

ELŻBIETA KLEWICKA, KATARZYNA ŚLIŻEWSKA, ADRIANA NOWAK

## OCENA PRZEŻYWALNOŚCI BAKTERII *LACTOBACILLUS* ZAWARTYCH W PREPARACIE PROBIOTYCZNYM PODCZAS PASAŻU W SYMULOWANYM PRZEWODZIE POKARMOWYM

### Streszczenie

Celem pracy było określenie przeżywalności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wchodzących w skład preparatu probiotycznego w symulowanym modelu układu pokarmowego człowieka. Wykazano stosunkowo małą przeżywalność bakterii w próbie kontrolnej, którą stanowił bufor PBS. Warunki panujące w symulowanym przewodzie pokarmowym wpłynęły na obniżenie w tej próbie liczby bakterii, wyrażonej logarytmicznie, z 8,18 do 6,20. Znacznie większą przeżywalnością charakteryzowały się bakterie wprowadzone do układu wraz z matrycami żywieniowymi (Nutramigenem, nieklarowanym sokiem owocowo-warzywnym, kleikiem ryżowym) stwarzającymi warunki ochronne dla bakterii. Liczba bakterii po zastosowaniu matrycy utrzymywała się na poziomie  $7,50 \div 9,00$  jednostek logarytmicznych. Pomimo że liczba bakterii w układzie uległa zmniejszeniu na skutek działania niskiego pH soku żołądkowego i soli kwasów żółciowych, symulowany pasaż jelitowy stwarzał bardzo dobre warunki do namnażania bakterii. Liczba żywych komórek, po ich dotarciu do jelita grubego, przewyższała liczbę bakterii w punkcie wyjściowym. W doświadczeniu z Nutramigenem liczba bakterii zwiększyła się z 8,82 do 9,11 jednostek logarytmicznych, a z sokiem jabłkowo-marchwiowym – z 8,46 do 8,86. Kleik ryżowy znacznie słabiej ochraniał bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, dlatego też w tym układzie doświadczalnym stwierdzono zmniejszenie początkowej liczby komórek z 7,85 do końcowej – 7,48.

**Słowa kluczowe:** probiotyki, przeżywalność, symulowany przewód pokarmowy, matryce żywieniowe

### Wprowadzenie

Probiotyki, według definicji FAO/WHO, są to żywe mikroorganizmy, które po spożyciu w odpowiedniej ilości przynoszą korzyści zdrowotne gospodarzowi [3]. Zmienne warunki panujące w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego determinują liczbę i rodzaj drobnoustrojów obecnych w tym środowisku. Przeżywal-

---

*Dr hab. inż. E. Klewicka, dr inż. K. Śliżewska, dr A. Nowak, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź.*

*Kontakt: elzbieta.klewicka@p.lodz.pl*

ność bakterii probiotycznych, wprowadzonych z pożywieniem, w górnej części przewodu pokarmowego człowieka zależy od kwasowości soku żołądkowego (pożądana jest niska kwasowość), obecności soli kwasów żółciowych i enzymów trzustkowych, które stanowią kolejną barierę dla przetrwania mikroorganizmów [16]. Uważano, że duży wpływ na przeżywalność bakterii w przewodzie pokarmowym wywierają enzymy trawienne, głównie proteolityczne. Enzymy te należą do grupy hydrolaz. Są odpowiedzialne za rozkład makrocząsteczek (białek i peptydów) do podstawowych jednostek strukturalnych (aminokwasów), które następnie mogą być wchłaniane w jelicie cienkim. Jest to jeden z czynników wpływających na mikroorganizmy zasiedlające przewód pokarmowy. Należy jednak zauważyć, że bakterie fermentacji mlekowej wytwarzają własne enzymy proteolityczne. Rodzaj enzymów i ich aktywność zależy od przynależności rodzajowej i gatunkowej. Zatem można wykluczyć, że enzymy proteolityczne przewodu pokarmowego wywierają destrukcyjny wpływ na przeżywalność bakterii mlekowych i są istotnym czynnikiem redukcji liczby bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym człowieka [19]. Najbardziej istotnym parametrem jest wartość pH, która zmienia się w zależności od odcinka układu pokarmowego. Najniższe pH (około 1,0 ÷ 2,0) występuje w pustym żołądku. Po spożyciu pokarmów wartość ta wzrasta do pH 3,0 ÷ 4,0. Na tym etapie bakterie są najbardziej narażone na działanie soku żołądkowego. Na przeżywalność bakterii wpływ ma także czas, w którym posiłek jest w żołądku [16]. Szacuje się, że czas ten może się wahać od 2 do 4 h [6, 13, 16]. Jest on krótszy dla pokarmów płynnych, natomiast dłuższy w przypadku posiłków o konsystencji stałej [16]. Posiłki bogate w tłuszcze i białka mogą opóźnić opróżnianie żołądka [13]. Czas tranzytu pokarmu przez jelito cienkie wynosi 1 ÷ 4 h [16]. Zatem całkowity czas przejścia pokarmu w górnym odcinku przewodu pokarmowego jest równy 3 ÷ 8 h. Tak długi okres może znacząco wpływać na przeżywalność bakterii w przewodzie pokarmowym. Bakterie mlekowe wykazują zróżnicowaną wrażliwość na kwaśne środowisko, a różnice te obserwuje się nie tylko między gatunkami, ale również między szczepami w obrębie gatunku [12]. Drugą barierę przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w przewodzie pokarmowym stanowią kwasy żółciowe produkowane w wątrobie z cholesterolu i wydzielane do dwunastnicy. Stężenie żółci w organizmie człowieka wynosi 0,3 ÷ 0,5 % [15, 22]. Żółć wydzielana do przewodu pokarmowego pełni ważną rolę w emulgowaniu lipidów [3]. Ma zdolność wpływania na fosfolipidy i białka błon komórkowych i zakłócania w ten sposób homeostazy komórkowej mikroorganizmów. W związku z tym zdolność bakterii mlekowych do tolerowania żółci może być istotna do ich przetrwania podczas pasażu przez przewód pokarmowy, a następnie do jego kolonizacji [3]. Większość badań nad przeżywalnością szczepów bakterii fermentacji mlekowej w niskim pH lub w obecności soli żółciowych jest przeprowadzana w osobnych doświadczeniach. Badanie przeżywalności bakterii w warunkach niskiego pH i w obecności soli żółci w jednym modelu pozwala na wy-

kluczenie szczepów, które przeżywają w warunkach niskiego pH, ale sole żółci stanowią dla nich barierę nie do pokonania [17]. Taki model przewodu pokarmowego opracowali Sumeri i wsp. [20].

Na podstawie badań nad przeżywalnością bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym człowieka stwierdzono, że toksyczne działanie żółci może być złagodzone częściowo w obecności węglowodanów [7]. Bakterie probiotyczne powinny być zatem selekcyjonowane w taki sposób, aby wykazywały jak największą oporność na te dwa czynniki przewodu pokarmowego. Przeżywalność może zależeć również od postaci, w jakiej podawane są probiotyki, np. jako preparaty liofilizowane, produkty fermentowane, przyjmowane wraz z matrycą żywnościową lub bez niej [8]. Zauważono, że wyższe pH i zawartość tłuszczu w stałej matrycy, np. sera, może chronić bakterie skuteczniej niż płyn środowiska podczas tranzytu przez przewód pokarmowy [1].

Celem badań było określenie przeżywalności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wchodzących w skład preparatu probiotycznego w modelu integrującym warunki niskiego pH i obecność soli kwasów żółciowych, symulującym układ pokarmowy człowieka.

### **Material i metody badań**

Materiałem biologicznym pracy był preparat probiotyczny. Preparat zawierał  $1 \cdot 10^9$  liofilizowanych bakterii kwasu mlekowego w następujących proporcjach: 50 % *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919, 25 % *Lactobacillus casei* LOCK 0908, 25 % *Lactobacillus casei* LOCK 0900. Preparat nie zawierał białek mleka, laktozy i glutenu.

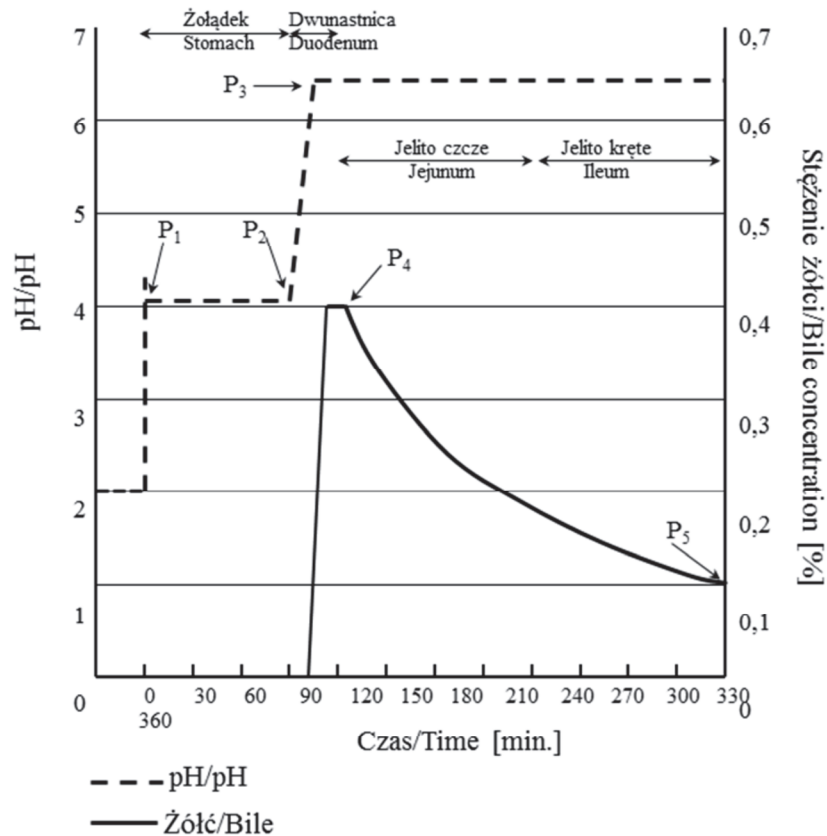
W badaniu użyto modelu układu pokarmowego bazującego na systemie jednego bioreaktora [20]. Model ten odtwarza przejście bakterii przez środowisko niskiego pH soku żołądkowego, a następnie kontakt z solami kwasów żółciowych, czyli tworzy warunki panujące w przewodzie pokarmowym. Ponadto układ umożliwia określenie kinetyki wzrostu bakterii w zależności od stosowanej matrycy żywnościowej. Układ eksperymentalny stanowił fermentor o pojemności 1 l, o możliwości kontrolowania przepływu  $\text{NaHCO}_3$ , żółci oraz medium do rozcieńczania żółci. Temperatura całego układu utrzymywana była na poziomie 37 °C.

W pracy zastosowano 4 nośniki: bufor PBS (próba kontrolna) (Sigma, pH 7,4), preparat mlekozastępczy Nutramigen, nieklarowany sok jabłkowo-marchwiowy Bobo Frut i kleik ryżowy BoboVita. Preparat Nutramigen stosowany jest w alergii na białko mleka krowiego, np. przy atopowym zapaleniu skóry (AZS) czy nietolerancji laktozy. Nutramigen jest preparatem bardzo bogatym w substancje odżywcze. Zawiera oleje roślinne, hydrolizat kazeiny, składniki mineralne oraz witaminy. Składniki te pełnią odżywcze i ochronne funkcje w stosunku do bakterii. Tłuszcze zawarte w preparacie, otaczając komórki bakterii, mogą je skutecznie chronić przed ekstremalnymi warunkami środowiska. Dodatkowo obecne w preparacie witaminy, wolne aminokwasy oraz

inne substancje stanowią doskonałe źródło niezbędnych dla tych bakterii składników odżywczych. Bakterie mlekowe wymagają bowiem obecności w środowisku substancji, których nie są w stanie same syntetyzować [10]. Sok Bobo Frut został wybrany z grupy produktów o dużej zawartości błonnika (deklaracja producenta – 2,1 g błonnika/300 ml). Błonnik może chronić komórki bakterii probiotycznych w czasie tranzytu przez przewód pokarmowy, a tym samym zwiększać ich przeżywalność [9, 18]. Sugeruje się, że błonnik może chronić komórki probiotyczne przez mechanizm, który polega na ich fizycznym unieruchomieniu na włóknach błonnika [14]. Niektóre składniki błonnika mogą również chronić szczepy probiotyczne w czasie liofilizacji i przechowywania [5]. Z kolei kleik ryżowy należy do grupy produktów skrobiowych. Uważa się, że skrobia ryżowa jest najłatwiej przyswajalną przez organizm skrobią oraz wykazuje działania prebiotyczne. Skrobia zbudowana jest w głównej mierze z cząsteczek amylozy i amylopektyny. Drugorzędnymi składnikami są lipidy i białka, które znajdują się na powierzchni lub wewnątrz ziarenek skrobi [21].

Bakterie do układu wprowadzano przez zawieszenie w odpowiedniej matrycy saşetki preparatu zawierającej  $10^9$  komórek bakterii. W próbie kontrolnej bakterie zostały wprowadzone do układu w buforze PBS.

Na początku eksperymentu do fermentora wprowadzano 50 ml 0,008-procentowego HCl o pH = 2,0, symulującego pusty żołądek. W następnej kolejności podawano 100 ml odpowiedniego noşnika, zawierającego bakterie badanego preparatu probiotycznego. Regulowano pH do wartości 4,0 za pomocą 5-procentowego HCl lub 5-procentowego NaOH i określano liczbę bakterii ( $P_1$ ). Cały układ inkubowano przez 90 min, a następnie po raz kolejny określano liczbę bakterii ( $P_2$ ). Odczyn układu neutralizowano do pH = 6,5 przez wprowadzanie 1M  $\text{NaHCO}_3$  z prędkością  $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$  w ciągu 8 - 12 min, w celu symulowania przejşcia treści żołądkowej do dwunastnicy, a następnie określano liczbę bakterii mlekowych ( $P_3$ ). Kolejnym etapem było dodanie 4-procentowego roztworu żółci (Bile bovine, Fluka) z prędkością  $1,7 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$  w ciągu 10 min w celu uzyskania 0,4-procentowego stężenia żółci w całym układzie. Pobierano próbę i określano liczbę bakterii mlekowych ( $P_4$ ). W celu symulowania absorpcji żółci w jelicie rozpoczynano rozcieńczenie układu doświadczalnego (do 0,1-procentowego stężenia żółci w układzie) przez wprowadzanie 500 ml medium do rozcieńczenia żółci o składzie [g/l]: glukoza 5,0, peptobak 2,5, ekstrakt drożdżowy 1,25,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,0 oraz 0,5 ml Tween 80, z prędkością  $2 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$  w ciągu 250 min. Medium stwarza bardzo dobre warunki odżywcze dla bakterii mlekowych. Po 6 h trwania doświadczenia określano liczbę bakterii mlekowych i oznaczano pH układu w punkcie  $P_5$  (rys. 1). Liczbę bakterii mlekowych w punktach  $P_1 - P_5$  określano metodą płytkową Kocha. Wyniki przedstawiono w jtk/ml lub w jednostkach logarytmicznych (LU).



Rys. 1. Model symulacji warunków panujących w układzie pokarmowym człowieka.

Fig. 1. Model of simulating conditions in human digestive tract.

## Wyniki i dyskusja

Wyniki kinetyki wzrostu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w kolejnych punktach pomiarowych w próbie kontrolnej przedstawiono w tab. 1. Bufor PBS ma za zadanie utrzymanie wartości pH na stałym poziomie, jednak bakterie narażone są bezpośrednio na działanie czynników zewnętrznych. W punkcie P<sub>1</sub>, na początku inkubacji, liczba bakterii wyrażona w jednostkach logarytmicznych wynosiła 8,18. Po 90 min inkubacji w warunkach doświadczalnych (temp. 37 °C, pH 4,0) liczba bakterii zmniejszyła się do 6,59. Po podwyższeniu odczynu do pH = 6,5, w punkcie P<sub>3</sub>, liczba bakterii wynosiła 6,40 jednostek logarytmicznych. W punkcie pomiarowym P<sub>4</sub>, w którym bakterie narażone były na kontakt z żółcią, liczba bakterii wyrażona w jednostkach logarytmicznych zredukowała się do 5,08. Dalsze 240 min inkubacji umożliwiło wzrost bakterii w symulowanym pasażu jelitowym. W końcowym punkcie inkubacji, po rozcieńczeniu

układu do 0,1-procentowego stężenia żółci, zaobserwowano podwyższenie liczby żywych bakterii w układzie do 6,20 jednostek logarytmicznych.

Tabela 1. Liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, wchodzących w skład preparatu probiotycznego, w symulowanym przewodzie pokarmowym w buforze PBS.

Table 1. Number of bacteria of *Lactobacillus* genus in probiotic preparation, in simulated gastrointestinal tract in PBS buffer.

| Punkt pomiarowy<br>Testing point | Czas inkubacji<br>Time of incubation<br>[min] | pH   | Liczba bakterii N (po uwzględnieniu rozcieńczenia układu)<br>Number of N bacteria (with system dilution taken into consideration)<br>[jtk/ml] / [CFU/ml] | $\log_{10}(N) \pm s$<br>$\log_{10}(N) \pm SD$ |
|----------------------------------|---|------|--|---|
| P <sub>1</sub>                   | 0   | 4,00 | $1,5 \times 10^8$  | $8,18 \pm 0,21$                               |
| P <sub>2</sub>                   | 90  | 4,00 | $3,9 \times 10^6$  | $6,59 \pm 0,08$                               |
| P <sub>3</sub>                   | 100   | 6,50 | $2,5 \times 10^6$  | $6,40 \pm 0,04$                               |
| P <sub>4</sub>                   | 110   | 6,50 | $1,2 \times 10^5$  | $5,08 \pm 0,42$                               |
| P <sub>5</sub>                   | 360   | 6,50 | $1,6 \times 10^6$  | $6,20 \pm 0,13$                               |

Objaśnienia: Explanatory notes:

s – odchylenie standardowe / SD – standard deviation; n = 3.

Tabela 2. Liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, wchodzących w skład preparatu probiotycznego, w symulowanym przewodzie pokarmowym w obecności Nutramigenu.

Table 2. Number of bacteria of *Lactobacillus* genus in probiotic preparation, in simulated gastrointestinal tract in presence of Nutramigen.

| Punkt pomiarowy<br>Testing point | Czas inkubacji<br>Time of incubation<br>time<br>[min] | pH   | Liczba bakterii N (po uwzględnieniu rozcieńczenia układu)<br>Number of N bacteria (with system dilution taken into consideration)<br>[jtk/ml] / [CFU/ml] | $\log_{10}(N) \pm s$<br>$\log_{10}(N) \pm SD$ |
|----------------------------------|---|------|--|---|
| P <sub>1</sub>                   | 0   | 4,00 | $6,6 \times 10^8$  | $8,82 \pm 0,17$                               |
| P <sub>2</sub>                   | 90  | 4,00 | $1,2 \times 10^9$  | $9,08 \pm 0,09$                               |
| P <sub>3</sub>                   | 100   | 6,50 | $1,2 \times 10^9$  | $9,08 \pm 0,19$                               |
| P <sub>4</sub>                   | 110   | 6,50 | $8,9 \times 10^8$  | $8,95 \pm 0,09$                               |
| P <sub>5</sub>                   | 360   | 6,50 | $1,3 \times 10^9$  | $9,11 \pm 0,11$                               |

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in. Tab. 1.

Wyniki przyrostu liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus* z zastosowaniem preparatu Nutramigen przedstawiono w tab. 2. Na początku inkubacji, po dodaniu nośnika

wraz z bakteriami do układu i ustaleniu pH na poziomie 4,0, liczba bakterii wyrażona logarytmicznie wynosiła 8,82. Po 90 min inkubacji w temp. 37 °C i pH = 4,0 liczba bakterii wyrażona w jednostkach logarytmicznych nieznacznie wzrosła do 9,08. W punkcie P<sub>3</sub> po zobojętnieniu układu do pH = 6,5 liczba żywych bakterii utrzymała się na tym samym poziomie. Po dodaniu do układu 4-procentowego roztworu żółci liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* zmniejszyła się do 8,95 jednostek logarytmicznych i tym samym zbliżyła się do poziomu wyjściowego. Po czterogodzinnym pasażu jelitowym i rozcieńczeniu układu do 0,1-procentowego stężenia żółci, po 6 h stwierdzono przyrost liczby bakterii do wartości 9,11 jednostek logarytmicznych. Nutramigen zapewnił zatem bardzo dobre warunki ochrony, wzrostu i namnażania się bakterii mlekowych w przewodzie pokarmowym człowieka.

Tabela 3. Liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, wchodzących w skład preparatu probiotycznego, w symulowanym przewodzie pokarmowym w obecności soku owocowo-warzywnego Bobo Frut.

Table 3. Number of bacteria of *Lactobacillus* genus in probiotic preparation, in simulated gastrointestinal tract in presence of 'Bobo Frut' fruit-vegetable juice.

| Punkt pomiarowy<br>Testing point | Czas inkubacji<br>Time of incubation<br>[min] | pH   | Liczba bakterii N<br>(po uwzględnieniu rozcieńczenia układu)<br>Number of N bacteria<br>(with system dilution taken into consideration)<br>[jtk/ml] / [CFU/ml] | log <sub>10</sub> (N) ± s<br>log <sub>10</sub> (N) ± SD |
|----------------------------------|---|------|--|---|
| P <sub>1</sub>                   | 0   | 4,00 | 2,9 × 10 <sup>8</sup>  | 8,46 ± 0,21   |
| P <sub>2</sub>                   | 90  | 4,00 | 7,2 × 10 <sup>8</sup>  | 8,86 ± 0,18   |
| P <sub>3</sub>                   | 100   | 6,50 | 6,2 × 10 <sup>8</sup>  | 8,79 ± 0,23   |
| P <sub>4</sub>                   | 110   | 6,50 | 1,9 × 10 <sup>8</sup>  | 8,28 ± 0,48   |
| P <sub>5</sub>                   | 360   | 6,50 | 7,3 × 10 <sup>8</sup>  | 8,86 ± 0,31   |

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in. Tab. 1.

Drugą badaną matrycą żywieniową był sok jabłkowo-marchwiowy Bobo Frut. Wyniki przedstawiające liczbę bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w wybranych punktach pomiarowych, z zastosowaniem soku Bobo Frut przedstawiono w tab. 3. Po wprowadzeniu soku Bobo Frut wraz z bakteriami probiotycznymi do układu, na początku inkubacji liczba bakterii wyrażona w jednostkach logarytmicznych wynosiła 8,46. Po 90 min inkubacji w warunkach pH = 4,0 zaobserwowano niewielki wzrost liczby bakterii – do 8,86. Po zobojętnieniu układu do pH = 6,5 liczba bakterii w jednostkach logarytmicznych utrzymywała się na tym samym poziomie i wynosiła 8,79. W punkcie pomiarowym P<sub>4</sub>, po dodaniu do układu 4-procentowego roztworu żółci wołowej, loga-



rytmiczna liczba bakterii obniżyła się do 8,28. W momencie końcowym badania, po 6 h inkubacji i rozcieńczeniu żółci do 0,1 % w całym układzie, liczba badanych szczepów bakterii wzrosła i wynosiła 8,86 jednostek logarytmicznych. Sok owocowo-warzywny okazał się dobrym nośnikiem bakterii probiotycznych. Podczas tranzytu przez przewód pokarmowy liczba bakterii nie obniżyła się bowiem, a końcowa liczba przewyższała wartość początkową. W sokach znajduje się wiele substancji mających działanie ochronne w stosunku do drobnoustrojów. Do najważniejszych należą: błonnik, białka i polifenole [7, 14].

Owoce, warzywa, zboża i rośliny strączkowe są produktami, które są najbogatsze w te składniki. Soki owocowo-warzywne dodatkowo wykazują działanie buforujące, stąd też zastosowanie tych produktów może zwiększyć przeżycie bakterii probiotycznych w czasie pasażu przez przewód pokarmowy.

W kolejnym etapie pracy zbadano przeżywalność bakterii w symulowanym przewodzie pokarmowym z wykorzystaniem jako matrycy kleiku ryżowego BoboVita. Rezultaty badania kinetyki przeżywalności w symulowanym przewodzie pokarmowym bakterii wchodzących w skład preparatu probiotycznego z wykorzystaniem kleiku ryżowego BoboVita jako nośnika przedstawiono w tab. 4. Po wprowadzeniu do układu doświadczalnego bakterii zawartych w preparacie wraz z matrycą żywieniową liczba żywych bakterii wyrażonych w jednostkach logarytmicznych wynosiła 7,85. Po 90 min inkubacji w środowisku o pH = 4,0 liczba bakterii zmniejszyła się do 7,72. Podwyższenie pH do wartości 6,5 spowodowało kolejne zmniejszenie liczby żywych bakterii do 7,57 jednostek logarytmicznych. Najdrastyczej na przeżywalność bakterii w układzie wpłynął kontakt z solami żółci. Po wprowadzeniu do układu żółci, tak że jej stężenie wynosiło 0,4 %, liczba bakterii została zredukowana do 6,52. Po rozcieńczeniu układu do 0,1-procentowego stężenia żółci i po 4 h pasażu jelitowego, stwarzającego dobre warunki odżywcze dla bakterii mlekowych, liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wzrosła do 7,48 jednostek logarytmicznych.

Na podstawie uzyskanych wartości można byłoby przypuszczać, że w kleiku ryżowym bakterie nie są wystarczająco chronione przed działaniem czynników zewnętrznych i ich przeżywalność jest mniejsza niż przy zastosowaniu dwóch poprzednich matryc żywieniowych. Zauważono jednak, że skrobia obecna w produkcie powoduje sklejanie się komórek bakterii i tworzenie przez nie skupisk. W związku z tym nie jest możliwe miarodajne określenie przeżywalności bakterii w tym nośniku metodą płytową oraz zbadanie stopnia, w jakim chroni on drobnoustroje przed działaniem niskiego pH i żółci. W punkcie końcowym doświadczenia liczba bakterii wprowadzonych do układu wraz z kleikiem ryżowym była wyższa niż w próbie kontrolnej, zatem można przypuszczać, że komórki bakterii wnikają pomiędzy ziarenka skrobi i w ten sposób chronione są przed drastycznymi dla nich warunkami.



Tabela 4. Liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, wchodzących w skład preparatu probiotycznego, w symulowanym przewodzie pokarmowym w obecności kleiku ryżowego BoboVita.

Table 4. Number of bacteria of *Lactobacillus* genus in probiotic preparation, in simulated gastrointestinal tract in presence of 'Bobo Vita' rice gruel.

| Punkt pomiarowy<br>Testing point | Czas inkubacji<br>Time of incubation<br>[min] | pH   | Liczba bakterii N (po uwzględnieniu rozcieńczenia układu)<br>Number of N bacteria<br>(with system dilution taken into consideration)<br>[jtk/ml] / [CFU/ml] | $\log_{10}(N) \pm s$<br>$\log_{10}(N) \pm SD$ |
|----------------------------------|---|------|---|---|
| P <sub>1</sub>                   | 0   | 4,00 | $7,0 \times 10^7$   | $7,85 \pm 0,26$                               |
| P <sub>2</sub>                   | 90  | 4,00 | $5,3 \times 10^7$   | $7,72 \pm 0,18$                               |
| P <sub>3</sub>                   | 100   | 6,50 | $3,7 \times 10^7$   | $7,57 \pm 0,21$                               |
| P <sub>4</sub>                   | 110   | 6,50 | $3,3 \times 10^6$   | $6,52 \pm 0,18$                               |
| P <sub>5</sub>                   | 360   | 6,50 | $3,0 \times 10^7$   | $7,48 \pm 0,39$                               |

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in. Tab. 1.

Podsumowując można stwierdzić, że wprowadzenie szczepów probiotycznych zawartych w preparacie probiotycznym do organizmu człowieka wraz z matrycą żywieniową znacznie zwiększa przeżywalność bakterii. Istotnymi czynnikami w wyborze nośnika, oprócz wyżej wymienionych, jest jego pH i zdolność buforowa [4]. Podwyższenie wartości pH w żołądku wpływa na zwiększenie stabilności szczepów probiotycznych [4], pozwala im przetrwać w górnym odcinku przewodu pokarmowego i kolonizować powierzchnię jelita grubego [2]. Uważa się, że fermentowane produkty mleczne należą do grupy najlepszych matryc służących do dostarczenia probiotyków do organizmu człowieka [11]. Należy jednak pamiętać, że nie wszyscy mogą spożywać grupę produktów bazującą na fermentacji mlekowej i wówczas wskazane jest przyjmowanie preparatów probiotycznych wraz z pokarmem lub po posiłku. Z przebadanych w pracy matryc żywnościowych największą skutecznością ochrony bakterii preparatu probiotycznego wykazał się preparat Nutramigen. W związku z tym, że preparat ten jest dostępny jedynie w aptekach, dobrym rozwiązaniem dla dzieci i dorosłych (również z alergią pokarmową) jest podawanie preparatów probiotycznych w nieklarowanych sokach owocowo-warzywnych, które w wystarczającym stopniu chronią bakterie w przewodzie pokarmowym i gwarantują wysoką ich przeżywalność.

Przeprowadzone badania upoważniają do stwierdzenia, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wchodzące w skład preparatu probiotycznego wykazywały dużą przeżywalność w symulowanym modelu przewodu pokarmowego człowieka. Utrzymanie wysokiej przeżywalności możliwe jest przez zastosowanie matrycy żywieniowej o odpowiednich dla bakterii właściwościach ochronnych. Równoczesne stosowanie

preparatu probiotycznego i odpowiedniego nośnika (prebiotyku) skutkuje działaniem synbiotycznym, a tym samym zwiększeniem korzyści zdrowotnych w przewodzie pokarmowym człowieka.

### Wnioski

1. W celu zwiększenia przeżywalności bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym zaleca się ich przyjmowanie wraz z pokarmem lub po posiłku. Nie zaleca się przyjmowania preparatów probiotycznych na „pusty żołądek”.
2. Spośród badanych matryc żywieniowych najlepsze warunki ochronne dla bakterii w preparacie probiotycznym stwarzał preparat Nutramigen. Wynika to z jego bogatego składu zawierającego m.in.: syrop glukozowy, oleje roślinne, hydrolizat kazeiny, składniki mineralne oraz witaminy.
3. Żywność zawierająca błonnik pokarmowy (np. soki owocowo-warzywne) jest dobrym nośnikiem żywieniowym bakterii probiotycznych.
4. Matryce żywieniowe stwarzają warunki ochronne w przewodzie pokarmowym człowieka dla bakterii probiotycznych.

*Praca finansowana ze środków NCBiR w latach 2011-2014 jako projekt rozwojowy NR 12010110.*

### Literatura

- [1] Bergamini C.V., Hynes E.R., Quiberoni A., Suarez V.B., Zalazar C.A.: Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Res. Int.*, 2005, **38**, 597-604.
- [2] Brinques G.B., Ayub M.A.Z.: Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *J. Food Eng.*, 2011, **103**, 123-128.
- [3] Burns P., Vinderola G., Binetti A., Quiberoni A., de los Reyes-Gavilan C.G., Reinheimer J.: Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *Int. Dairy J.*, 2008, **18**, 377-385.
- [4] Charalampopoulos D., Pandiella S.S., Webb C.: Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, **82**, 133-141.
- [5] Guergoletto K.B., Magnani M., Martin J.S., Tardeli de Jesus Andrade C.G., Garcia S.: Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2010, **11**, 415-421.
- [6] Huang Y., Adams M.C.: *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, **91**, 253-260.
- [7] Kimoto-Nira H., Suzuki C., Sasaki K., Kobayashi M., Mizumachi K.: Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under *in vitro* conditions simulated gastrointestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, **143**, 226-229.
- [8] Klingberg T.D., Budde B.B. The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, **109**, 157-159.

- [9] Kraszevska J., Wzorek W., Sztando E.: Wybrane właściwości probiotyczne szczepów *Lactobacillus plantarum* i możliwości ich wykorzystania w produkcji bioaktywnych napojów słodowych. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment., 2005, **4** (1), 27-38.
- [10] Kunicki-Goldfinger W.J.H.: Życie bakterii, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2005.
- [11] Libudzisz Z.: Probiotyki. Przegl. Piek. Cuk., 1999, **11**, 2-3.
- [12] Madureira A.R., Pereira C.I., Truszkowska K., Gomesa A.M., Pintado M.E., Malcata F.X.: Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. Int. Dairy J., 2005, **15**, 921-927.
- [13] Neumann M., Goderska K., Grajek K., Grajek W.: Modele przewodzenia pokarmowego *in vitro* do badań nad biodostępnością składników odżywczych, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2006, **1** (46), 30-45.
- [14] Nualkaekul S., Charalampopoulos D.: Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. Int. J. Food Microbiol., 2011, **146**, 111-117.
- [15] Pan X., Chen F., Wu T., Tang H., Zhao Z.: The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. Food Control, 2009, **20**, 596-602.
- [16] Pitino I., Randazzo C.L., Mandalari G., Lo Curto A., Faulks R.M., Le Marc Y., Bisignano C., Caggia C., Wickham M.S.J.: Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. Food Microbiol., 2010, **27**, 1121-1127.
- [17] Prasad I., Harsharanjit G., Smart J., Gopal P.K.: Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. Int. Dairy J., 1999, **18**, 377-385.
- [18] Saarela M., Mongensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T.: Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol., 2000, **84**, 197-215.
- [19] Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P.: Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, **71**, 394-406.
- [20] Sumeri I., Arike L., Adamber K., Paalme T.: Single bioreactor gastrointestinal tract simulator for study of survival of probiotic bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, **80**, 317-324.
- [21] Vandeputte G.E., Delcour J.A.: From sucrose to starch granule to starch physical behavior a focus on rice starch. Carbohydr. Polymers, 2004, **58**, 245-266.
- [22] Vinderola C.G., Reinheimer J.A.: Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Res. Int., 2003, **36**, 895-904.

#### ASSESSING SURVIVAL OF *LACTOBACILLUS* BACTERIA CONTAINED IN PROBIOTIC PREPARATION DURING PASSAGE IN A SIMULATED GASTROINTESTINAL TRACT

##### S u m m a r y

The objective of the study was to determine the survival of bacteria of the *Lactobacillus* genus, included in a probiotic preparation, in a simulated model of the human digestive system. It was proved that those bacteria had a relatively low survival rate in the control sample, i.e. a PBS buffer. The conditions in the simulated gastrointestinal tract caused the logarithmically expressed number of bacteria to decrease from 8.18 to 6.20. The bacteria introduced into the system together with dietary matrices (Nutramigen, non-clarified fruit-vegetable juice, rice gruel) were characterized by a considerably higher survival rate since those matrices formed protective conditions for them. After the matrices were applied, the level of bacterial count maintained to be between 7.50 and 9.00 log units. Although the number of bacteria in the system decreased, what was the effect of low pH value of gastric juice and bile salts therein, the intestinal passage simulated produced very good conditions for bacterial growth. The number of viable cells that reached the light of the large intestine exceeded the count of bacteria at the starting point. In the experiment with

Nutramigen, the number of bacteria increased from 8.82 to 9.11 logarithmic units, whereas in the experiment with apple-carrot juice: from 8.46 to 8.86. The protection of *Lactobacillus* bacteria provided by the rice gruel was much weaker; therefore, it was found that in that experimental system, the initial number of bacteria of 7.85 decreased to the final number of 7.48.

**Key words:** probiotics, survival, simulated gastrointestinal tract, dietary matrices ☒