:1n9 oraz cis C18:1n9, których względna wartość udziałów wynosiła odpowiednio: 30,74% ± 1,08, 15,34% ± 1,23, 7,23% ± 0,58 (ryc. 4). Zaobserwowane różnice miały swoje odzwierciedlenie w istotnym wzroście stosunku kwasów

nienasyconych do nasyconych (z 1,24 do 1,50) po wydłużeniu czasu inkubacji do 48h. Podobne obserwacje opisali *Béal* i współpr. (6) na przykładzie *Str. thermophilus* CFS2. Z kolei *Veerkamp* i współpr. (7) analizując wpływ fazy wzrostu logarytmicznego u 9 gatunków z rodzaju *Lactobacillus* również wykazali zmniejszenie udziału nasyconych kwasów tłuszczowych z towarzyszącym im wzrostem udziału kwasów oleinowego, laktobacylowego i jednoczesnym efektem wydłużania łańcucha kwasów tłuszczowych.



Ryc. 3. Profil kwasów tłuszczowych lipidów *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103.

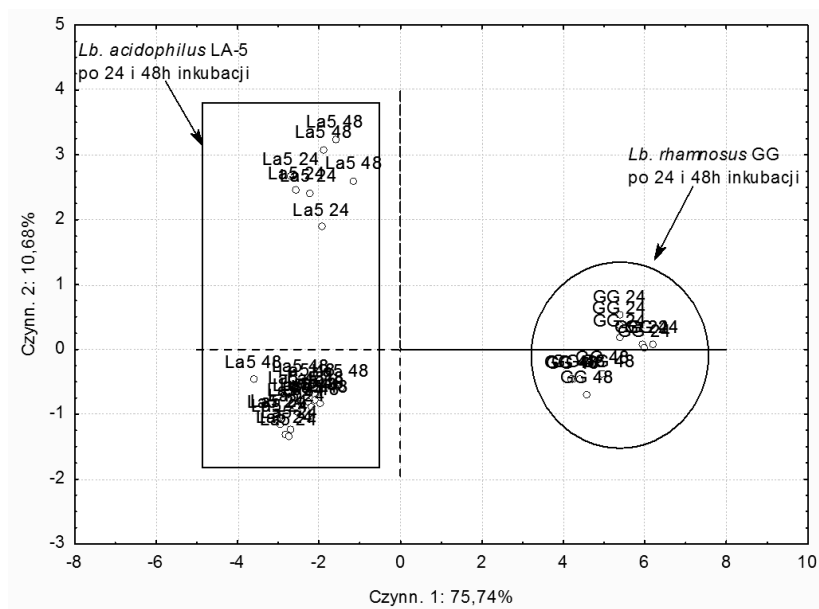
Fig. 3. Fatty acid composition of lipids of *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103.



Ryc. 4. Zmiana względnych udziałów procentowych kwasów tłuszczowych w profilu monokultury *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 w zależności od czasu hodowli.

Fig. 4. The changes of relative percentage composition lipids of *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 cells according to culturing time.

Do wykazania wpływu czasu inkubacji biomasy w aspekcie chemotaksonomicznego różnicowania gatunkowego posłużono się analizą składowych głównych (PCA). Analiza PCA (ryc. 5) pozwoliła na pogrupowanie wyników według gatunku badanych LAB. Grupa wydzielona po prawej stronie rycina 5 charakteryzuje się wysoką dodatnią korelacją (0,87-0,97) pierwszej składowej głównej (Czyn. 1) z kwasami: C14:0, C16:0, C18:0, trans C18:1n9 oraz cys C19:0n11 charakterystycznymi dla szczepu *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103.



Ryc. 5. Rozkład przypadków w układzie dwóch składowych głównych tłumaczących całkowitą zmienność układu w 86,42%. Objaśnienia: La5 24 - *Lb. acidophilus* La-5 po 24h, La5 48 - *Lb. acidophilus* La-5 po 48h, GG 24 - *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 po 24h, GG 48 - *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 po 48h inkubacji.

Fig. 5. The distribution of cases in system of two principal components accounting for 86,42% variance in total. Legend: La 5 24 - *Lb. acidophilus* La-5 after 24h, La 5 48 - *Lb. acidophilus* La-5 after 48h, GG 24 - *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 after 24h, GG 48 - *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 after 48h incubation.

Dwie grupy po lewej stronie rycina 5 to wynik dla szczepu *Lb. acidophilus* LA-5, charakteryzujące się wysoką ujemną korelacją (0,73-0,96) z kwasami: C16:1, cis C18:1n9, C18:1n11, C12:0 oraz C20:2. Rozkład dwóch pierwszych składowych głównych pozwolił zróżnicować przypadki wg gatunków i jednocześnie nie wykazał istotnego grupowania według czasu ich inkubacji. Béal i wspólr. (6) opisali brak zmian stosunku kwasów nienasyconych do nasyconych w czasie 49 dni przechowywania

biomasy. Pozwala to wnioskować o braku wpływu czasu hodowli na modyfikację profilu kwasów tłuszczowych umożliwiającego różnicowanie chemotaksonomiczne.

## WNIOSKI

1. Nie wykazano wpływu czasu inkubacji na chemotaksonomiczne różnicowanie analizowanych szczepów w oparciu o profil kwasów tłuszczowych, co pozwala wnioskować, że nie ma potrzeby wydłużania inkubacji w aspekcie chemotaksonomicznego różnicowania.

2. Przeprowadzone badania umożliwiły zróżnicowanie według szczepu *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 i szczepu *Lb. acidophilus* LA-5 na podstawie względnych udziałów kwasów tłuszczowych w ich biomasach.

D. Zaręba, M. Ziarno

INFLUENCE OF THE INCUBATION TIME ON THE FATTY ACIDS PROFILE OF *LB. RHAMNOSUS* GG AND *LB. ACIDOPHILUS* LA-5 IN CHEMOTAXONOMIC DIFFERENTIATION

### Summary

The aim of the research was to show the differences in the fatty acids profile of the biomass grown for 24h or 48h at 37°C, on the example of *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 and *Lb. acidophilus* LA-5. The quantitative analysis showed a difference in the content of each fatty acid between the investigated strains. The principal component analysis (PCA) was used to demonstrate the influence of the incubation time on the possibility of chemotaxonomic differentiation of lactic acid bacteria (LAB). This analysis showed the lack of essential influence of the incubation time on chemotaxonomic differentiation of investigated strains.

## PIŚMIENNICTWO

1. Guerzoni M.E., Lanciotti R., Cocconcelli P.S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. Microbiol., 2001; 147:2255-2264.- 2. Zaręba D. Analiza czynników warunkujących skład kwasów tłuszczowych błony komórkowej w aspekcie chemotaksonomicznej identyfikacji bakterii fermentacji mlekowej. Wydawnictwo Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, 2009; 725-732.- 3. Fernandez-Murga M.L., Font de Valdez G., Disalvo E.A. Effect of lipid composition on the stability of cellular membranes during freeze thawing of *Lactobacillus acidophilus* grown at different temperature. Arch. Biochem. Bioph., 2001; 388(2):179-184.- 4. Wang Y., Corrieu G., Béal C., Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. J. Dairy Sci., 2005; 88:21-29.- 5. Kankaampaa P., Yang B., Kallio H., Isolauri E., Salminen S. Effects of polyunsaturated fatty acids in growth medium on lipid composition and on physicochemical surface properties of lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol., 2004; 70(1):129-136.- 6. Béal C., Fonseca F., Corrieu G. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. J. Dairy Sci., 2001, 84:2347-2356.- 7. Veerkamp J.H. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. J. Bacteriol., 1971; 108(2):861-867.

Adres: 02-787 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159c.