

DOROTA ZIELIŃSKA, ALEKSANDRA SZYDŁOWSKA, ANNA ŁEPECKA,
DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA

WPLYW WYBRANYCH SKŁADNIKÓW ŻYWNOSCI NA ZACHOWANIE ŻYWOTNOŚCI BAKTERII *LACTOBACILLUS* SPP. W PRZEWODZIE POKARMOWYM – BADANIA *IN VITRO*

Streszczenie

Celem badań była ocena przeżywalności wybranych szczepów bakterii *Lactobacillus* wyizolowanych z sera osecypkowego i korycińskiego w warunkach *in vitro* modelu przewodu pokarmowego w zależności od zastosowanych dodatków żywnościowych. Zakres prac obejmował ocenę przeżywalności bakterii po 2 i 5 h inkubacji w modelowym układzie symulującym pasaż żołądkowo-jelitowy w zależności od zastosowanego dodatku ochronnego: mleka UHT (o zawartości tłuszczu 3,2 %), śmietanki (o zawartości tłuszczu 36 %), a także 10-procentowych roztworów inuliny i oligofruktozy. Wykazano, że badane szczepy były odporne na sok żołądkowy o pH = 2,5, natomiast model soku żołądkowego o pH = 2 powodował zmniejszenie żywotności bakterii średnio o ok. 5 rzędów logarytmicznych po 2 h inkubacji. Mleko UHT wykazało nieznaczne działanie ochronne na przeżywalność komórek bakterii, porównywalne do inuliny i oligofruktozy w środowisku obniżonego pH, przy zastosowanej metodzie badawczej. Istotny efekt ochronny na przeżywalność komórek bakterii badanych szczepów stwierdzono natomiast w przypadku zastosowania śmietanki, co najprawdopodobniej ma związek z większą zawartością tłuszczu w porównaniu z jego zawartością w mleku. Badane szczepy *Lb. plantarum* (Kor1 oraz Os1) wyizolowane z żywności charakteryzowały się podobnymi właściwościami jak szczep referencyjny *Lb. plantarum* 299v, co świadczyć może o potencjalnych właściwościach probiotycznych w tym zakresie. Przeprowadzone badania wskazują na zasadność dalszych badań potwierdzających probiotyczne właściwości i potencjalne zastosowanie jako probiotyków bakterii wyizolowanych z żywności fermentowanej.

Słowa kluczowe: probiotyki, *Lactobacillus*, badania *in vitro*, przewód pokarmowy, przeżywalność

Wprowadzenie

Sprawnie działający ekosystem jelitowy, tzw. mikrobiota (skład ilościowy i jakościowy różnych mikroorganizmów) ma duży wpływ na zachowanie zdrowia człowie-

Dr inż. D. Zielińska, dr inż. A. Szydłowska, dr inż. A. Łepecka, prof. dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wdz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa. Kontakt: dorota_zielinska@sggw.pl

ka. Mikrobiota jelit człowieka jest najbardziej zróżnicowanym gatunkowo ekosystemem na ziemi (100 - 1000 gatunków). Ze względu na rosnącą świadomość roli układu mikrobioty jelitowej dla zachowania zdrowia człowieka od ponad 20 lat na całym świecie prowadzone są prace badawcze związane z możliwościami pozytywnej modyfikacji lub wzbogacenia mikrobioty człowieka. Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem probiotyków i prebiotyków [14].

Najczęściej spotykanymi rodzajami probiotyków są *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus* spp. Za probiotyczne uważane są także wybrane szczepy drożdży *Saccharomyces boulardii*. Mikroorganizmy, aby mogły zostać zaklasyfikowane do szczepów probiotycznych, powinny zostać precyzyjnie zdefiniowane poprzez określenie odpowiednich kryteriów dotyczących bezpieczeństwa stosowania, cech funkcjonalnych oraz technologicznych. Mikroorganizmy – kandydaci do miana „probiotyku” – muszą spełnić trzy kluczowe wymagania: (1) muszą być żywe w momencie podania i muszą być mikroorganizmami, (2) muszą być podane w dawce wystarczająco wysokiej, aby wywołać efekt prozdrowotny, (3) muszą wywierać korzystny wpływ na gospodarza [6, 23]. Do niedawna szczepy bakterii probiotycznych izolowano jedynie z przewodu pokarmowego zdrowych ludzi. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie nowymi szczepami, wyizolowanymi z innych, niekonwencjonalnych źródeł, które także są w stanie przetrwać trudne warunki panujące w przewodzie pokarmowym człowieka [25]. Wśród najtrudniejszych barier do pokonania podczas trawienia pokarmu wyróżnia się niskie wartości pH panujące w żołądku, aktywność enzymów trawiennych, a także obecność soli kwasów żółciowych [3, 13, 22]. Czynniki, które mogą wpływać ochronnie na przeżywalność bakterii są składniki żywności, w tym prebiotyki, czyli składniki pokarmowe niezdolne do życia, wywierające pozytywny wpływ na zdrowie gospodarza, zważywszy na modulację zespołu mikroorganizmów w jelicie [7]. Prebiotyki nie są trawione przez enzymy endogenne przewodu pokarmowego człowieka, trafiają w stanie nienaruszonym do okrężnicy, gdzie ulegają fermentacji, stanowią pożywkę dla mikroorganizmów probiotycznych. Ponadto prebiotyki są rozkładane przez bakterie sacharolityczne obecne w dolnym odcinku przewodu pokarmowego i mają zdolność stymulacji ich wzrostu. Inulina i oligofruktoza są najczęściej stosowanymi i najbardziej efektywnymi prebiotykami [17].

Celem pracy była ocena przeżywalności wybranych szczepów bakterii *Lactobacillus plantarum* wyizolowanych z oscypka i sera korycińskiego w warunkach *in vitro* modelu przewodu pokarmowego, w zależności od zastosowanych dodatków żywnościowych, w tym prebiotyków.

Material i metody badań

Materiałem do badań były trzy szczepy bakterii fermentacji mlekowej gatunku *Lactobacillus plantarum*, które zostały wyizolowane z serów: oscypka (szczep Os1)

i korycińskiego (szczep Kor1) [20] oraz referencyjny szczep *Lactobacillus plantarum* 299v o potwierdzonych klinicznie właściwościach probiotycznych. Bakterie *Lactobacillus* hodowano na podłożu MRS (LabM, Wielka Brytania) i określano ich liczbę zgodnie z PN-ISO 15214:2002 [21]. Model trawienny *in vitro* symulujący pasaż żołądkowo-jelitowy wykonano z dwóch roztworów soków trawiennych, które stosowano sekwencyjnie. Czas trwania trawienia w soku żołądkowym wynosił 2 h, a w soku jelitowym – 3 h, w temp. 37 °C [22]. Skład soków żołądkowego i jelitowego podano w tab. 1.

Tabela 1. Składniki soków żołądkowego i jelitowego użytych w badaniu
Table 1. Composition of gastric and intestinal juices used in experiment

Rodzaj soku / Type of juice	Skład soku / Composition of juice
Sok żołądkowy / Gastric juice	0,5-procentowy roztwór NaCl / 0.5 % NaCl solution Lizozym (1 g/l) / Lysozyme (1 g/l) Pepsyna (0,3 g/l) / Pepsin (0.3 g/l) 5 M HCl (w celu uzyskania właściwego pH 2,5 lub 2,0) 5 M HCl (in order to obtain proper pH of 2.5 or of 2.0)
Sok jelitowy / Intestinal juice	Roztwór NaHCO ₃ (6,4 g/l) / NaHCO ₃ (6.4 g/l) solution KCl (0,239 g/l) / KCl (0.239 g/l) NaCl (1,28 g/l) / NaCl (1.28 g/l) Pankreatyna (1 g/l) / Pancreatin (1 g/l) Żółć wołowa (0,3 %) / Bovine bile (0.3 %)

Wszystkie odczynniki pochodziły z firmy Sigma Aldrich, Polska / All chemicals were from Sigma Aldrich Co, Poland.

W badaniach uwzględniono sześć wariantów doświadczalnych:

1. Warunki standardowe – pH soku żołądkowego wynosiło 2,5.
2. Warunki standardowe – pH soku żołądkowego obniżono do wartości 2,0.
3. Warunki standardowe (2) – z dodatkiem czynnika ochronnego w postaci mleka UHT 3,2 % (Mlekovita, Polska).
4. Warunki standardowe (2) – z dodatkiem czynnika ochronnego w postaci śmietanki UHT 36 % (Mlekovita, Polska).
5. Warunki standardowe (2) – z dodatkiem czynnika ochronnego w postaci 10-procentowego roztworu inuliny (Frutafit, Sensus, Holandia).
6. Warunki standardowe (2) – z dodatkiem czynnika ochronnego w postaci 10-procentowego roztworu oligofruktozy (Raftilose P95, Orafiti, Belgia).

Każdorazowo po 1 ml hodowli *Lactobacillus* (gęstość populacji ok. 1×10^9 jtk/ml) odwirowywano ($6000 \times g$, 10 min), zlewano supernatant, płukano roztworem soli fizjologicznej PBS (Sigma Aldrich, Polska) i dodawano po 5 ml soku żołądkowego. W wariantach 3, 4, 5 i 6 dodawano po 50 μ l czynnika ochronnego (mleka, śmietanki, inuliny lub oligofruktozy), a w wariantach 1 i 2 po 50 μ l PBS i pipetowano

przez 3 min w celu wymieszania z komórkami bakterii przed zawieszeniem w soku żołądkowym. Następnie próbki poddawano inkubacji przez 2 h w temp. 37 °C, po czym odwirowywano (6000 × g, 10 min), zlewano supernatant, dodawano po 10 ml soku jelitowego i inkubowano przez 3 h w temp. 37 °C. Badania mikrobiologiczne wykonywano w czasie 0, po 2 i 5 h inkubacji, w trzech powtórzeniach.

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 13 (StatSoft, Polska). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA (przy $p < 0,05$), a także analizę składowych głównych PCA (Principal Component Analysis).

Wyniki i dyskusja

W celu stwierdzenia, że dany szczep wykazuje korzystne działanie na zdrowie człowieka, trzeba w pierwszej kolejności stwierdzić, czy pokonuje barierę żołądkowo-jelitową. Czynniki, które ograniczają szanse przeżycia bakterii w trakcie trawienia, są: niskie pH, obecność soli kwasów żółciowych oraz enzymów. W tab. 2. przedstawiono wyniki badań przeżywalności bakterii *Lactobacillus* w układzie doświadczalnym.

Pierwszy model doświadczalny (1) został zaczerpnięty z badań przeprowadzonych przez Rzepkowską i wsp. [22]. Odczyn pH soku żołądkowego wynosił 2,5, natomiast stężenie soli żółciowych wynosiło 0,3 %. Ponadto do soków trawiennych zastosowano dodatek enzymów (tab. 1). W tych warunkach liczba komórek bakterii obniżyła się średnio o 1 log jtk/ml po 2 h inkubacji w soku żołądkowym, z wyjątkiem szczepu Os1, w przypadku którego redukcja liczby sięgała 0,4 log jtk/ml, a następnie o ok. 1 log jtk/ml po 3-godzinnej inkubacji w soku jelitowym. Zgodnie z tym można wnioskować, że dane szczepy wykazują dobrą oporność na zastosowane warunki panujące w modelowym układzie pokarmowym człowieka.

Stwierdzono, że obniżenie pH soku żołądkowego z 2,5 do 2,0 spowodowało istotną zmianę w przeżywalności bakterii *Lactobacillus* spp. w soku żołądkowym (o ok. 4 log jtk/ml), a następnie jelitowym (o ok. 1 log jtk/ml). Ponadto we wszystkich wariantach doświadczalnych, w których pH soku żołądkowego wynosiło 2,0, odnotowano istotne obniżenie liczby bakterii po 2 h inkubacji, natomiast w przypadku zastosowania soku żołądkowego o pH = 2,5 efekt ten obserwowany był dopiero po 5 h inkubacji. Uważa się, że gatunek *Lb. plantarum* jest odporny na niskie pH soku żołądkowego i sole kwasów żółciowych [4]. Podobne wyniki otrzymali wcześniej inni autorzy [1, 12], którzy podkreślali kluczowy wpływ kwasowości na przeżywalność bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Z drugiej strony stabilizacja żywotności, którą obserwowano w warunkach soku jelitowego, wskazuje na to, że testowane szczepy *Lb. plantarum* mogą dotrzeć do okrężnicy w odpowiedniej liczbie żywych komórek (ok. 6 log jtk/ml), nawet po ekspozycji na działanie szkodliwego czynnika w postaci kwasu o pH = 2,0.

Tabela 2. Przeżywalność bakterii *Lactobacillus plantarum* [log jtk/ml] w modelu trawiennym *in vitro*, w zależności od zastosowanych czynników ochronnych

Table 2. The effect of applied protective factors on the survival of *Lactobacillus plantarum* [log CFU/ml] in the *in vitro* digestive model

Szczep Strain	Czas Time [h]	Czynnik / Factor					
		1	2	3	4	5	6
Os1	0	9,01 ± 0,37	9,34 ± 0,19	8,75 ± 0,45	8,92 ± 0,08	8,56 ± 0,47	8,68 ± 0,47
	2	8,61** ± 0,34	5,05* ± 0,08	5,10 ± 0,97*	6,37*** ± 0,09	5,60* ± 0,52	5,79* ± 0,11
	5	7,75*** ± 0,30	4,30* ± 0,63	4,89 ± 0,19*	6,48*** ± 0,07	4,99 ± 0,90	4,20 ± 0,69
Kor1	0	9,10 ± 0,22	9,23 ± 0,38	8,81 ± 0,33	9,15 ± 0,08	8,79 ± 0,13	8,82 ± 0,13
	2	8,04** ± 0,56	4,18* ± 0,17	5,53*** ± 0,42	6,26*** ± 0,03	6,20*** ± 0,15	5,28* ± 0,63
	5	7,31*** ± 0,71	3,91* ± 0,04	4,87* ± 0,41	6,55*** ± 0,23	4,88* ± 0,96	3,87* ± 0,81
299v	0	9,14 ± 0,20	9,38 ± 0,19	9,12 ± 0,19	9,10 ± 0,01	8,78 ± 0,16	8,75 ± 0,16
	2	8,14** ± 0,38	4,61* ± 0,75	5,90* ± 0,17	6,21*** ± 0,17	6,24* ± 0,11	5,93* ± 0,11
	5	7,36*** ± 0,16	4,09* ± 0,29	4,29* ± 0,21	6,37*** ± 0,18	5,30* ± 0,50	5,60* ± 0,91

Objasnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviation;

* – wartości średnie w kolumnach różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,05$) w obrębie szczepu w porównaniu z czasem 0 / mean values in columns differ statistically significantly ($p < 0,05$) within strain and compared to time '0'; ** – wartości średnie w wierszach różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,05$) w odniesieniu do próby z czynnikiem 2 / mean values in lines differ statistically significantly ($p < 0,05$) as regards the sample with factor 2.

Uważa się, że bakterie fermentacji mlekowej wzrastają i pozostają żywe przy pH w zakresie 4,5 ÷ 7,0 [10]. Jednakże przy obniżonym pH środowiska uruchamiane zostają mechanizmy, dzięki którym pH cytoplazmatyczne komórek pozostaje bardziej alkaliczne niż środowiska. Bakterie fermentacji mlekowej szybko wydzielają kwas z komórek za pośrednictwem pomp protonowych F1F0-ATPaza oraz systemów: deiminazy argininy ADI (ang. *arginine deiminase*), dekarboksylazy glutaminianu GAD (ang. *glutamate de carboxylase*) i zdolności do wytwarzania chaperonów. Ponadto błony biologiczne są względnie nieprzepuszczalne dla protonów oraz cząsteczek kwasu. W ten sposób tworzy się gradient pH pomiędzy cytoplazmą a środowiskiem ich bytowania [3, 10]. W wielu badaniach wykazano, że oporność na niskie pH jest szczepozależna [2, 18, 26], co potwierdzono także w badaniach własnych.

W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano ochronny wpływ czynników żywieniowych na przeżywalność *Lb. plantarum* podczas modelowego pasażu żołądkowo-jelitowego. W celu wykazania efektu ochronnego zastosowano warunki badań (2) z obniżonym pH soku żołądkowego do wartości 2,0. Statystycznie istotny ($p < 0,05$) wpływ zaobserwowano w wariancie 4 doświadczenia, w którym zastosowano śmietankę o zawartości tłuszczu 36 %. Dodatkowo w wariancie tym zaobserwowano wyższą liczbę bakterii po 5 h niż po 2 h inkubacji, niezależnie od zastosowanego szczepu bakterii, co dowodzi, że komórki były w stanie rozpocząć proces regeneracji i rozmnażać się w soku jelitowym. W przypadku zastosowania mleka (3) o zawartości tłuszczu 3,2 % efekt ochronny był istotny jedynie w przypadku szczepu Kor1 po pasażu żołądkowym. Tłuszcz mleczny zawarty w śmietance i mleku wpłynął ochronnie na komórki bakterii. Z publikacji Klewickiej i wsp. [15] wiadomo, że tłuszcz zawarty w żywności przyczynia się do spowolnienia ruchów jelit, a tym samym do dłuższego pasażu i nawet namnażania się bakterii [15]. Ponadto białka mleka mają właściwości buforujące, co sprzyja podwyższaniu pH w soku żołądkowym i może przyczyniać się do lepszej przeżywalności bakterii w trakcie trawienia [8]. Uważa się, że mleko i produkty mleczne należą do grupy najlepszych nośników bakterii probiotycznych ze względu na przytoczone właściwości [9]. Horáčková i wsp. [13] potwierdzili to w swoim badaniu, w którym wykazali, że liczba komórek bakterii *Lactobacillus* po inkubacji w sokach trawiennych z dodatkiem mleka uległa obniżeniu o 1 ÷ 3 jednostek logarytmicznych w porównaniu z próbą kontrolną bez dodatku mleka, w której liczba komórek bakterii obniżyła się o 3 ÷ 5 jednostek logarytmicznych. Również Klewicka i wsp. [15] analizowali przeżywalność bakterii *Lactobacillus* w preparacie probiotycznym w modelowym przewodzie pokarmowym człowieka przy udziale dodatku żywności. Autorki stwierdziły, że matryca żywieniowa ma korzystny wpływ na przeżywalność bakterii, gdyż tworzy warunki ochronne dla komórek bakterii. Najlepszy efekt ochronny wykazał preparat mlekozastępczy, co wynikało z jego składu, który tworzyły: oleje roślinne, syrop glukozowy, hydrolizat kazeiny, witaminy oraz składniki mineralne. Z

kolei Rzepkowska i wsp. [22] w badaniach nad przeżywalnością szczepów *Lactobacillus* spp. wyizolowanych z żywności w warunkach modelowego przewodu pokarmowego, z zastosowaniem medium żywnościowego w postaci mleka w proszku, mleka UHT o zawartości tłuszczu 3,2 %, bulionu wołowego oraz bulionu MRS wykazali, że najlepszy efekt ochronny uzyskano w przypadku mleka UHT. Powyższa obserwacja ma związek z pozytywnym działaniem składników mleka (głównie białka, w tym białka serwatkowego) na żywotność komórek bakterii mlekowych.

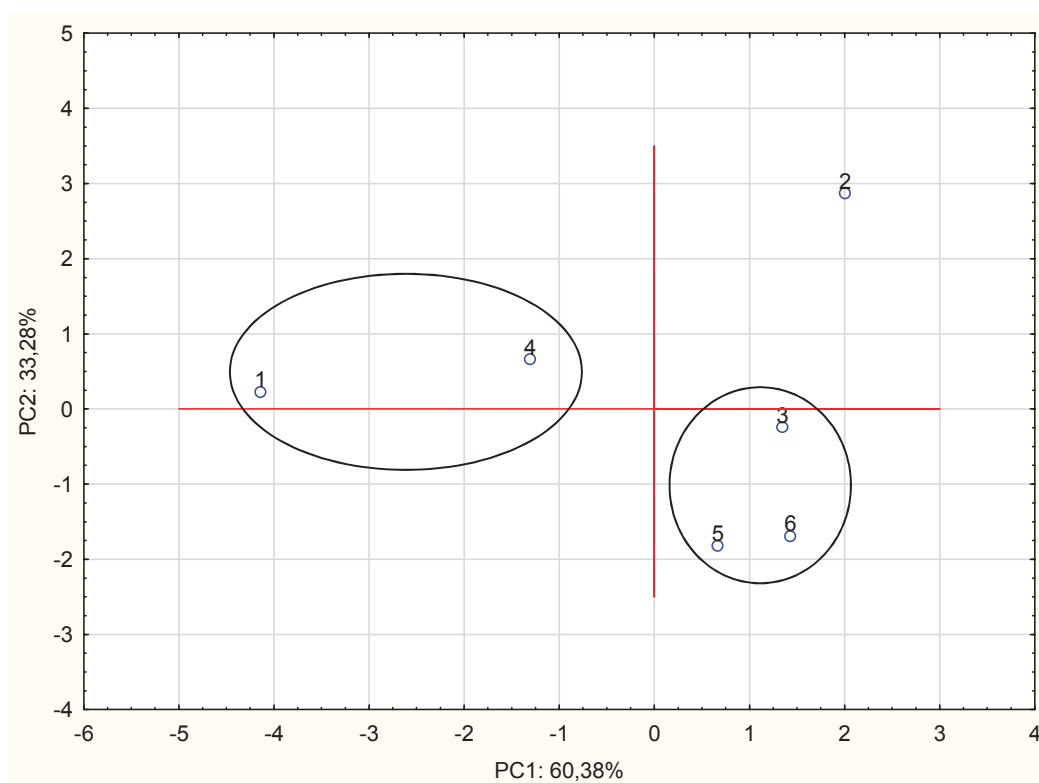
Zastosowanie prebiotyków – warianty 5 i 6, również wpłynęło na poprawę przeżywalności bakterii w trakcie pasażu żołądkowo-jelitowego. Istotny wpływ zaobserwowano w przypadku szczepu Kor1, przy zastosowaniu inuliny jako czynnika ochronnego po pasażu żołądkowym. Zaobserwowano, że liczba komórek bakterii *Lb. plantarum* Kor 1, które zawieszono w 10-procentowym roztworze inuliny, obniżyła się o 2,6 log jtk/ml, natomiast komórki tych samych bakterii bez dodatku czynnika ochronnego (2) obniżyły swoją liczbę o 5,0 log jtk/ml po 2 h inkubacji w soku żołądkowym. Podobny efekt obserwowano w przypadku zastosowania 10-procentowego roztworu oligofruktozy jako czynnika ochronnego. Liczba komórek bakterii ulegała redukcji średnio o 2,8 ÷ 3,5 log jtk/ml po pasażu żołądkowym i kolejno o średnio 0,3 ÷ 1,6 log jtk/ml po pasażu jelitowym, w zależności od zastosowanego szczepu (tab. 2).

Inulina jest polisacharydem zapasowym, który zawiera cząsteczki glukozy i fruktozy. Oligofruktoza zaś jest związkiem, który składa się z dwóch do pięciu cząsteczek fruktozy. Są one połączone wiązaniem glikozydowym i powstają wskutek częściowej hydrolizy inuliny przy użyciu enzymu endonukleazy. Oligofruktoza, dzięki krótszemu w porównaniu z inuliną łańcuchowi fruktozowemu, ma właściwości technologiczne porównywalne do tych, które charakteryzują cukier i syrop glukozowy. Inulina z kolei, dzięki swoim właściwościom, pełni technologicznie rolę zamiennika tłuszczu i cukru [5]. Właściwości chemiczne roztworów prebiotyków mogą także działać ochronnie na komórki bakterii probiotycznych. Krasaekoopt i Watcharapoka [16] wykazali, że dodatek galaktooligosacharydów (0,3 %) stanowił ochronę w przypadku mikrokapsułkowania bakterii *Lb. acidophilus* 5 i *Lb. casei* 01, powodując redukcję jedynie o 3,1 i 2,9 log jtk/ml po inkubacji w symulowanym soku żołądkowym (pH 1,55), a następnie jelitowym, zawierającym 0,6 % soli kwasów żółciowych. Z kolei Gandomi i wsp. [11] stwierdzili, że kapsułkowanie *Lb. rhamnosus* poprawiło żywotność bakterii (27,7 % populacji bakterii przeżyło modelowy pasaż żołądkowo-jelitowy), a ponadto wykazali, że dodatek inuliny znacząco wpłynął ($p < 0,05$) na poprawę żywotności bakterii kapsułkowanych [11].

Analiza składowych głównych zastosowana do danych uzyskanych w niniejszym badaniu pozwoliła na zidentyfikowanie 6 składowych głównych, z których dwie pierwsze tłumaczą 87,21 % zmienności zmiennych. Projekcję dwóch pierwszych skła-

dowych na płaszczyznę czynników przedstawiono na rys. 1. Z kolei na rys. 2. przedstawiono wyniki analizy skupień.

Na wykresie można zaobserwować dwie wyraźnie jednorodne grupy. Przypadki reprezentujące czynniki ochronne 3, 5 i 6 są położone blisko siebie, co świadczy o ich silnym związku i podobnym efekcie działania ochronnego mleka UHT 3,2 %, 10-proceniowych roztworów inuliny i oligofruktozy. Analiza skupień (rys. 2) również potwierdza silny związek pomiędzy tymi czynnikami. Z kolei zastosowanie śmietanki 36 % (4) miało podobny wpływ jak podwyższenie pH o 0,5 wartości (1). Należy także



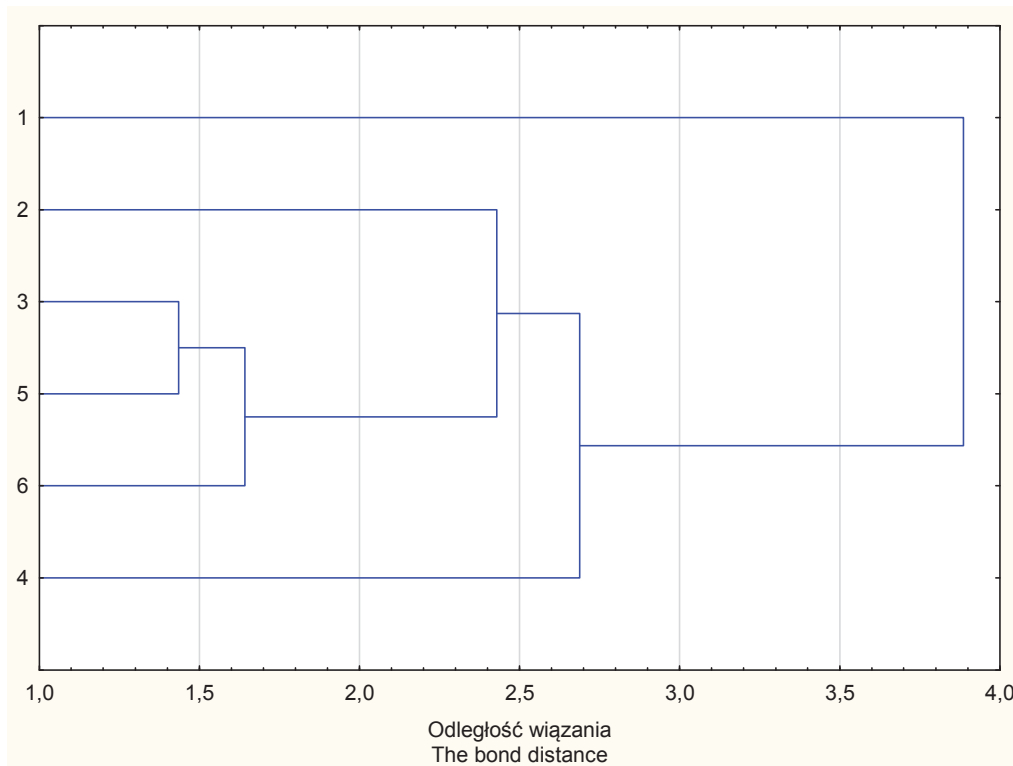
Objaśnienia / Explanatory notes:

- 1 – warunki standardowe, sok żołądkowy o pH = 2,5 / standard conditions, gastric juice with pH = 2.5;
- 2 – warunki standardowe, sok żołądkowy o pH = 2,0 / standard conditions, gastric juice with pH = 2.0;
- 3 – warunki standardowe (2) z dodatkiem mleka / standard conditions (2) with milk added;
- 4 – warunki standardowe (2) z dodatkiem śmietanki / standard conditions (2) with cream added;
- 5 – warunki standardowe (2) z dodatkiem inuliny / standard conditions (2) with inulin added;
- 6 – warunki standardowe (2) z dodatkiem oligofruktozy / standard conditions (2) with oligofractose added.

Rys. 1. Rozkład PCA przypadków na płaszczyznę czynników

Fig. 1. Distribution of PCA cases onto plane of principal components

zauważyć, że warunki (2) o obniżonym pH soku żołądkowego do wartości 2,0 całkiem odstają od pozostałych przypadków, co wskazuje, że warunki te były w silnym stopniu inaktywujące dla komórek bakterii i nie chroniły ich przed szkodliwym działaniem czynników środowiskowych.



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 2. Analiza skupień zastosowanych w badaniach czynników ochronnych w porównaniu z warunkami referencyjnymi

Fig. 2. Cluster analysis of protective factors used in the study compared to the reference conditions

Podsumowując, można stwierdzić, że bakterie z gatunku *Lactobacillus plantarum* zastosowane w badaniach wykazują znaczną oporność na warunki panujące w modelowym przewodzie pokarmowym. Nie wykazano różnic pomiędzy bakteriami wyizolowanymi z żywności (Osl i Kor1) a szczepem bakterii probiotycznych pochodzenia ludzkiego (299v). Świadczy to o potencjalnych właściwościach tych szczepów i weryfikuje negatywnie tezę, że szczepy bakterii kandydujące do miana probiotyku powinny być izolowane wyłącznie z przewodu pokarmowego człowieka, m.in. ze względu na „wrodzoną” oporność na warunki panujące w przewodzie pokarmowym, co było podnoszone w publikacjach [19, 24]. W ostatnich latach, wobec nowych dowodów nau-

kowych odchodzi się od tej wyłączności i dopuszcza do badań szczepy izolowane z innych, niekonwencjonalnych źródeł [25].

Wykazano także, że projektowanie żywności probiotycznej powinno uwzględniać takie czynniki, jak właściwy nośnik żywnościowy. Uważa się, że mleko i produkty mleczne są najlepszym nośnikiem bakterii probiotycznych ze względu na właściwości buforujące białek mleka i zawartość tłuszczu, jednak zastosowanie prebiotyków umożliwia uzyskanie porównywalnych efektów. Inulina i oligofruktoza mogą także pełnić funkcję ochronną dla bakterii probiotycznych w żywności.

Wnioski

1. Najsilniejszy efekt ochronny na przeżywalność badanych komórek bakterii *Lactobacillus plantarum* wykazał tłuszcz mleczny w postaci śmietanki (36 %) oraz w stopniu średnim polisacharydy (10-procentowy roztwory inuliny i oligofruktozy) oraz mleko (3,2 %).
2. Badane szczepy wyizolowane z żywności (Kor1 oraz Os1) charakteryzowały się podobnymi właściwościami co szczep referencyjny *Lb. plantarum* 299v, co może świadczyć o potencjalnych właściwościach probiotycznych w tym zakresie.
3. Przeprowadzone badania wskazują na zasadność dalszych badań potwierdzających probiotyczne właściwości i potencjalne zastosowanie jako probiotyków bakterii wyizolowanych z żywności fermentowanej.

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach środków na utrzymanie potencjału badawczego Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie.

Literatura

- [1] Arena M.P., Caggianiello G., Fiocco D., Russo P., Torelli M., Spano G., Capozzi V.: Barley β -glucans-containing food enhances probiotic performances of beneficial bacteria. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, 15, 3026-3039.
- [2] Caggia C., De Angelis M., Pitino I., Pino A., Randazzo C.L.: Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. *Food Microbiol.*, 2015, 50, 109-117.
- [3] Cotter P.D., Hill C.: Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, 2003, 67 (3), 429-453.
- [4] De Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M., de Vos W.M.: *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int. Dairy J.*, 2006, 16 (9), 1018-1028.
- [5] Drabińska N., Zieliński H., Krupa-Kozak U.: Technological benefits of inulin-type fructans application in gluten-free products – A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 2016, 56, 149-157.
- [6] FAO/WHO.: Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO, Rome 2002.

- [7] FAO: FAO Technical Meeting on Prebiotics. FAO, Rome 2007.
- [8] Fox P.F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P.L.H., O'Mahony J.A.: Physical properties of milk. In: Dairy Chemistry and Biochemistry. 2nd ed. Springer International Publishing, Cham 2015, pp. 321-343.
- [9] Gahrue H.H.: Yogurt. The most suitable carrier for increasing bioavailability of minerals. Progress Nutr., 2018, 20 (2-S), 294-296.
- [10] Gajewska J., Błaszczak M.K.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). Post. Mikrobiol. 2012, 51(1), 55-65.
- [11] Gandomi H., Abbaszadeh S., Misaghi A., Bokaie S., Noori N.: Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. LWT – Food Sci. Technol., 2016, 69, 365-371.
- [12] Ghezzi C., Russo P., Arena M.P., Spano G., Ouzari H.I., Kheroua O., Saidi D., Fiocco D., Kaddouri H., Capozzi V.: Evaluating the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains from Algerian infant feces: Towards the design of probiotic starter cultures tailored for developing countries. Probiotics Antimicrob. Proteins, 2019, 11(1), 113-123.
- [13] Horáčková S., Žaludová K., Pločková M.: Stability of selected *Lactobacilli* in the conditions simulating those in the gastrointestinal tract. Czech J. Food Sci., 2011, 29, 30-35.
- [14] Kerry R.G., Patra J.K., Gouda S., Park Y., Shin H.S., Das G.: Benefaction of probiotics for human health: A review. J. Food Drug Analysis, 2018, 26 (3), 927-939.
- [15] Klewicka E., Śliżewska K., Nowak A.: Ocena przeżywalności bakterii *Lactobacillus* zawartych w preparacie probiotycznym podczas pasażu w symulowanym przewodzie pokarmowym. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2014, 6 (97), 170-181.
- [16] Krasaekoopt W., Watcharapoka S.: Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. LWT – Food Sci. Technol., 2014, 57 (2), 761-766.
- [17] Markowiak P., Śliżewska K.: Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. Nutrients, 2017, 9 (9), #1021. DOI: 10.3390/nu9091021.
- [18] Mathara J.M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P.M., Mbugua S.K., Shin H.-K., Holzapfel W.H.: Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. Int. J. Food Microbiol., 2008, 126, 57-64.
- [19] Nowak A., Śliżewska K., Libudzisz Z.: Probiotyki – historia i mechanizmy działania. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2010, 4 (71), 5-19.
- [20] Ołdak A., Zielińska D., Rzepkowska A., Kołożyn-Krajewska D.: Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and koryciński cheese. BioMed. Res. Int., 2017, #6820369. DOI: 10.1155/2017/6820369.
- [21] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.
- [22] Rzepkowska A., Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D.: Przeżywalność szczepów *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności w warunkach modelowego przewodu pokarmowego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2015, 3 (100), 42-52.
- [23] Sanders M.E.: Probiotics: The concept. In: WGO Handbook on Gut Microbes. The WGO Foundation, Milwaukee, USA, 2014, pp. 39-42.
- [24] Sanders M.E.: Probiotics: Definition, sources, selection, and uses. Clin. Infections Diseases, 2008, 46(Suppl. 2), S58-S61.
- [25] Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D.: Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties. Biomed Res. Int., 2018, #5063185. DOI: 10.1155/2018/5063185.

- [26] Zielińska D., Rzepkowska A., Radawska A., Zieliński K.: *In vitro* screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. *Curr. Microbiol.*, 2015, 70 (2), 183-194.

EFFECT OF SELECTED FOOD INGREDIENTS ON BEHAVIOUR OF *LACTOBACILLUS* BACTERIA IN GASTRO-INTESTINAL TRACT – *IN VITRO* STUDY

S u m m a r y

The objective of the research study was to assess the survival of selected *Lactobacillus* bacteria strains isolated from oscypek and korycin cheese under the *in vitro* conditions of a gastrointestinal tract model and depending on the food additives used. The scope of the research study included the assessment of bacterial survival after 2 and 5 h incubation in a model system that simulated the gastrointestinal tract and depending on the protective additive used: UHT milk (3.2 % of fat), cream (36 % of fat), 10 % solutions of inulin and oligofructose. It was shown that the strains tested were resistant to the gastric juice with a pH value of 2.5, whereas the gastric juice model with pH of 2.0 caused the viability of those bacteria to decrease by ca. 5 logarithmic units on average after 2 h incubation in the gastric juice. The UHT milk showed a slight protective effect on the survival of bacterial cells, which could be compared to the effect of inulin and oligofructose in a low pH environment, with the applied research method. In contrast, a significant protective effect was reported on the survival of bacterial cells of the tested strains in the case of using 36 % cream; this is most likely related to a higher fat content compared to its content in the milk. Test strains, *Lb. plantarum* (Kor1 and Os1) isolated from food, were characterised by the properties similar to those of the reference *Lb. plantarum* 299v strain; this may indicate potential probiotic properties in this area. The conducted studies indicate the validity of further studies to confirm the probiotic properties of bacteria isolated from fermented foods and their potential use as probiotics.

Key words: probiotics, *Lactobacillus*, *in vitro* tests, gastrointestinal tract, survival ☒