

Małgorzata Ziarno, Dorota Zaręba, Dorota Jamiolkowska

STUDIA NAD CZYNNIKAMI DETERMINUJĄCYMI PRZEŻYWALNOŚĆ LAB W WARUNKACH SYMULUJĄCYCH UKŁAD POKARMOWY

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności Wydziału Nauk o Żywności
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. *M. Gniewosz*

*W pracy określono wpływ trzech czynników (wielkości porcji mleka fermentowanego, zawartości tłuszczu i wielkości dodatku prebiotyku) na przeżywalność probiotycznego szczepu *Bif. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 w warunkach *in vitro* symulujących sok żołądkowy i sok trzustkowy.*

Hasła kluczowe: *Bifidobacterium*, Bb-12, sok żołądkowy, sok jelitowy, przeżywalność, prebiotyk.

Key words: *Bifidobacterium*, Bb-12, gastric juice, intestinal juice, viability, prebiotic.

Bifidobakterie korzystnie wpływają na stan zdrowia i funkcjonowanie przewodu pokarmowego człowieka. Szczególnie ważna jest ich obecność w jelicie grubym. Bakterie rodzaju *Bifidobacterium* mogą dostawać się do organizmu wraz z pokarmem lub preparatami farmaceutycznymi. Metabolity wydzielane przez bakterie kwasu mlekowego i bifidobakterie spełniają ważną rolę w fizjologii jelita (1, 2).

Niektóre szczepy bakterii kwasu mlekowego i bifidobakterii są probiotyczne, czyli wykazują dodatkowe prozdrowotne działanie na ludzki organizm. Liczne badania dowodzą, że skuteczność działania probiotyków na przewód pokarmowy człowieka w dużym stopniu zależy od doboru właściwego szczepu oraz dostarczania organizmowi w sposób systematyczny odpowiedniej liczby żywych komórek. Uznaje się, że spożycie probiotyków w ilości 10^6 – 10^9 komórek na dobę jest minimalną skuteczną dawką terapeutyczną (3, 4).

Istnieje szereg czynników mających wpływ na przeżywalność probiotyków w przewodzie pokarmowym człowieka. Należą do nich m.in. rodzaj oraz stan fizjologiczny użytego szczepu, zastosowany nośnik prebiotyku (np. składniki pokarmowe), dodatek odpowiednich prebiotyków. Ważne są również czynniki zewnętrzne, jakim poddawany jest produkt po zaszczepieniu bakteriami starterowymi, tj. warunki technologiczne, fermentacja, chłodnicze przechowywanie, stężenie jonów wodorowych, aktywność wody i potencjał oksydoredukcyjny.

W pracy określono wpływ trzech czynników (wielkości porcji mleka, zawartości tłuszczu i wielkości dodatku prebiotyku) na przeżywalność probiotycznego szczepu bifidobakterii w warunkach symulujących sok żołądkowy i trzustkowy.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono z użyciem probiotycznego szczepu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Chr. Hansen, Polska). Bakterie wykorzystano do otrzymania porcji 40 cm³ i 80 cm³ mleka fermentowanego (o zawartości tłuszczu 0,5; 2,0 i 3,2%) z dodatkiem określonej ilości prebiotyku (0, 1, 2, 3 i 5% handlowego preparatu FibreGum, zawierającego rozpuszczalny błonnik pokarmowy uzyskiwany z gumy akacjowej pochodzącej z drzew akacji afrykańskiej, firmy Bart Polska). Próbkę mleka fermentowano przez 4 godz. w temp. 37°C ±1.

Otrzymane porcje mleka fermentowanego dodawano do 40 cm³ modelowego soku żołądkowego i przetrzymywano przez 2 godz. w temp. 37°C. Skład soku żołądkowego został zaczerpnięty z publikacji *Clavel'a* i współpr. (5). Bezpośrednio przed doświadczeniami, do soku żołądkowego dodawano krystalicznej pepsyny (Sigma-Aldrich) w ilości 6 mg na 40 cm³ soku. Natychmiast po zmieszaniu 40 cm³ lub 80 cm³ mleka fermentowanego z 40 cm³ modelowego soku żołądkowego pobierano niewielką próbkę do oznaczania liczby żywych komórek bakterii. Te same czynności wykonywano po zakończeniu okresu inkubacji mleka fermentowanego w modelowym soku żołądkowym. Posiewy wykonywano z zastosowaniem metody płytkowej (inkubacja posiewów w MRS Agar w temp. 37°C przez 72 godz.).

Następnie mieszaninę przenoszono do 40 cm³ modelowego soku trzustkowego i przetrzymywano w temp. 37°C przez 4 godz. Skład soku trzustkowego zaczerpnięto z publikacji *Martreau* i współpr. (6). Bezpośrednio przed wykonaniem doświadczeń, do 40 cm³ modelowego soku trzustkowego dodawano zawartość dwóch kapsułek preparatu farmaceutycznego Kreon® 10000 (Solvay Pharmaceutical) zawierającą enzymy trzustkowe. Natychmiast po zmieszaniu płynów pobierano niewielką próbkę do oznaczania liczby żywych komórek bakterii. To samo czyniono po 4 godz. przetrzymywania w temp. 37°C.

Analizę statystyczną (wieloczynnikową analizę wariancji) przeprowadzono za pomocą programu statystycznego Statgraphics v.4.1, przy poziomie istotności $\alpha=0,05$ i $\alpha=0,01$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wykorzystany w badaniach szczep bifidobakterii jest powszechnie uznawany za kulturę probiotyczną i posiada także doskonale udokumentowany pozytywny wpływ na zdrowie człowieka. Korzystnie wpływa na system immunologiczny człowieka, minimalizuje problemy żołądkowe takie, jak biegunka, a także poprawia proces leczenia zapaleń skóry u dzieci.

Początkowa liczba komórek bakterii szczepu *Bif. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 we wszystkich próbkach mleka fermentowanego wynosiła średnio 8,7 log jtk/cm³ ± 0,3. Po dwóch godzinach przetrzymywania w zawieszynie modelowego soku żołądkowego, w temp. 37°C, liczba żywych komórek bifidobakterii wyniosła średnio 8,7 log jtk/cm³ ± 0,3, niezależnie od wielkości porcji mleka zmieszanego z modelowym sokiem żołądkowym ($p = 0,3502$), zawartości w nim tłuszczu ($p = 0,2686$) oraz ilości dodanego błonnika ($p = 0,5977$).

Po zmieszaniu zawiesiny z modelowym sokiem trzustkowym, populacja bifidobakterii uległa nieznacznemu zmniejszeniu (średnio do $8,6 \log \text{ jtk/cm}^3 \pm 0,3$), na skutek rozcieńczenia płynami. Po 4 godz. inkubacji mieszaniny w temp. 37°C , liczba żywych komórek bifidobakterii nie uległa statystycznie istotnej zmianie, niezależnie od wielkości porcji mleka zmieszanego z modelowym sokiem żołądkowym ($p = 0,4547$), zawartości w nim tłuszczu ($p = 0,5084$) oraz ilości dodanego błonnika ($p = 0,8908$).

Oporność probiotyków na warunki panujące w żołądku jest różna, w zależności od gatunku i szczepu. Zwykle bakterie rodzaju *Bifidobacterium* wykazują wysoką oporność na kwasy (7, 8). Izquierdo i współpr. (9) określili oporność 8 szczepów *Bifidobacterium longum* na symulowane warunki żołądkowo-jelitowe. Okazało się, że komórki szczepu *Bif. longum* NCC 2705 o udokumentowanych właściwościach probiotycznych, wykazały najwyższą oporność na warunki panujące w żołądku i jelitach, podczas gdy komórki szczepów *Bif. longum* BB 536 i SP 07/3 były najmniej odporne. Z kolei Masco i współpr. (10) przeanalizowali 42 szczepy rodzaju *Bifidobacterium* wyizolowane z ludzkiego przewodu pokarmowego oraz 24 izolaty z produktów probiotycznych pod kątem oporności na warunki panujące w żołądku i jelitach. Spośród wszystkich przebadanych szczepów, największym poziomem przeżywalności w tych warunkach wykazały komórki szczepów *Bif. animalis* subsp. *lactis*.

Analiza statystyczna wyników przeżywalności, otrzymanych w niniejszej pracy, potwierdziła, że podczas przetrzymywania mleka fermentowanego w modelowym soku żołądkowym nie następuje istotna redukcja populacji żywych komórek szczepu *Bif. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, a więc przeżywalność tych bakterii w modelowym soku żołądkowym jest na wysokim poziomie. Wynika z tego, że kwaśne środowisko, jakie panuje w żołądku, nie ma istotnego wpływu na populację żywych komórek tego szczepu, jeśli są one wprowadzone z pokarmem. Jest to potwierdzeniem tezy wysuniętej przez Lankaputhra i Shah (11). Inne wyniki uzyskali Berrada i współpr. (12), badając oporność komórek 2 kultur *Bifidobacterium*, zaszczerpionych w mleku fermentowanym, na warunki panujące w ludzkim przewodzie pokarmowym, zaobserwowali redukcję liczby żywych komórek już po 90 min inkubacji w środowisku symulującym warunki panujące w żołądku (o pH 3,0). Świadczy to o tym, że nie wszystkie bakterie rodzaju *Bifidobacterium* są odporne na warunki panujące w soku żołądkowym.

Co ważniejsze, niniejsze badania dowiodły, że składniki pokarmu takie, jak tłuszcz czy prebiotyki oraz wielkość porcji mleka, nie zmieniają tej przeżywalności.

Innym ważnym czynnikiem mającym wpływ na przeżywalność komórek bakteryjnych w układzie pokarmowym człowieka jest obecność soli żółciowych wykazujących efekt bakteriobójczy, co prowadzi do zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych. Hydroliza soli kwasów żółciowych, katalizowana przez enzym BSH (hydrolazę soli żółciowych, *bile salt hydrolase*) stanowi prawdopodobnie mechanizm obronny przed toksycznym działaniem soli żółciowych obecnych w naturalnym środowisku bytowania *Bifidobacterium* (7, 8, 9, 13).

Bez wątpienia znaczący wpływ na przeżywalność komórek bakteryjnych w środowisku jelit ma nośnik, w którym bakterie są zawieszane. Jak wiadomo, produkty nabiałowe mają zdolność buforowania pH, dzięki czemu mają właściwości ochron-

ne. Znajduje to potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych przez *Charteris* i współpr. (14). Analizowali oni wpływ m.in. białek mleka na żywotność komórek bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* podczas symulowanego tranzytu przez przewód pokarmowy człowieka. Dodatek białek mleka polepszył przeżywalność bakterii podczas żołądkowego tranzytu. W obecności kazeinianu sodu, izolowanego białka serwatkowego oraz kombinacji tych dwóch składników, szczep *Bif. infantis* 25962 wykazał się 100% tolerancją na warunki panujące w żołądku.

Zgodnie z analizą statystyczną przeprowadzoną w pracy, nie stwierdzono zmian w liczebności komórek bakterii szczepu *Bif. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 podczas inkubacji w symulowanym soku trzustkowym. Ponadto, ani wielkość porcji mleka, ani zawartość tłuszczu, ani dodatek prebiotyku nie wpłynęły różnicująco na przeżywalność komórek bifidobakterii w modelowym soku trzustkowym. Jak wiadomo podstawą mechanizmu działania prebiotyków jest modulacja składu mikroflory przewodu pokarmowego, co prowadzi do zwiększenia liczebności i aktywności komórek pożądaných bakterii jelitowych.

WNIOSKI

1. Komórki szczepu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 okazują się być odporne na warunki panujące w modelowym soku żołądkowym i modelowym soku trzustkowym. Dla ich przeżywalności nieistotne są wielkość porcji mleka fermentowanego, w którym są zawieszone, oraz zawartość tłuszczu w mleku.

2. Dodatek prebiotyku (błonnik rozpuszczalnego) do mleka fermentowanego również nie wpływa różnicująco na przeżywalność komórek bifidobakterii szczepu Bb-12 w modelowym soku żołądkowym i modelowym soku trzustkowym.

M. Ziarno, D. Zaręba, D. Jamiołkowska

THE STUDY ON THE FACTORS INFLUENCING THE VIABILITY OF LAB IN CONDITIONS SIMULATING GASTROINTESTINAL TRACT

Summary

The aim of this work was to determine of influence of three factors (fermented milk portion, fat content in milk, and prebiotic addition) on the viability of probiotic strain *Bif. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 *in vitro* condition simulating gastric and intestinal juices. Strain Bb-12 was applied to produce fermented milk, with different fat content (0.5, 2.0, and 3.2%) and with prebiotic addition (0, 1, 2, 3, and 5% of commercial soluble fibre formula). Statistical analysis of results proved that during the incubation of fermented milk in artificial gastric or intestinal juices the reduction of bifidobacteria Bb-12 population was not significant. Studied factors: fermented milk portion, fat content in milk, and prebiotic addition were not statistically important to viability of bifidobacteria Bb-12.

PIŚMIENNICTWO

1. *Guraner F, Malagelada J.R.*: Lancet, 2003; 361: 512-519. – 2. *Kordyl M, Libudzisz Z.*: Żywnienie Człowieka i Metabolizm, 2006; 33(3): 266-279. – 3. *Kosikowska M, Jakubczyk E.*: Przegląd Mleczarski, 2000; (10): 334-337. – 4. *Szajewska H, Setty M, Mrukowicz J, Guandalini S.*: Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2006; 42(5): 454-475. – 5. *Clavel T., Carlin F., Lairon D., Nguyen-The C.*,

Schmitt P.: Journal of Applied Microbiology, 2002; 97(1): 214-219. – 6. *Marteau P., Minekus M., Havenaar R., Huis In't Veld J.H.*: Journal of Dairy Science, 1997; 80(6): 1031-1037. – 7. *Vinderola C.G., Reinheimer J.A.*: Food Research International, 2003; 36(9): 895-903. – 8. *Ziarno M., Margol B.*: Żywność, 2007; 6(55): 304-314. – 9. *Izquierdo E., Medina M., Ennahar S., Marchioni E., Sanz Y.*: Current Microbiology, 2008; 56(6): 613-618. – 10. *Masco L., Crockaert C., Van Hoorde K., Swings J., Huys G.*: Journal of Dairy Science, 2007; 90(8): 3572-3578.

11. *Lankaputhra W.E., Shah N.P.V.*: Cultured Dairy Products Journal, 1995; 30(3): 2-6. – 12. *Berrada N., Lemeland J.F., Laroche G., Thouvenot P., Piaia M.*: Journal of Dairy Science, 1991; 74(22): 409-413. – 13. *Liu Z., Jiang Z., Zhou K., Li P., Liu G., Zhang B.*: Anaerobe, 2007; 13(5-6): 215-219. – 14. *Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K.*: Journal of Applied Microbiology, 1998; 84(5): 759-768.

Adres: 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159 C.