

DOROTA ZARĘBA

## PRZEŻYWALNOŚĆ PROBIOTYCZNEGO SZCZEPU *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* W MLEKU NIEFERMENTOWANYM I FERMENTOWANYM

### Streszczenie

Funkcjonalna żywność probiotyczna powinna zawierać żywe komórki bakterii probiotycznych. Ważna jest też ich liczebność. W wytycznych FAO/WHO, dotyczących przeżywalności bakterii probiotycznych w produktach spożywczych, w tym szczepów *Lb. acidophilus*, zdefiniowano minimum terapeutyczne (liczbę żywych komórek bakterii mlekowych) na poziomie  $10^6$  jtk/cm<sup>3</sup> produktu. Jak wynika z wielu badań, kryterium minimum terapeutycznego nie zawsze jest spełniane przez wszystkie szczepy probiotyczne.

Celem pracy było określenie zmian liczby żywych komórek bakterii *Lb. acidophilus* w mleku niefermentowanym i fermentowanym, w ciągu czterech tygodni chłodniczego przechowywania i określenie czynników wpływających na zmniejszenie tej liczby. Wykazano wpływ procesu fermentacji, środowiska inkubacji oraz natleniania środowiska na przeżywalność *Lb. acidophilus* w czasie odpowiadającym okresowi przydatności do spożycia mlecznych produktów probiotycznych.

**Słowa kluczowe:** *Lb. acidophilus*, mleko fermentowane, mleko niefermentowane, przeżywalność, minimum terapeutyczne

### Wprowadzenie

*Lactobacillus acidophilus* jest to grupa pałeczek termofilnych, gram dodatnich (z łac. *lactis* - mleko, *bacillus* - pałeczka, *acidophilus* - lubiący kwas), powszechnie stosowanych w produkcji fermentowanych napojów mlecznych. Ich obecność jest stwierdzana w wielu produktach żywnościowych, głównie mlecznych fermentowanych, zbożowych oraz mięsnych. *Lb. acidophilus* występują naturalnie w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, jamie ustnej i drogach rodnych. Niektóre szczepy tego gatunku mają potwierdzone właściwości probiotyczne [8, 15]. Do właściwości probio-

tycznych tego gatunku zalicza się: zmniejszanie efektu nietolerancji laktozy, wiązanie cholesterolu, aktywność antynowotworową w stosunku do raka okrężnicy oraz stymulację układu immunologicznego. Do przykładowych szczepów probiotycznych tego gatunku należą *Lb. acidophilus* NCFB 1748, *Lb. acidophilus* NCFM, *Lb. acidophilus* La-5 [3, 8, 15]. Ponadto do cech probiotycznych zaliczana jest zdolność do kolonizacji przewodu pokarmowego. Szczepy *Lb. acidophilus* produkują kwasy organiczne, nadtlenek wodoru i/lub bakteriocyny (np. acidofilinę, acidolinę), przez co zapobiegają rozwojowi niepożądanego mikroflory. Produkują również witaminy z grupy B (niacynę, kwas foliowy, witaminę B<sub>6</sub>), istotne dla zdrowia organizmu ludzkiego [1, 4, 5, 15].

Miara gwarancji aktywności prozdrowotnej i tym samym zapewnienia probiotyczności zastosowanych bakterii jest liczba żywych komórek w oferowanym produkcie. Zgodnie z wytycznymi FIL/IDF i FAO/WHO, dotyczącymi zarówno mikroflory podstawowej (np. bakterii jogurtowych) i dodatkowej (mikroflory probiotycznej), liczba żywych komórek bakterii mlekowych w ostatnim dniu przydatności do spożycia nie powinna być niższa od  $10^6$  jtk/cm<sup>3</sup>. Wartość tę uznaje się jako tzw. minimum terapeutyczne. Kontrola liczby żywych komórek bakterii probiotycznych, w produktach spożywczych jest utrudniona ze względu na obecność w finalnym produkcie mieszanki mikroflory podstawowej (jogurtowej) i dodatkowej (probiotycznej) [6, 11]. Określanie ogólnej liczby bakterii mlekowych na koniec okresu przydatności do spożycia produktu nie daje gwarancji obecności wymaganej liczby żywych komórek bakterii probiotycznych w tym czasie.

Celem pracy było określenie przeżywalności szczepu *Lb. acidophilus* (La-5), w ciągu 4 tygodni chłodniczego przechowywania, w mleku fermentowanym przez ten szczep i w mleku niefermentowanym z dodatkiem wymienionego szczepu.

### **Material i metody badań**

W badaniach użyto liofilizowanej szczepionki probiotycznego szczepu *Lb. acidophilus* La-5 (Chr. Hansen) [3].

Badania przeprowadzono w trzech układach modelowych. W pierwszym z nich dwie porcje jałowego mleka (50 cm<sup>3</sup>) zaszczepiano liofilizatem La-5. Jedną porcję poddawano fermentacji w temp. 37 °C przez 18 h, drugą po zaszczepieniu schładzano, obie próbki przechowywano przez cztery tygodnie w temp. 6 °C. Bezpośrednio po zaszczepieniu mleka, po fermentacji oraz po 2 i 4 tygodniach chłodniczego przechowywania wykonywano analizę mikrobiologiczną oraz mierzono pH próbek.

Drugi analogiczny model mleka fermentowanego i niefermentowanego różnił się od pierwszego tym, że porcji mleka nie mieszano, co skutkowało nierozbitym skrzepem mleka fermentowanego i w związku z tym zmniejszonym natlenieniem obu porcji, na wzór metody zbiornikowej.

Trzeci układ modelowy różnił się od poprzednich środowiskiem inkubacji bakterii, którym był bulion MRS (Merck) zaszczipiony liofilizatem La-5. Model w bulionie także wykonywano w dwóch wersjach: fermentowanej (18 h w temp. 37 °C) i niefermentowanej, w którym sprawdzano liczbę żywych komórek bakterii w ciągu 4 tygodni chłodniczego przechowywania.

Próby wykonano w dwóch powtórzeniach, oddzielnych dla każdego modelu. W przypadku modeli niemieszanych próbki były w oddzielnych butelkach do każdego oznaczenia, w celu wyeliminowania mieszania poprzedzającego pobór próbek do oznaczenia.

Oznaczanie liczby żywych komórek *Lb. acidophilus* wykonywano metodą płytkową kropelkową, z wykorzystaniem podłoża agarowego MRS (Merck) [9]. Płytki z posiewami inkubowano w anaerostatach zapewniających warunki beztlenowe, w temp. 37 °C przez 48 h.

## Wyniki i dyskusja

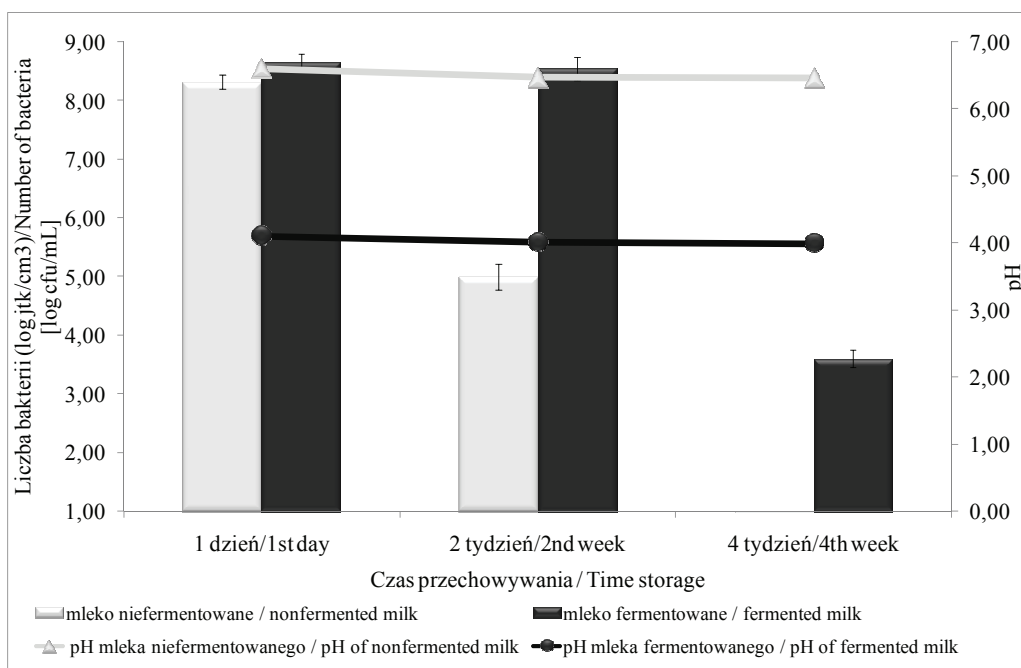
Jak już wspomniano, przy wykorzystaniu probiotycznych szczepów bakterii w produkcji żywności funkcjonalnej istotna jest kontrola przeżywalności tych bakterii w finalnym produkcie. Ważna jest też kontrola ich wzrostu i przeżywalności w czasie procesu fermentacji oraz w czasie przechowywania przypadającego na okres przydatności do spożycia produktu. Jak wynika z niniejszych badań zdolność bakterii probiotycznych gatunku *Lb. acidophilus* do wysokiej przeżywalności w produkcji zależy od wielu czynników. W celu wyznaczenia tych czynników przeprowadzono badania modelowe z użyciem monokultury *Lb. acidophilus*. Zastosowane dwa środowiska inkubacji (mleko i bulion) pozwoliły wyznaczyć wpływ środowiska oraz dostępu składników odżywczych na przeżywalność omawianego gatunku probiotycznego. Z kolei zastosowanie procesu fermentacji pozwoliło zaobserwować istotność wpływu tego procesu, oraz metabolitów fermentacji na przeżywalność *Lb. acidophilus*. Dodatkowa symulacja metody termostatowej i zbiornikowej miała na celu określenie wpływu natleniania i związanej z tym produkcji nadtlenu wodoru, typowej dla tego gatunku, na poziom liczby żywych komórek tych bakterii.

Na rys. 1. zobrazowano wpływ procesu fermentacji na zmianę pH i liczbę komórek *Lb. acidophilus* w próbkach modelowych. Zaobserwowano istotne zmniejszenie liczby bakterii *Lb. acidophilus* w mleku niepoddanym procesowi fermentacji. W mleku niefermentowanym już w 2. tygodniu przechowywania w chłodniczych warunkach nastąpiło obniżenie liczby komórek bakterii o 3 cykle logarytmiczne, do poziomu 5 log jtk/cm<sup>3</sup>. Po kolejnych 2 tygodniach nie stwierdzono obecności żywych komórek *Lb. acidophilus* w mleku niefermentowanym.

Wpływ fazy wzrostu na przeżywalność komórek bakterii gatunku *Lb. acidophilus* badali Lorca i wsp. [10]. Cytowani badacze stwierdzili najsłabszą przeżywalność ko-

mórek tego gatunku w fazie wykładniczego wzrostu. W czasie tej fazy następuje intensywna produkcja kwasów i nadtlenu, najprawdopodobniej przyczyniających się do śmierci komórek *Lb. acidophilus*.

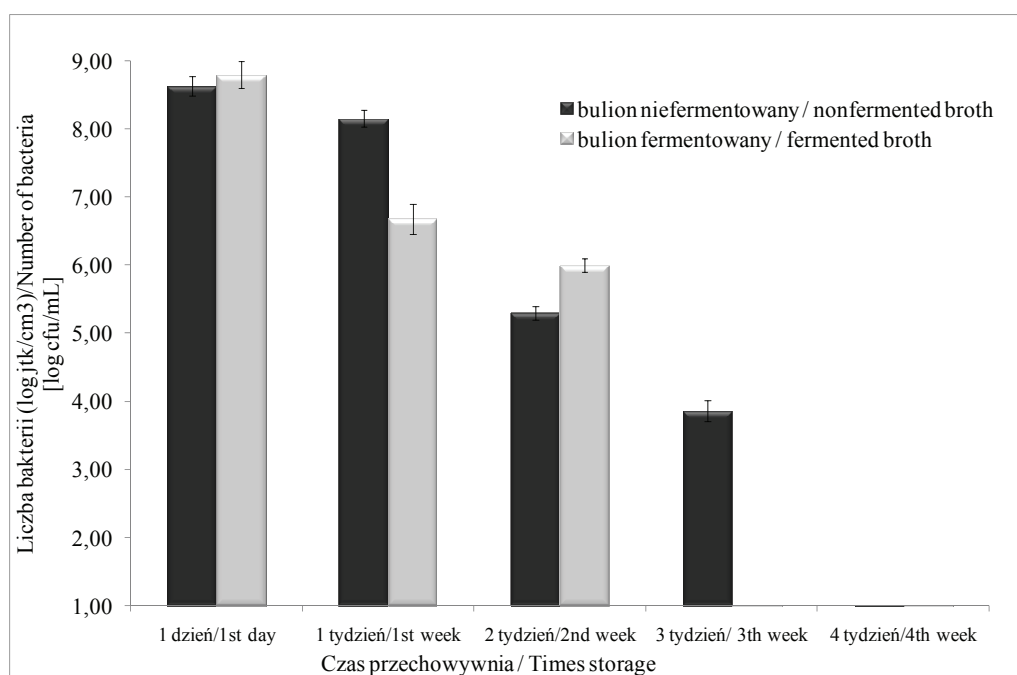
W niniejszej pracy, wyższą przeżywalność komórek *Lb. acidophilus* stwierdzono w mleku fermentowanym niż niefermentowanym. Przez pierwsze 2 tygodnie liczba żywych komórek utrzymywała się na wysokim poziomie zapewniającym spełnienie wymogów minimum terapeutycznego. Dopiero w 4. tygodniu zaobserwowano redukcję populacji pałeczek o 5 cykli logarytmicznych do  $3,6 \log \text{ jtk/cm}^3$ . Wartość pH po procesie fermentacji ustabilizowała się na poziomie 4, natomiast w próbce niefermentowanej wartość nie zmieniła się i wynosiła 6,5 przez cały okres przechowywania (rys. 1). Jak można wnioskować, na przeżywalność probiotyku istotny wpływ ma proces fermentacji, w czasie którego okres adaptacji z formy liofilizowanej odbywa się w warunkach zbliżonych do optymalnych do wzrostu komórek bakteryjnych. Jednak spadek przeżywalności komórek w 4. tygodniu przechowywania informuje o konieczności skrócenia okresu przydatności do spożycia produktów zawierających *Lb. acidophilus* lub zwiększenia początkowej liczby tych pałeczek w produkcji.



Rys. 1. Przeżywalność *Lb. acidophilus* oraz zmiana pH próbek mleka fermentowanego i niefermentowanego w czasie chłodniczego przechowywania.

Fig. 1. Viability of *Lb. acidophilus* and change in pH of fermented and non-fermented milk samples during the refrigerated storage.

Przeżywalność przechowalnicza gatunku *Lb. acidophilus* zależy także od użytego szczepu, co udowodnili Bolin i wsp. [2]. Cytowani badacze stwierdzili najslabszą przeżywalność kultury (La-5) *Lb. acidophilus*, spośród badanych kultur. Jednocześnie potwierdzili zwiększenie przeżywalności kultury La-5 przy zastosowaniu mieszanki kultur, co wykazali także Martensson i wsp. [12]. Warto podkreślić, że badania producenta kultury La-5, prowadzone w ciągu 21 dni (3 tygodnie) także wskazują na słabą przeżywalność (na poziomie 10 – 20 %) tego szczepu w porównaniu z innymi probiotykami [3].

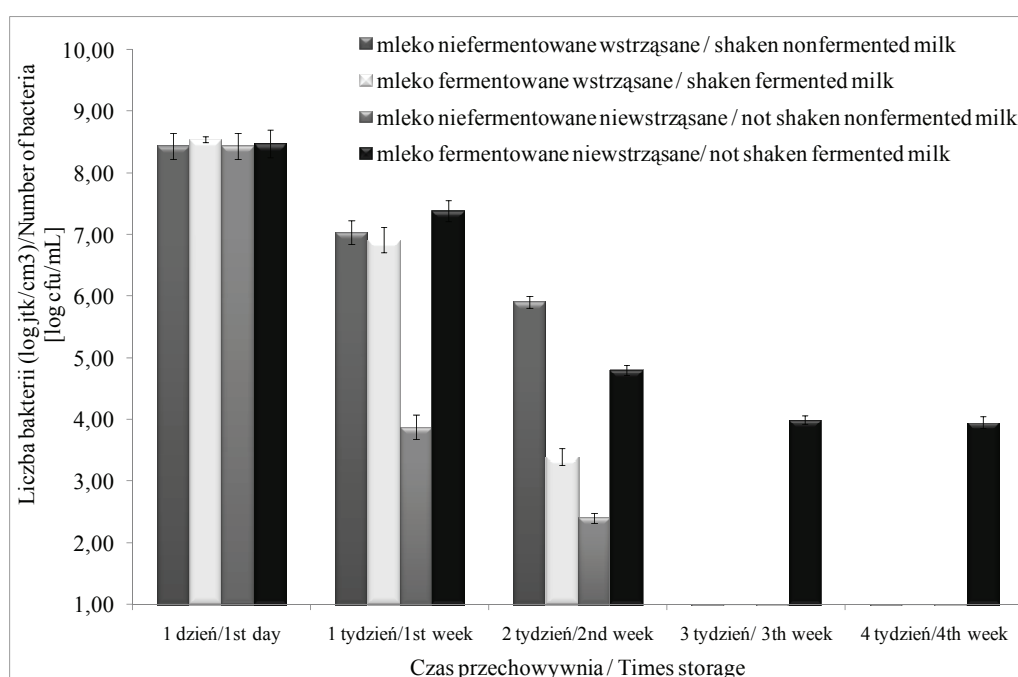


Rys. 2. Przeżywalność *Lb. acidophilus* w bulionie MRS w czasie chłodniczego przechowywania.

Fig. 2. Viability of *Lb. acidophilus* in MRS broth during the refrigerated storage.

Na podstawie uzyskanych wyników można wykluczyć wpływ środowiska na przeżywalność *Lb. acidophilus* w warunkach chłodniczych (rys. 2). Zaobserwowano spadek przeżywalności omawianego szczepu probiotycznego na pożywkę dostosowanej do wzrostu pałeczek mlekowych (bulion MRS). Avonts i wsp. [1] także nie wykazali wpływu dodatkowych źródeł składników odżywczych na przeżywalność *Lb. acidophilus*, za to stwierdzili zwiększoną produkcję bakteriocyn przez ten gatunek. W niniejszych badaniach stwierdzono różnice szybkości obumierania populacji *Lb. acidophilus* w bulionie MRS w wersjach fermentowanych i niefermentowanych. W przypadku modelu w bulionie MRS w wersji fermentowanej już w 3. tygodniu nie

stwierdzono żywych komórek bakterii, z kolei w wersji niefermentowanej w tym samym czasie nastąpił spadek populacji poniżej wymaganego minimum terapeutycznego. W 4. tygodniu nie stwierdzono żywych komórek *Lb. acidophilus* w żadnej z wersji bulionu MRS. Istotnymi czynnikami redukującymi liczbę komórek bakterii były: czas przechowywania oraz niskie pH. Brak białek mleka buforujących niskie pH potęgował i przyspieszał efekt wymierania komórek bakterii w bulionie w wersji fermentowanej. Słabą przeżywalność *Lb. acidophilus* w czasie przechowywania zaobserwowali również Medina i Jordano [13] oraz Kosikowska i wsp. [7].



Rys. 3. Przeżywalność *Lb. acidophilus* w mleku fermentowanym i niefermentowanym w wersji wstrząsanej (natlenianej) i niewstrząsanej, w czasie chłodniczego przechowywania.

Fig. 3. Viability of *Lb. acidophilus* in fermented and non-fermented, shaken (oxygenated) and not shaken milk samples, during the refrigerated storage

Wpływ natlenienia mleka w procesie produkcji, na wzór metody zbiornikowej, sprawdzono porównując przeżywalność *Lb. acidophilus* w modelu "wstrząsanym" i „niewstrząsanym” (rys. 3). Modele mleka fermentowanego i niefermentowanego przez *Lb. acidophilus* z uwzględnieniem natleniania środowiska potwierdzają większą przeżywalność *Lb. acidophilus* w mleku fermentowanym niewstrząsanym niż w pozostałych próbkach. Jednak nawet ta przeżywalność w mleku fermentowanym niewstrząsanym nie gwarantuje spełnienia wymagań minimum terapeutycznego w całym okresie

4 tygodni chłodniczego przechowywania. Najszybsze zmniejszenie liczby komórek bakterii zaobserwowano w przypadku próbki niefermentowanej i niewstrząsanej. Jednak największą intensyfikację wymierania żywych komórek bakterii zaobserwowano w próbkach regularnie napowietrzanych. Proces napowietrzania (wstrząsanie) próbek miał wpływ na populację pałeczek w próbce niefermentowanej, bo już w 2 tygodniu spowodował redukcję komórek o 3 cykle logarytmiczne poniżej wymaganego minimum terapeutycznego.

Nadtlenek wodoru, który może być produkowany przez *Lb. acidophilus* w warunkach tlenowych ma wpływ na ich przeżywalność. Jak wykazały badania Lorca i wsp. [10] obecność nadtlenku wodoru istotnie wpływa na populację omawianego gatunku w przypadku fermentacji w temp. niższej niż 37 °C.

W niniejszej pracy, w 3. tygodniu chłodniczego przechowywania w mleku fermentowanym i niefermentowanym w wersji wstrząsanej (natlenianej) i niewstrząsanej tylko w jednej próbce (mleka fermentowanego niewstrząsanego) stwierdzono jeszcze żywe komórki *Lb. acidophilus*, jednak poniżej wymaganego progu spełniającego minimum terapeutyczne.

Jak wykazały niniejsze badania, prowadzone na monokulturze *Lb. acidophilus*, przeżywalność tego probiotyku nie spełnia minimum terapeutycznego w ciągu 4 tygodni chłodniczego przechowywania mleka, co potwierdzają także badania innych naukowców [2, 14, 12].

## Wnioski

1. Proces fermentacji wpływa pozytywnie na zwiększenie przeżywalności bakterii probiotycznych z gatunku *Lb. acidophilus* zarówno w mleku, jak i w bulionie MRS.
2. Podczas czterotygodniowego przechowywania zaszczipionych porcji bulionu MRS i mleka, stwierdzono lepszą przeżywalność komórek *Lb. acidophilus* w mleku niż w bulionie MRS.
3. Zabieg mieszania wykorzystywany w systemie zbiornikowej produkcji napojów fermentowanych może mieć negatywny wpływ na przeżywalność *Lb. acidophilus* ze względu na zjawisko natleniania produktu.

*Praca była prezentowana podczas XIII Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Łódź, 28 - 29 maja 2008 r.*

## Literatura

- [1] Avonts L., Van Uytven E., De Vuyst L.: Cell growth and bacteriocin production of probiotic. *Int. Dairy J.*, 2004, **14**, 947–955.
- [2] Bolin Z., Libudzisz Z., Moneta J.: Viability of *Lactobacillus acidophilus* in fermented milk products during refrigerated storage. *Pol. J. Food. Nutr. Sci.*, 1998, **3**, 466-471.

- [3] Chr. Hansen: Materiały informacyjne i ofertowe.
- [4] Klewicka E., Libudzisz Z., Czajka D., Kuc K.: Antagonistyczna aktywność bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus acidophilus*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 1999, **4** (21) Supl., 168-175.
- [5] Klewicka E., Libudzisz Z.: Bakteriocynogenne właściwości *Lactobacillus acidophilus*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2001, **3** (28) Supl., 90-98.
- [6] Kosikowska M., Jakubczyk E.: Metody oznaczania bakterii probiotycznych w produktach mlecznych. Przegl. Mlecz., 2007, **12** (57), 12-17.
- [7] Kosikowska M., Merlak D., Gawel J., Stefaniuk A.: Przeżywalność komórek *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* w biomasach zagęszczanych metodą filtracji membranowej lub baktofugacji. Przegl. Mlecz., 1996, **45** (7), 196-199.
- [8] Libudzisz Z.: Probiotyki i prebiotyki w fermentowanych napojach mlecznych. Pediatria Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka, 2002, **4** (1), 19-25.
- [9] Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna. Tom I. Wyd. Politechniki Łódzkiej 2007, s.118-119.
- [10] Lorca L.G., Font de Valdez G.: The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance of *lactobacillus acidophilus* to environmental stress. Cryobiology, 1999, **39**, 144-149.
- [11] Markiewicz L., Biedrzycka E., Bielecka M.: Różnicowanie mleczarskich szczepów *Lactobacillus* metodą PFGE. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2006, **2** (47) Supl., 216-222.
- [12] Martensson O., Oste R., Holst O.: The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. Food Res. Int., 2002, **35**, 775-784.
- [13] Medina L.M., Jordano R.: Population dynamics of constitutive microbiota in BAT type fermented milk products. J. Food Prot., 1995, **58**, 70-76.
- [14] Shah N.P., Lankaputhra W.E.V., Britz M.L., Kyle W.E.A.: Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. Int. Dairy J., 1995, **5**, 515-521.
- [15] Ziarno M.: Prozdrowotne właściwości bakterii mlekowych. Przegl. Mlecz., 2004, **54** (11), 4-10.

#### VIABILITY OF PROBIOTIC STRAIN OF *LB. ACIDOPHILUS* IN NON-FERMENTED AND FERMENTED MILK

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

Functional probiotic food products should contain live cells of probiotic strains. Their count is also important. In the FAO/WHO guidelines on the viability of probiotic bacteria in food products, including *Lb. acidophilus* strains, the therapeutic minimum has been defined (the count of live *Lactobacillus* bacteria) as  $10^6$  cfu/cm<sup>3</sup> of the product. Based on numerous investigations, it can be concluded that not all the probiotic strains meet the criterion of therapeutic minimum.

The objective of this paper was to determine changes in the count of *Lb. acidophilus* in the non-fermented and fermented milk during four weeks of its refrigerated storage and to determine factors impacting the reduction of the bacteria count. The impact of fermentation process, environment of incubation, and oxygenation of the environment on the viability of *Lb. acidophilus* was proved during a period corresponding to the expiry period of fermented milk products.

**Key words:** *Lb. acidophilus*, fermented milk, non-fermented milk, viability, therapeutic minimum 