

MAŁGORZATA ZIARNO, PIOTR BARTOSZ

## WIĄZANIE CHOLESTEROLU PRZEZ BAKTERIE JOGURTOWE W MODELOWYM SOKU JELITOWYM

### Streszczenie

Celem pracy było określenie zdolności kultur jogurtowych *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* do usuwania cholesterolu z modelowego soku jelitowego, symulującego warunki panujące w przewodzie pokarmowym. Wykazano, że stopień redukcji poziomu cholesterolu był zróżnicowany w zależności od koncentracji biomasy badanej kultury i powtórzenia doświadczenia, zaś nie zależał od rodzaju środowiska hodowlanego. Największy średni ubytek cholesterolu podczas 5-godzinnej hodowli w soku jelitowym stwierdzono w przypadku 10-krotnie skoncentrowanej biomasy kultur *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ( $0,129 \pm 0,044$  g/dm<sup>3</sup>) lub *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ( $0,139 \pm 0,029$  g/dm<sup>3</sup>). Biomasy o 1-krotnym stężeniu komórek usuwały z modelowego soku jelitowego jedynie  $0,066 \pm 0,022$  g/dm<sup>3</sup> i  $0,080 \pm 0,029$  g/dm<sup>3</sup> cholesterolu, odpowiednio w przypadku *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Ilość cholesterolu usunięta przez biomasę o 0,1-krotnym stopniu koncentracji nie różniła się statystycznie istotnie od ilości cholesterolu usuniętej przez biomasę o 1-krotnym stopniu koncentracji, niezależnie od rodzaju środowiska. Podczas 5-godzinnej hodowli zbadano również oporność kultur na działanie soku jelitowego. Stwierdzono, że kultury *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* lepiej przeżywały w środowisku modelowego soku jelitowego niż kultury *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

**Słowa kluczowe:** wiązanie cholesterolu, bakterie jogurtowe, przeżywalność bakterii, cholesterol, modelowy sok jelitowy

### Wprowadzenie

Na podstawie badań klinicznych przeprowadzonych na ochotnikach opisywane jest dobroczynne oddziaływanie probiotyków na zdrowie ludzi. Także badania *in vitro* i na zwierzętach dowodzą, że bakterie mlekowe mają właściwości antycholesterolowe. Doświadczenia z tego zakresu potwierdzają, że tę zdolność w warunkach *in vitro* wykazują nie tylko szczepy uznane za probiotyczne, ale także tradycyjne kultury bakterii

fermentacji mlekowej, wykorzystywane w przemyśle spożywczym do fermentacji produktów mleczarskich. Można przypuszczać, że bakterie kwasu mlekowego wykażą się podobnym potencjałem hipocholesterolemicznym również w warunkach *in vivo* [1, 6, 8, 9].

Celem niniejszej pracy było określenie zdolności kultur bakterii jogurtowych *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* do obniżania poziomu cholesterolu w modelowym soku jelitowym, imitującym warunki, jakie panują w tym odcinku przewodu pokarmowego człowieka, w którym cholesterol jest wchłaniany do krwiobiegu.

### **Materiał i metody badań**

Do badań użyto monokultur bakterii jogurtowych, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, wyizolowanych z jogurtów handlowych. Do otrzymania biomasy komórek tych kultur użyto płynnych podłoży hodowlanych, odpowiednio bulionu MRS (Merck) i bulionu M17 (Merck). W uzyskanych hodowlach oznaczano metodą płytkową liczbę hodowanych bakterii jogurtowych, osobno pałeczek i paciorkowców mlekowych.

Oznaczanie zdolności bakterii do usuwania cholesterolu prowadzono w warunkach modelowych. Jako prób kontrolnych użyto bulionów MRS i M17, natomiast w celu symulowania warunków panujących w ludzkich jelitach przygotowano modelowy sok jelitowy. Badane kultury przetrzymywano w podanych podłożach, zawierających lub niezawierających dodatku cholesterolu, przez 5 godz. w temp. 37°C. Stężenie cholesterolu, przed rozpoczęciem hodowli i po jej zakończeniu, oznaczano w płynie hodowlanym za pomocą diagnostycznego testu enzymatycznego (Cholesterol RTU, BioMérieux). Wyniki pomiaru stężenia cholesterolu posłużyły do obliczenia ilości usuniętego cholesterolu przez każdą z badanych kultur.

Modelowy sok jelitowy sporządzono według Marteau i wsp. [17], z modyfikacjami własnymi. W 1 dm<sup>3</sup> 1M NaHCO<sub>3</sub> rozpuszczono 5 g NaCl, 0,6 g KCl i 0,25 g CaCl<sub>2</sub> oraz 8,5 g żółci wołowej. Po ustaleniu pH tak, aby po sterylizacji wynosiło 7,0 ± 0,2, przygotowany roztwór autoklawowano w temp. 121°C przez 15 min. Bezpośrednio przez wykonaniem doświadczenia, do soku jelitowego dodawano enzymy trzustkowe. Źródłem tych enzymów był preparat farmaceutyczny Kreon 10 000 (Solvay Pharmaceuticals). Jedna kapsułka tego preparatu zawiera 150 mg pankreatyny z trzustek wołowych o aktywności: 10000 jednostek FIP lipazy, 8 000 jednostek FIP amylazy, 600 jednostek FIP proteazy. Enzymy były dodawane w ilości równej zawartości dwóch kapsułek preparatu na 25 cm<sup>3</sup> modelowego soku jelitowego.

Źródłem cholesterolu w próbach był krystaliczny cholesterol (o czystości chemicznej >99%, Sigma-Aldrich) rozpuszczony na gorąco w mieszaninie 99% etanolu

i Tweenu 80, wymieszanych w proporcji 3:1. Każdorazowo, przed doświadczeniem, przyrządzano nową porcję roztworu cholesterolu.

Wykonano 7 doświadczeń, w każdym przypadku użyto biomasy 10-krotnie zagęszczonej (biomasa 10x), o normalnym stężeniu (biomasa 1x) i 10-krotnie rozcieńczonej (biomasa 0,1x). Próby przygotowywano w dwóch powtórzeniach, osobno z *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i ze *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Przygotowane próby przetrzymywano w cieplarni w temp. 37°C przez 5 godz. Bezpośrednio po przygotowaniu prób i po upływie 5 godz. pobierano płyn pochodzący do oznaczenia stężenia cholesterolu (w celu oddzielenia komórek próby wirowano przez 7 min przy 6500 rpm w temp. pokojowej). Stężenie cholesterolu oznaczano testem enzymatycznym, z użyciem spektrofotometru Helios Gamma (Thermo Elektron Corporation). Absorbancję odczytywano przy długości fali 500 nm. Stężenie cholesterolu obliczano z równania:

$$X = \frac{P}{W} * n$$

gdzie:

X - stężenie cholesterolu w próbce [g/dm<sup>3</sup>], P - absorbancja próby, W - absorbancja wzorca (Cholesterol Calibrateur, BioMérieux), n - stężenie cholesterolu we wzorcu, wynoszące 2 g/dm<sup>3</sup>.

Druga część pracy polegała na oznaczaniu stopnia przeżywalności bakterii podczas 5-godzinnej ich hodowli w bulionach MRS albo M17 oraz w modelowym soku jelitowym, z dodatkiem lub bez dodatku roztworu cholesterolu. Przed rozpoczęciem hodowli i po jej zakończeniu liczbę bakterii, osobno pałeczek i paciorkowców, oznaczano metodą płytkową, odpowiednio w podłożach MRS albo M17 agar (Merck). Płytki inkubowano w cieplarni w temp. 37°C przez 72 godz., w przypadku *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* lub 48 godz., w przypadku *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Hodowle, w zależności od wymagań kultur, prowadzono w warunkach tlenowych lub beztlenowych. Warunki beztlenowe dla *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* uzyskiwano za pomocą anaerostatów (Merck), w których umieszczano wkłady (Merck) wytwarzające atmosferę beztlenową. Wynik podawano w jednostkach tworzących kolonie (jtk) w przeliczeniu na 1 cm<sup>3</sup> hodowli.

Analizę statystyczną (wieloczynnikową ANOVA na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ ) prowadzono z wykorzystaniem programu komputerowego Statgraphics Plus 4.1.

## Wyniki i dyskusja

Rezultaty wielu badań prowadzonych w warunkach *in vitro*, jak i w warunkach *in vivo* na zwierzętach, dowodzą, że bakterie mlekowe mają zdolność do zmniejszania poziomu cholesterolu. Nasuwa to przypuszczenia, że również u ludzi, poprzez spożywanie mlecznych napojów fermentowanych zawierających bakterie kwasu mlekowego,

można uzyskać efekt hipocholesterolemiczny. By potwierdzić to przypuszczenie, należy zbadać zdolność bakterii do wiązania cholesterolu w warunkach ludzkiego przewodu pokarmowego, w tym m.in. w jelitowej części, gdzie odbywa się wchłanianie cholesterolu pokarmowego.

Dotychczasowe badania *in vitro* z tego zakresu były prowadzone w podłożach optymalnych dla hodowli bakterii mlekowych. Należy podkreślić, że w tego typu doświadczeniach stosowano różne warunki hodowli, różne rodzaje roztworów cholesterolu (mieszanina cholesterolu i etanolu, cholesterol stabilizowany fosfatydylocholiną, PPLO), różne jego stężenia (od 70  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  do 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ), różny czas hodowli (od 1 do 48 godz.), a także podłoża o różnym składzie (MRS bulion, MRS-THIO, mleko) [2, 4, 6, 7, 9, 11, 21]. Różnice te sprawiają, że wyniki badań opisanych w niniejszej pracy są trudne do przedyskutowania, gdyż w literaturze przedmiotu brak jest informacji na temat hodowli bakterii mlekowych w warunkach imitujących układ pokarmowy (m.in. w warunkach modelowego soku jelitowego).

W pierwszej części pracy zbadano kultury jogurtowe *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *S. salivarius* subsp. *thermophilus* pod względem ich zdolności do usuwania cholesterolu w optymalnym podłożu hodowlanym i w modelowym soku jelitowym. Uzyskane wyniki potwierdzają, że podczas hodowli w zastosowanych warunkach gatunki tych bakterii wykazały taką zdolność, lecz o różnym natężeniu. Wiadomo, że bakterie kwasu mlekowego nie potrafią metabolizować cholesterolu, stąd jego ubytek z podłoża jednoznacznie wskazywał na zdolność badanych kultur do wiązania tego związku. Dane dostępne w piśmiennictwie wskazują, że komórki bakterii są zdolne do wiązania cholesterolu, co polega na przyłączaniu jego cząsteczek do ściany lub błony komórkowej [4, 9, 11, 19, 26]. Uważa się, że za przyłączanie cząsteczek cholesterolu do ściany komórkowej bakterii odpowiedzialny jest obecny peptydoglikan, który u różnych bakterii fermentacji mlekowej ma inny skład chemiczny [9]. Fakt ten może sugerować, że ilość cholesterolu wiązanej przez kulturę bakterii jest ściśle liniowo zależna od liczby komórek w biomase. Zgodnie z oczekiwaniami, w niniejszej pracy najwięcej cholesterolu ubyło w podłożach zawierających 10-krotnie skoncentrowaną biomasę, niezależnie od tego, czy hodowle prowadzono w modelowym soku jelitowym czy w podłożu kontrolnym. Przy tej koncentracji biomasy kultury *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* związały od 0,052 do 0,197  $\text{g}/\text{dm}^3$  (średnio 0,154  $\text{g}/\text{dm}^3$ ) cholesterolu z modelowego soku jelitowego oraz od 0,062 do 0,168  $\text{g}/\text{dm}^3$  (średnio 0,123  $\text{g}/\text{dm}^3$ ) cholesterolu z podłoża kontrolnego, bulionu MRS (tab. 1).

Duży rozrzut wyników wiązania cholesterolu przez bakterie fermentacji mlekowej nie jest zjawiskiem nowym. Problem ten był omawiany w wielu publikacjach naukowych. Przykładowo, Pereira i Gibson [21], badając szczepy różnych LAB, zwrócili uwagę na znaczne wahania w wiązaniu cholesterolu z podłoża MRS zawierającego 0,2% taurocholalanu sodu. Wiązanie cholesterolu wynosiło od 0,4 do 47%, przy wyj-

ściowym jego stężeniu 0,1 g/dm<sup>3</sup>. Rašić i wsp. [22], badając różne bakterie mlekowe, stwierdzili, że jeden z trzech badanych szczepów *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* wykazuje zdolność związania 276 µg/cm<sup>3</sup> cholesterolu z podłoża hodowlanego. Wg cytowanych badaczy, pozostałe szczepy *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* wiązały cholesterol w ilości, odpowiednio, 123 i 102 µg/cm<sup>3</sup>, zaś *Lb. acidophilus* 177-225 µg/cm<sup>3</sup>. Zdolność do redukcji poziomu cholesterolu przez bakterie rodzaju *Lactobacillus* w warunkach *in vitro* potwierdzili także Lin i Chen [13], którzy badając 5 szczepów *Lb.* podczas 24-godzinnej hodowli w podłożu MRS uzyskali związanie cholesterolu na poziomie od 11 do 71%.

Tabela 1

Zawartość cholesterolu w bulionie MRS i w soku jelitowym, poddanych działaniu *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, w zależności od stopnia zagęszczenia biomasy (wartości średnie i SD).

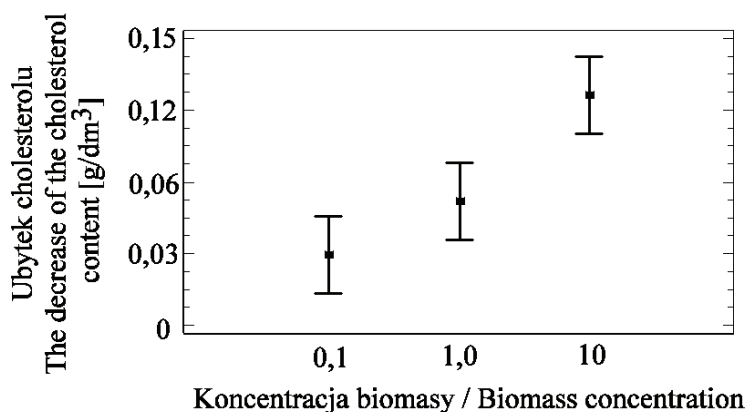
The cholesterol content in MRS broth and in intestinal juice, treated by *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* depending on the degree of biomass concentration (means and SD).

Stopień zagęszczenia biomasy Degree of biomass concentration	Bulion MRS / MRS Broth				Sok Jelitowy / Intestinal Juice			
	Początkowa zawartość cholesterolu Initial cholesterol concentration [g/dm <sup>3</sup> ]		Końcowa zawartość cholesterolu Final cholesterol concentration [g/dm <sup>3</sup> ]		Początkowa zawartość cholesterolu Initial cholesterol concentration [g/dm <sup>3</sup> ]		Końcowa zawartość cholesterolu Final cholesterol concentration [g/dm <sup>3</sup> ]	
10x	1,00	±0,139	0,88	±0,123	1,02	±0,156	0,89	±0,154
1x	1,00	±0,139	0,93	±0,132	1,02	±0,156	0,96	±0,155
0,1x	1,00	±0,139	0,97	±0,134	1,02	±0,156	0,98	±0,176

W tab. 1. przedstawiono średnie wyniki zawartości cholesterolu na początku i po zakończeniu hodowli *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* w modelowym soku jelitowym oraz w bulionie MRS, w zależności od stopnia zagęszczenia biomasy. Stwierdzono, że w miarę zmniejszania koncentracji biomasy komórkowej malała również ilość usuniętego cholesterolu, co wydaje się logiczne i zgodne z piśmiennictwem [26]. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała jednak brak ścisłej zależności między stopniem zagęszczenia biomasy i stopniem związania cholesterolu, co wydaje się zaskakujące (rys. 1).

Należało oczekiwać wyraźnej korelacji między liczbą komórek bakteryjnych i ilością cholesterolu usuwanego z podłoża [4, 9, 11, 25]. Tymczasem biomasa 10-krotnie zagęszczona wiązała tylko około 2-krotnie więcej cholesterolu niż biomasa o 1-krotnym stopniu zagęszczenia (rys. 1). Ponadto, nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy ilością cholesterolu usuniętego przez biomasę o 1-krotnym i biomasę 0,1-krotnym stopniu zagęszczenia, niezależnie od zastosowanego podłoża.

W modelowym soku jelitowym biomasy o 1-krotnym i 0,1-krotnym stopniu koncentracji komórek usunęły średnio, odpowiednio,  $0,066 \pm 0,022$  i  $0,043 \pm 0,027$  g/dm<sup>3</sup> cholesterolu. Natomiast w bulionie MRS te same biomasy badanych pałeczek kwasu mlekowego usunęły średnio, odpowiednio,  $0,069 \pm 0,019$  i  $0,030 \pm 0,025$  g/dm<sup>3</sup> cholesterolu. Pewnym wytłumaczeniem braku różnic w wiązaniu cholesterolu między różnymi zagęszczeniami biomasy może być fakt, że pewną zdolność wiązania cholesterolu wykazują także martwe komórki bakteryjne [9, 14, 15, 16, 19, 23].



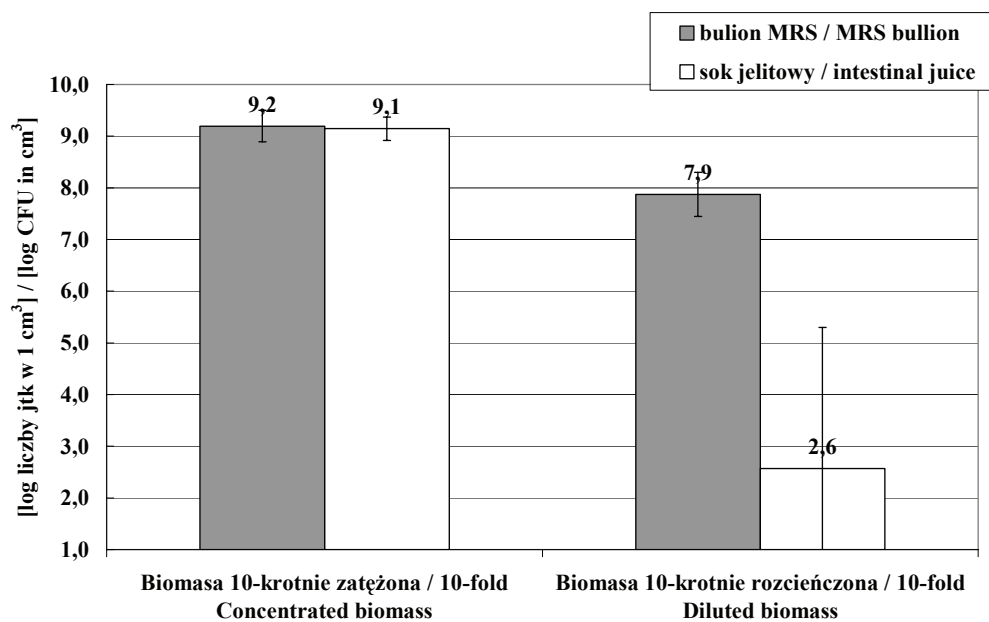
Rys. 1. Wpływ koncentracji biomasy *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* na wartość usuniętego cholesterolu (wartości średnie i NIR).

Fig. 1. The influence of the biomass concentration of *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the decrease of cholesterol content (mean values and NIR).

Analiza statystyczna uzyskanych wyników potwierdziła, że wartość wiązania cholesterolu nie zależała od jego początkowego stężenia w próbce ( $p = 0,5207$ ) ani od rodzaju podłoża ( $p = 0,6767$ ). Wynika z tego, że w modelowym soku jelitowym badane kultury pałeczek kwasu mlekowego wiązały dokładnie tyle samo cholesterolu, co w podłożu kontrolnym (rys. 1). Zgodnie z danymi piśmiennictwa, w modelowym soku jelitowym należało oczekiwać ubytku cholesterolu większego niż w bulionie MRS, spowodowanego częściową koprecypitacją tego związku z kwasami żółciowymi, co jest szeroko opisywane w literaturze. W wielu badaniach *in vitro*, w których do podłoża są dodawane sole żółciowe, obserwuje się koprecypitację cholesterolu z kwasami żółciowymi uwolnionymi podczas hydrolizy soli żółciowych [5, 12]. Hydroliza taka jest katalizowana przez hydrolazę soli żółciowych (BSH), enzym wytwarzany przez wiele rodzajów bakterii mlekowych, szczególnie tych pochodzenia jelitowego. Jak wynika z piśmiennictwa, koprecypitacja cholesterolu z kwasami żółciowymi zachodzi tylko w przypadku, gdy wartość pH wynosi poniżej 5,5. Wytrącanie ustaje w środowisku o pH równym lub wyższym od około 6,0 [12]. Oznacza to, że kwasowość mode-

lowego soku jelitowego, zastosowanego w niniejszej pracy, może być wytłumaczeniem uzyskanych wartości wiązania cholesterolu w tym podłożu przez kultury *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Doświadczenia wykazały, że na przeżywalność testowanych kultur w środowisku modelowego soku jelitowego wpływa stopień koncentracji komórek w biomasie. Kultury *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* w 10-krotnie zatężonej biomacie, podczas hodowli w modelowym soku jelitowym przeżywały słabiej w porównaniu z hodowlą w bulionie MRS. Natomiast w przypadku 0,1-krotnie skoncentrowanej biomasy, liczba komórek znacznie zmniejszyła się w porównaniu z hodowlą w bulionie MRS (rys. 2). Zapewne 10-krotnie zagęszczona biomasa buforowała środowisko modelowego soku jelitowego i zmniejszyła jego niekorzystny wpływ. Bardzo istotne znaczenie ma również fakt, że hodowla była prowadzona przez 5 godz. W tym czasie biomasa komórkowa w podłożach kontrolnych nie zdążyła się namnożyć, zaś w modelowym soku jelitowym wykazała jeszcze przeżywalność (rys. 2). Prawdopodobnie, gdyby hodowla trwała 24 godz. otrzymane wyniki byłyby bardziej zróżnicowane. Być może biomasa w podłożu kontrolnym zdążyłaby się namnożyć i związać więcej cholesterolu, zaś żywotność komórek w biomacie w modelowym soku jelitowym zapewne wykazałaby całkowicie znikomą przeżywalność i stwierdzono by małe usunięcie cholesterolu.



Rys. 2. Liczba *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* po 5-godzinnej hodowli w podłożu kontrolnym (bulionie MRS) i w modelowym soku jelitowym (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Fig. 2. The number of *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* after 5 h incubation in control broth (MRS broth) and artificial intestinal juice (mean values and SD).

W literaturze naukowej przedstawiane są badania potwierdzające zdolność bakterii rodzaju *Lactobacillus* do przeżywania w warunkach *in vivo* w przewodzie pokarmowym ludzi [18, 24, 27, 28]. Szczep *Lb. casei* był wykrywany w końcowej części przewodu pokarmowego ludzi, którzy spożywali mleko fermentowane przez ten szczep pałeczek mlekowych. Przeżywalność w początkowej części jelita cienkiego wyniosła 51,2%, a w końcowej części przewodu pokarmowego obniżyła się do 28% [20]. Piśmiennictwo podaje także o zdolności rodzaju *Lactobacillus* do redukcji poziomu cholesterolu w warunkach *in vivo*. Potwierdzeniem są badania Andersona i Gillilanda [1], którzy dowiedli, że *Lb. acidophilus* podawany wraz z mlecznymi napojami fermentowanymi może obniżać poziom cholesterolu w surowicy krwi ludzi. Również Gilliland i wsp. [6] potwierdzili zdolność do redukcji poziomu cholesterolu przez szczep *Lb. acidophilus* RP32. W swoim doświadczeniu badacze ci wykazali niższy poziom cholesterolu w surowicy krwi świń karmionych dietą wysoko cholesterolową w porównaniu z grupą, która nie miała podawanego szczepu *Lb. acidophilus* RP32.

Tabela 2

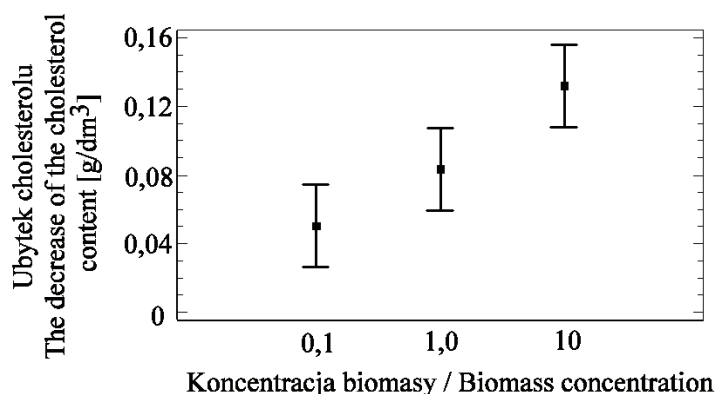
Zawartość cholesterolu w bulionie MRS i w soku jelitowym, poddanych działaniu *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, w zależności od stopnia zagęszczenia biomasy (wartości średnie i SD).  
The cholesterol content in MRS broth and in intestinal juice, treated by *S. salivarius* subsp. *thermophilus* depending on the degree of biomass concentration (means and SD).

Stopień zagęszczenia biomasy Degree of biomass concentration	Bulion M17 / MRS Broth				Sok Jelitowy / Intestinal Juice			
	Początkowa zawartość cholesterolu Initial cholesterol concentration [g/dm <sup>3</sup> ]		Końcowa zawartość cholesterolu Final cholesterol concentration [g/dm <sup>3</sup> ]		Początkowa zawartość cholesterolu Initial cholesterol concentration [g/dm <sup>3</sup> ]		Końcowa zawartość cholesterolu Final cholesterol concentration [g/dm <sup>3</sup> ]	
10x	1,00	±0,186	0,88	±0,185	1,05	±0,167	0,91	±0,167
1x	1,00	±0,186	0,92	±0,186	1,05	±0,167	0,97	±0,173
0,1x	1,00	±0,186	0,95	±0,188	1,05	±0,167	1,01	±0,163

W przypadku kultur *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, badanych w niniejszej pracy, stwierdzono podobną zależność pomiędzy stopniem zagęszczenia biomasy i ilością związanego cholesterolu, jaką zaobserwowano u *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (tab. 2). Ilość cholesterolu związana przez biomasę 10-krotnie zatężoną była prawie 2-krotnie wyższa od ilości cholesterolu związanej przez biomasę o 1-krotnej koncentracji komórek (tab. 2). Kultury *S. salivarius* subsp. *thermophilus* o 10-krotnym stopniu koncentracji komórek wiązały cholesterol na poziomie średnio  $0,139 \pm 0,029$  i  $0,119 \pm 0,027$  g/dm<sup>3</sup>, odpowiednio z modelowego soku jelitowego i bulionu M17. Natomiast biomasę o 1-krotnym stopniu koncentracji komórek wiązała, odpowiednio, średnio



0,080 ± 0,029 i 0,080 ± 0,034 g/dm<sup>3</sup>. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy ilością cholesterolu związaną przez biomasę o 1-krotnej i biomasę o 0,1-krotnej koncentracji komórek, niezależnie od tego, jakie było wyjściowe stężenie cholesterolu ( $p = 0,0579$ ). Biomasa o 0,1-krotnym stopniu koncentracji komórek wiązała, odpowiednio, średnio 0,044 ± 0,025 i 0,052 ± 0,046 g/dm<sup>3</sup>. Podobnie, jak w odniesieniu do kultur *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, nie zaobserwowano istotnych różnic w usuwaniu cholesterolu z modelowego soku jelitowego i podłoża kontrolnego ( $p = 0,9085$ ; rys. 3). Dla porównania, Raśić i wsp. [22], badając różne bakterie kwasu mlekowego, uzyskali w przypadku *S. salivarius* subsp. *thermophilus* zwiążanie cholesterolu na poziomie 69 i 59 µg cholesterolu/cm<sup>3</sup> podłoża hodowlanego. Cytowani badacze nie oznaczali wiązania cholesterolu przez omawiane bakterie w modelowym soku jelitowym.

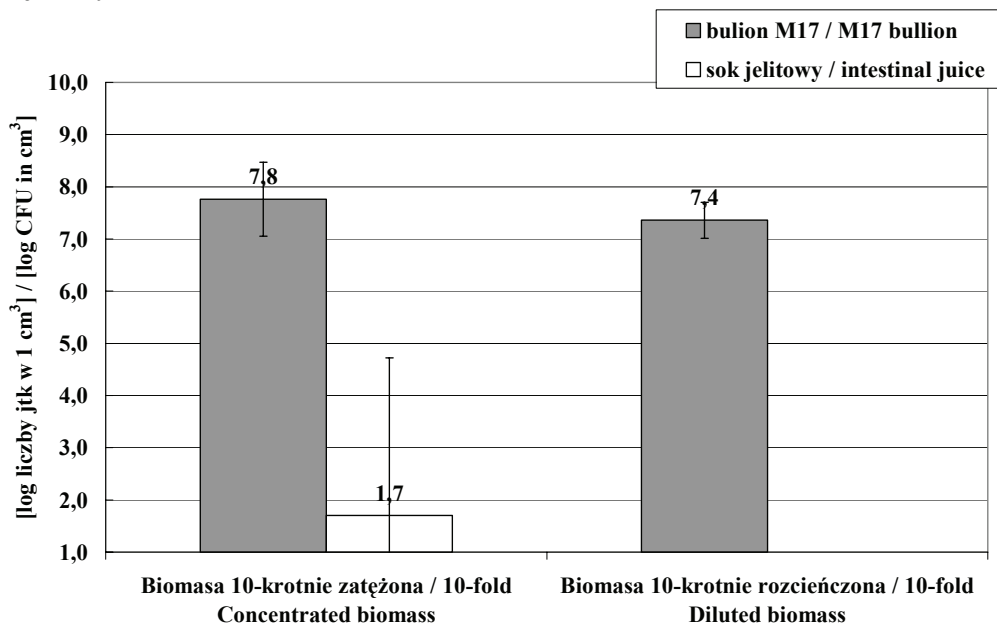


Rys. 3. Wpływ koncentracji biomasy *S. salivarius* subsp. *thermophilus* na wartość usuniętego cholesterolu (wartości średnie i NIR).

Fig. 3. The influence of the biomass concentration of *S. salivarius* subsp. *thermophilus* on the decrease of cholesterol content (mean values and NIR).

Jak przedstawiono na rys. 4, w niniejszej pracy nie zaobserwowano przeżywalności *S. salivarius* subsp. *thermophilus* w modelowym soku jelitowym. Wyniki przeżywalności w zastosowanych warunkach mogą być spowodowane m.in. tym, że *S. salivarius* subsp. *thermophilus* nie występuje naturalnie w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, więc bakterie te nie mają naturalnej oporności na warunki soku jelitowego [10]. Badania, które dowodzą, że niektóre *S. salivarius* subsp. *thermophilus* potrafią jednak przeżywać w ludzkim przewodzie pokarmowym przeprowadzili Elli i wsp. [3]. Badacze podawali grupie 20 ochotników jogurt zawierający żywe komórki bakterii mlekowych. W końcowej części przewodu pokarmowego oraz w kale pobieranym od ochotników wykrywano żywe komórki *S. salivarius* subsp. *thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Można przypuszczać, że przeżywalność pałeczek i pa-

ciorkowców mlekowych w układzie pokarmowym człowieka jest uzależniona od indywidualnych cech szczepów tych bakterii i nie jest właściwością całych gatunków. Zjawisko wiązania cholesterolu przez *S. salivarius* subsp. *thermophilus* w modelowym soku jelitowym, przy jednoczesnej bardzo niskiej przeżywalności, można tłumaczyć spostrzeżeniami Lina i Chena [13]. Doszli oni do wniosku, że w warunkach *in vivo*, hipocholesterolemiczna zdolność bakterii będzie się objawiać przez asymilację cholesterolu do błony komórkowej lub poprzez fizyczne związanie (adsorpcję) cząsteczek cholesterolu do powierzchni ściany komórkowej. Jednocześnie zwrócili uwagę na fakt, że koprecypitacja cholesterolu z kwasami żółciowymi nie będzie wpływać na zmniejszenie poziomu cholesterolu w przewodzie pokarmowym, ponieważ w jelicie cienkim pH jest wyższe od 6,0.



Rys. 4. Liczba *S. salivarius* subsp. *thermophilus* po 5-godzinnej hodowli w podłożu kontrolnym (bulionie M17) i w modelowym soku jelitowym (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Fig. 4. The number of *S. salivarius* subsp. *thermophilus* after 5 h incubation in control broth (M17 broth) and artificial intestinal juice (means and SD).

Można stwierdzić, że w warunkach doświadczalnych zastosowanych w niniejszej pracy, kultury *S. salivarius* subsp. *thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* usuwały cholesterol z modelowego soku jelitowego głównie na zasadzie fizycznego wiązania do ściany komórkowej badanych paciorkowców mlekowych. Świadczyć o tym może stwierdzony brak różnicy pomiędzy stopniem związania cholesterolu w modelowym soku jelitowym i w podłożu kontrolnym przez te bakterie, a także jed-

nocześnie wykazana niska ich przeżywalność w modelowym soku jelitowym w porównaniu z podłożem kontrolnym.

Interpolując wyniki niniejszych badań na warunki *in vitro*, należy pamiętać o tym, że hipocholesterolemiczne działanie probiotyków może również polegać na wpływie na pasaż treści pokarmowej przez jelita, a także wchłanianie egzogenego cholesterolu i jelitowo-wątrobowy obieg kwasów żółciowych.

### Wnioski

1. Bakterie jogurtowe *S. salivarius* subsp. *thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mają zdolność do wiązania cholesterolu w modelowym soku jelitowym w stopniu podobnym, jak w podłożach hodowlanych podczas 5-godzinnej hodowli.
2. W zastosowanych warunkach doświadczalnych, 10-krotne zagęszczenie biomasy komórek bakteryjnych prowadzi do co najwyżej 2-krotnego wzrostu ilości cholesterolu usuniętego ze środowiska.
3. Kultury *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* lepiej przeżywają w środowisku modelowego soku jelitowego niż kultury *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.
4. Brak zależności pomiędzy przeżywalnością bakterii jogurtowych i stopniem wiązania cholesterolu wskazuje na dominację mechanizmu fizycznego wiązania cholesterolu (adhezji) nad mechanizmem jego wbudowywania w błony komórkowe bakterii.

### Literatura

- [1] Anderson J.W., Gilliland E.: Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J. Am. Coll. Nutr.*, 1999, **18**, 43-50.
- [2] Buck L.M., Gilliland E.: Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 2925-2933.
- [3] Elli M., Callegari M.L., Ferrari S., Bessi E., Cattivelli D., Soldi S., Morelli L., Feuillerat N.G., Antoine J.M.: Survival of yoghurt bacteria in human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **7**, 5113-5117.
- [4] Dambekodi P.C., Gilliland E.: Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.*, 1998, **81**, 1818-1824.
- [5] De Smet I., Van Hoorde L., De Saeyer N., Woestyne V.M., Verstraete W.: *In vitro* study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 1994, **7**, 315-329.
- [6] Gilliland E., Nelson C.R., Maxwell C.: Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **49**, 377-381.
- [7] Gilliland E., Walker D.K.: Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.*, 1989, **73**, 905-911.
- [8] Grill J.P., Cayuela C., Antoine J.M., Schneider F.: Effects of *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium breve* on cholesterol. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2000, **31**, 154-156.

- [9] Hosono A., Tono-oka T.: Binding of cholesterol with lactic acid bacterial cells. *Milchwissenschaft*, 1995, **50**, 556-559.
- [10] Kailasapathy K., Chin J.: Survival and therapeutic potential of probiotic organism with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immun. Cell Biol.*, 2000, **78**, 80-88.
- [11] Kimoto H., Ohmomo S., Okamoto T.: Cholesterol removal from media by lactococci. *J. Dairy Sci.*, 2002, **85**, 3182-3188.
- [12] Klaver F.A.M., van der Meer R.: The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 1120-1124.
- [13] Lin M.Y., Chen T.W.: Reduction of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* in culture broth. *J. Food Drug. Anal.*, 2000, **8**, 97-102.
- [14] Liong M.T., Shah N.P.: Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *J. Dairy Sci.*, 2005, **88**, 55-66.
- [15] Liong M.T., Shah N.P.: Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 391-398.
- [16] Liong M.T., Shah N.P.: Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. *Food Res. Int.*, 2005, **38**, 135-142.
- [17] Marteau P., Minekus M., Havenaar R., Huis in't Veld J.H.: Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 1031-1037.
- [18] Moser A., Savage D.C.: Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 3476-3480.
- [19] Noh D.O., Kim H., Gilliland E.: Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 3107-3113.
- [20] Oozeer R., Leplingard A., Mater D., Mogenet A., Michelin R., Seksek I., Marteau P., Dors. E J., Bresson J. L., Corthier G.: Survival of *Lactobacillus casei* in human digestive tract after consumption of fermented milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **8**, 5615-5617.
- [21] Pereira D.I.A., Gibson G.R.: Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 4689-4693.
- [22] Rašić J.L., Vujičić I.F., Škringer M., Vulić M.: Assimilation of cholesterol by some culture of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnol. Lett.*, 1992, **14**, 39-44.
- [23] Tabuchi M., Tamura A., Yamada N., Ishida T., Hosoda M., Hosono A.: Hypocholesterolemic effects of viable and heat-sterilized cells of *Lactobacillus* GG in rats fed a high-cholesterol diet. *Milchwissenschaft*, 2004, **59**, 249-253.
- [24] Taranto M.P., Sesma F., de Ruiz Holgado A. P., de Valdez G.F.: Bile salts hydrolase plays a key role on cholesterol removal by *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol. Lett.*, 1997, **19**, 845-847.
- [25] Taranto M.P., Fernandez Murga M.L., Lorca G., De Valdez G.F.: Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, **95**, 86-91.
- [26] Usman B., Hosono A.: Binding of cholesterol the cells and peptidoglycan of *Lactobacillus gasseri*. *Milchwissenschaft*, 1999, **54**, 495 - 498.
- [27] Ziarno M.: Mechanizmy obniżania poziomu cholesterolu przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. *Żyw. Człow. Metab.*, 2004, **31**, 172-180.
- [28] Ziarno M.: Znaczenie aktywności hydrolazy soli żółci u bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Post. Mikrobiol.*, 2004, **43**, 285-296.

## THE CHOLESTEROL BINDING BY YOGHURT BACTERIA IN SIMULATED INTESTINAL JUICE

### S u m m a r y

The aim of this study was to determinate the ability of yoghurt bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* to remove cholesterol from intestinal juice, which simulated gastro-intestinal track. The degree of the cholesterol level reduction depends on the biomass concentration and the repetition of trial, but not on the type of culture media. The highest average uptake of cholesterol during 5 hours culture in intestinal juice was obtained for 10-fold concentrated biomasses of *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ( $0.129 \pm 0.044$  g/dm<sup>3</sup>) or *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ( $0.139 \pm 0.029$  g/dm<sup>3</sup>). From intestinal juice biomass of 1-fold concentration of *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. salivarius* subsp. *thermophilus* cells removed  $0.066 \pm 0.022$  g/dm<sup>3</sup> and  $0.080 \pm 0.029$  g/dm<sup>3</sup> of cholesterol, respectively. The amount of cholesterol removed by 0.1-fold concentrated biomass did not differ statistically significant from the amount of cholesterol removed by 1-fold concentrated biomass. The survival of yoghurt bacteria in intestinal juice during 5 hours grow was investigated. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survived better than *S. salivarius* subsp. *thermophilus* in simulated intestinal juice.

**Key words:** cholesterol assimilation, yoghurt bacteria, survival of bacteria, cholesterol, simulated gastric juice ☒