# WPŁYW APLIKACJI PULSACYJNEGO POLA ELEKTRYCZNEGO NA BIOAKUMULACJĘ WYBRANYCH JONÓW METALI W KOMÓRKACH LACTOBACILLUS RHAMNOSUS B 442

# STRESZCZENIE

Istotnym problemem występującym w społeczeństwie jest zjawisko niedoboru pierwiastków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu, m.in. magnezu, cynku, selenu i wapnia. Jony tych metali mogą być pobierane przez komórki mikroorganizmów, stając się dla organizmu człowieka wysoce przyswajalnym kompleksami białkowymi. Powstające metaloproteiny są wchłaniane w jelicie cienkim analogicznie do białek i peptydów. Bakterie kwasu mlekowego z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* są powszechnie wykorzystywane do produkcji żywności ze względu na swoje zdolności do fermentowania produktów oraz właściwości prozdrowotne. Odpowiadają one m.in za utrzymanie odpowiedniej mikroflory jelit, zapobiegają powstawaniu ich stanów zapalnych oraz chronią przed zaburzeniami funkcjonowania przewodu pokarmowego. Dzięki zdolności do wychwytywania i wiązania jonów metali w procesach wymiany jonowej, kompleksowania, chelatowania i mikroprecypitacji mogą być wykorzystywane do wzbogacania żywności w niezbędne mikro- i makroelementy.

Działanie pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) polega na indukcji krótkich impulsów elektrycznych, w określonym czasie. W procesie elektroporacji odwracalnej, PEF indukuje przejściową przepuszczalność błony w wyniku, której powstają trwałe struktury (zazwyczaj nazywane “porami” lub „nanoporami”) ułatwiające wymianę składników z otoczeniem komórki. Odpowiednio zoptymalizowane parametry PEF (natężenie pola elektrycznego, czas trwania impulsu, liczba zastosowanych impulsów i częstotliwość) mogą wywoływać określone efekty powstające w układach biologicznych.

W dostępnej literaturze jest niewiele opublikowanych badań dotyczących bioakumulacji jonów metali w komórkach mikroorganizmów. Zazwyczaj analizowane są jony wprowadzane do pożywki, a następnie pobierane przez bakterie lub drożdże. W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej akumulacja był wspomagana poprzez pulsacyjne pole elektryczne, które zwiększało efektywność procesu.

We wstępnych badaniach dokonano wyboru odpowiedniego szczepu bakterii, do dalszych analiz, na podstawie ich dynamiki wzrostu. Sześć wybranych szczepów baterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Lactococcus* poddano inkubacji w studzienkach sterylnej mikropłytki, do których wprowadzano jony magnezu, cynku i selenu o zmiennych stężeniach. Najwyższą gęstością optyczną, w całym zakresie badanych stężeń jonów, wykazywał szczep *Lactobacillus rhamnosus* B 442, który wybrano do dalszych badań. W publikacjach **PI**, **PIII** i **PVII** przedstawiono wyniki dotyczące wpływu pulsacyjnego pola elektrycznego na bioakumulację jonów magnezu, cynku i wapnia w komórkach *Lactobacillus rhamnosus* B 442. W hodowlach traktowanych pulsacyjnym polem elektrycznym, w całym zakresie stosowanych stężeń (od 10 do 1000 μg Mg2+/ml pożywki), stwierdzono wyższą akumulację magnezu w komórkach w porównaniu z próbami kontrolnymi których nie traktowano PEF. Najwyższą akumulacją magnezu (2,13 mg Mg2+/g s.m.) charakteryzowała się hodowla *L. rhamnosus* B 442 z dodatkiem jonów Mg2+ o stężeniu 400 μg/ml pożywki, poddana działaniu PEF. Stężenie to przyjęto jako optymalne dla bioakumulacji magnezu w komórkach bakterii i wykorzystano do dalszych badań. Najwyższe nagromadzenie Mg2+ (4,28 mg/g s.m.) odnotowano po traktowaniu PEF 20 godzinnej hodowli oraz przy następujących parametrach procesu: natężeniu pola elektrycznego 2,0 kV/cm, szerokości pulsu 20 μs i 15 minutowym czasie ekspozycji pola (**PI**). Podczas kolejnego etapu badano wpływ PEF na bioakumulację jonów cynku w komórkach *L. rhamnosus* B 442. Najwyższą akumulację tego pierwiastka w komórkach stwierdzono przy stężeniu 500 μg Zn2+/ml pożywki. Najwyższą akumulację tego pierwiastka (2,85 mg Zn2+/g s.m) uzyskano poddając próby działaniu PEF o natężeniu pola 3,0 kV/cm, czasie ekspozycji 15 min, po 20 godzinach trwania hodowli i szerokości pulsu 20 µs (**PIII**). Następnie podjęto próby wzbogacenia *L. rhamnosus* B 442 w jony selenu. Stężenie powyżej 40 μg/ml spowodowało znaczne zahamowanie wzrostu bakterii, poniżej granicy oznaczalności jonów w stosowanej technice. Biorąc pod uwagę również żywotność *L. rhamnosus* 442 w obecności selenu, zdecydowano się nie kontynuować badań nad wzbogacaniem komórek w ten pierwiastek. Przeprowadzono natomiast analizę wpływu pulsacyjnego pola elektrycznego na akumulacje jonów wapnia w komórkach *L. rhamnosus* B 442. Zastosowanie zoptymalizowanych parametrów procesu (natężenie pola 3,0 kV/cm, czas ekspozycji 10 min, szerokość pulsu 75 μs), 20-godzinna hodowla po której traktowano komórki PEF oraz stężenie 200 µg/ml pożywki spowodowały najwyższą koncentrację jonów (7,30 mg/g s.m.) (**PVII**). Podczas każdego etapu badań oceniano przeżywalność bakterii, która była kształtowała się na wysokim poziomie co zostało opisane w publikacjach **PI**, **PIII** i **PVII**. Przeprowadzono również wizualizację akumulacji jonów w komórkach. Moryna w połączeniu z jonami cynku wykazywała silną zieloną fluorescencję, którą zaobserwowano wyraźnie w dystalnej i proksymalnej części komórek wzbogaconych cynk za pomocą PEF. Natomiast w odniesieniu do jonów wapnia zaobserwowano wyraźne różnice pomiędzy badanymi próbami. Komórki bakterii wzbogacone w wapń za pomocą PEF wykazywały intensywną fluorescencję, natomiast na zdjęciu komórek pochodzących z hodowli kontrolnej K2 fluorescencja dotyczyła tylko pojedynczych bakterii (**PVII**).

Wyniki badań jakim poddano lody wyprodukowane z użyciem potencjalnie probiotycznych bakterii wzbogaconych jonami magnezu, cynku i wapnia za pomocą pulsacyjnego pola elektrycznego zostały opisane w publikacjach **PII**, **PIV**, **PV** i **PVI**. Szczepy bakterii *Lactobacillus rhamnosus* B 442, *Lactobacillus rhamnosus* 1937, *Lactococcus lactis* JBB 500, wzbogacono jonami magnezu za pomocą pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF). Dodatek bakterii wzbogaconych jonami magnezu nie spowodował zmiany w badanych, chemicznych parametrach lodów oraz nie miał wpływu na proces ich zamrażania, topliwość i twardość. Nie wystąpiły istotnie statystycznie zmiany w parametrach barwy między badanymi próbami. Oznaczenia żywotności mikroorganizmów wykazały wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów w lodach w porównaniu z kulturami startowymi (**PII**). W następnym etapie badań *Lactobacillus rhamnosus* B 442 wzbogacono jonami cynku z zastosowaniem pulsacyjnego pola elektrycznego. Szczep ten dodawano do mieszanki i wykorzystano do produkcji dwóch rodzajów lodów: fermentowanych i niefermentowanych. PH lodów wynosiło 6,38- 6,41 (próby niefermentowane) i 5,97- 6,02 (próby fermentowane). Zaobserwowano różnice w niektórych właściwościach lodów fermentowanych i niefermentowanych. Pierwsze z nich miały niższą zawartość tłuszczu i niższą twardość. Natomiast lody niefermentowane charakteryzowała wyższa topliwość i adhezyjność. Żywotność bakterii była na wysokim poziomie. Produkty fermentowane charakteryzowały się wyższą ogólną liczbą drobnoustrojów (**PIV**). Następnie lody analizowane w publikacji **PIV** poddano kolejnym badaniom, w ramach których oceniono zmiany właściwości fizykochemicznych i mikrobiologicznych zachodzące w trakcie ich przechowywania. Oznaczano: ogólną zawartość mikroorganizmów, suchą masę, pH, topliwość i twardość po 1, 30, 60 i 90 dniach. Zaobserwowano spadek żywotności drobnoustrojów w lodach poddanych uprzednio procesowi fermentacji. Zawartość suchej masy spadła we wszystkich próbach już po 30 dniach przechowywania. Natomiast czas pojawienia się pierwszej kropli i całkowity czas topnienia lodów wzrastał proporcjonalnie do wydłużania się tego czasu (**PV**). Na ostatnim etapie zastosowano PEF do wzbogacenia szczepu bakterii *L. rhamnosus* B 442 jonami wapnia. Oznaczono poziom wapnia w komórkach bakterii i lodach, a po 24 godzinach od produkcji, próby poddano badaniom składu chemicznego, oznaczono pH oraz przebadano ich właściwości topnienia i teksturę. Oznaczono także parametry barwy oraz ogólną liczbę mikroorganizmów. Wykazano istotne różnice we wszystkich parametrach fizykochemicznych, które były zależne od procesu produkcji lodów. Wykorzystanie bakterii *L.rhamnosus* B 442 modyfikowanych PEF do fermentacji mleka, pozwoliło na otrzymanie lodów o najwyższej zawartości suchej masy, tłuszczu, białka i węglowodanów, charakteryzujących się najniższą topliwością. Nie wykazano różnic w parametrach barwy *a\** oraz *ΔH*. Lody wzbogacone jonami wapnia za pomocą PEF nie różniły się istotnie statystycznie pod względem przeżywalności bakterii (**PVI**).

Odniesienia do publikacji:

1. **Góral, M**., & Pankiewicz, U. (2017). Effect of Pulsed Electric Fields (PEF) on Accumulation of Magnesium in *Lactobacillus rhamnosus* B 442 Cells. The Journal of Membrane Biology, 250(5), 565-572.
2. **Góral, M**., Kozłowicz, K., Pankiewicz, U., & Góral, D. (2018). Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. Food Chemistry, 239, 1151-1159.
3. **Góral, M**., Pankiewicz, U., Sujka, M., & Kowalski, R. (2019). Bioaccumulation of zinc ions in *Lactobacillus rhamnosus* B 442 cells under treatment of the culture with pulsed electric field. European Food Research and Technology, 245, 817-824.
4. Pankiewicz, U., **Góral, M**., Kozłowicz, K., & Góral, D. (2019). Novel method of zinc ions supplementing with fermented and unfermented ice cream with using PEF. International Journal of Food Science & Technology.
5. Kozłowicz, K., **Góral, M**., Góral, D., Pankiewicz, U., & Bronowicka-Mielniczuk, U. (2019). Effect of ice cream storage on the physicochemical properties and survival of probiotic bacteria supplemented with zinc ions. LWT, 108562.
6. Pankiewicz, U., **Góral, M.,** Kozłowicz, K., & Góral, D. (2020). Application of pulsed electric field in production of ice cream enriched with probiotic bacteria (*L. rhamnosus* B 442) containing intracellular calcium ions. Journal of Food Engineering, 275, 109876.
7. **Góral, M**., Pankiewicz, U., Sujka, M., Kowalski, R., Góral, D., & Kozłowicz, K. (2019). Influence of pulsed electric field on accumulation of calcium in *Lactobacillus rhamnosus* B 442. Journal of Microbiology and Biotechnology, 30, 44-53.