

DOROTA ZARĘBA, MAŁGORZATA ZIARNO, BEATA STRZELCZYK

PRZEŻYWALNOŚĆ BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ W WARUNKACH MODELOWYCH JELITA CIENKIEGO

Streszczenie

Celem pracy było określenie czy komórki bakterii fermentacji mlekowej, wchodzące w skład komercyjnych mleczarskich kultur starterowych, są zdolne do przeżycia w środowisku symulującym warunki panujące w jelicie cienkim i czy obecność cholesterolu wpływa na ich przeżywalność. Materiałem do badań było siedem szczepów bakterii fermentacji mlekowej (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus* i *Bif. animalis* subsp. *lactis*), trzy jogurtowe kultury starterowe, sześć serowarskich kultur starterowych oraz trzy kefirowe kultury starterowe. Badania polegały na hodowli szczepów bakterii fermentacji mlekowej w modelowym soku jelitowym: bez i z dodatkiem cholesterolu w temp. 37 °C przez 5 h oraz oznaczeniu metodą płytkową liczby żywych komórek przed i po inkubacji. Bakterie wchodzące w skład mezofilnych szczepionek mleczarskich wykazały podobną oporność na warunki modelowego soku jelitowego, co termofilne bakterie fermentacji mlekowej, w tym badane szczepy probiotyczne. Dodatek cholesterolu do modelowego soku jelitowego nie wpływał istotnie na przeżywalność badanych bakterii. Nie stwierdzono również istotnej różnicy pomiędzy przeżywalnością *Lactococcus* sp., *Str. thermophilus* i *Lactobacillus* sp.

Słowa kluczowe: bakterie fermentacji mlekowej, kultury starterowe, przeżywalność, sok jelitowy

Wprowadzenie

Od wielu lat realizowane są badania nad przeżywalnością różnych szczepów bakterii fermentacji mlekowej w układzie trawiennym człowieka i ich zdolnością do adhezji do nabłonka jelit [2, 3, 4, 5, 10, 11]. Wiadomo, że jednym z istotnych zagrożeń dla bakterii są warunki panujące w jelicie cienkim, m.in. obecność soli żółciowych, toksycznie działających na komórki bakteryjne [1, 2, 13, 20]. Czas przebywania pokarmu w jelicie cienkim szacuje się średnio na 3 h. Lankaputhra i Shah [8] zaobserwowali różną przeżywalność szczepów rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, które zawieszono w podłożu zawierającym do 1,5 % żółci. Z kolei Noh i wsp. [14] stwierdzili

Mgr inż. D. Zaręba, dr inż. M. Ziarno, mgr inż. B. Strzelczyk, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

uszkodzenia komórek szczepów *Lb. acidophilus* i lizę tych komórek podczas hodowli w środowisku zawierającym dodatek 0,3 % żółci.

Jak wiadomo, wiele czynników wpływa na żywotność komórek bakteryjnych w warunkach jelitowych: kwasowość, obecność soli żółciowych, obecność składników pokarmowych, czas pasażu bakterii przez układ pokarmowy i ich liczba początkowa. Nieliczne dane literaturowe wskazują, że także cholesterol może zwiększać przeżywalność komórek bakteryjnych w jelitach [16]. Obecność cholesterolu sprawia, że bakterie mlekowe stają się bardziej odporne na lizę niż te rosnące przy jego braku. Związek ten powoduje także zmianę chemicznego składu i funkcjonowania ściany i błony komórkowej bakterii fermentacji mlekowej, tym samym powodując zwiększenie tolerancji na czynniki środowiskowe [16, 19].

Celem pracy było określenie czy komórki bakterii fermentacji mlekowej, wchodzące w skład komercyjnych mleczarskich kultur starterowych, są zdolne do przetrwania w środowisku symulującym warunki panujące w jelicie cienkim i czy obecność cholesterolu wpływa na ich przeżywalność.

Material i metody badań

Materiałem do badań było siedem szczepów bakterii fermentacji mlekowej (dwa szczepy *Lb. acidophilus*, dwa szczepy *Lb. casei*, jeden szczep *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, jeden szczep *Str. thermophilus* i jeden szczep *Bif. animalis* subsp. *lactis*), trzy jogurtowe kultury starterowe (zawierające *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Str. thermophilus*), sześć serowarskich kultur starterowych (zawierających mezofilne paciorkowce mlekowe *Lactococcus*) oraz trzy kefirowe kultury starterowe. Przed doświadczeniami kultury były namnażane w bulionie MRS (w przypadku pałeczek lub bifidobakterii) lub bulionie M17 (w przypadku paciorkowców i kultur kefirowych). Hodowle prowadzono przez 18 h w temp. 37 °C (w przypadku termofilnych bakterii) lub w temperaturze 30 °C (w przypadku kultur mezofilnych).

Modelowy sok jelitowy składał się z NaCl (5,0 g/dm³), KCl (0,6 g/dm³), CaCl₂ (0,25 g/dm³) i żółci wołowej (8,5 g/dm³) rozpuszczonych w 1M NaHCO₃ [10]. Wartość pH modelowego soku jelitowego wynosiło 7,2. Po sterylizacji w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 20 min, do 50 cm³ modelowego soku jelitowego dodawano zawartość dwóch kapsułek farmaceutycznego preparatu Kreon® 10 000 (Solvay Pharmaceuticals). Jedna kapsułka preparatu zawiera 150 mg pankreatyny z trzustek wołowych o aktywności 10 000 jednostek FIP lipazy, 8 000 jednostek FIP amylazy, 600 jednostek FIP proteazy. Cholesterol (Sigma-Aldrich) o czystości chemicznej >99 % rozpuszczono w mieszaninie 99 % etanolu i Tweenu 80, wymieszanych w proporcji 3:1. Dodatek cholesterolu wynosił 0,5 - 0,7 g/dm³.

Badania polegały na inkubacji szczepów bakterii fermentacji mlekowej w modelowym soku jelitowym: bez i z dodatkiem cholesterolu w temp. 37 °C przez 5 h oraz

oznaczeniu metodą płytkową liczby żywych komórek przed i po inkubacji. Liczbę pałeczek mlekowych oznaczano w podłożu MRS agar (Merck), zaś liczbę paciorkowców mlekowych w podłożu M17 agar (Merck). Płytki z posiewami inkubowano w temp. 37 °C przez 72 h (w przypadku termofilnych pałeczek mlekowych) lub w temp. 37 °C przez 48 h (w przypadku termofilnych paciorkowców) albo w temp. 30 °C przez 72 h (w przypadku bakterii mezofilnych), w warunkach tlenowych (rodzaju *Lactococcus*, gatunku *Str. thermophilus*) lub beztlenowych (rodzajów *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*). Wynik podawano w jednostkach tworzących kolonie (jtk) w przeliczeniu na 1 cm³ hodowli.

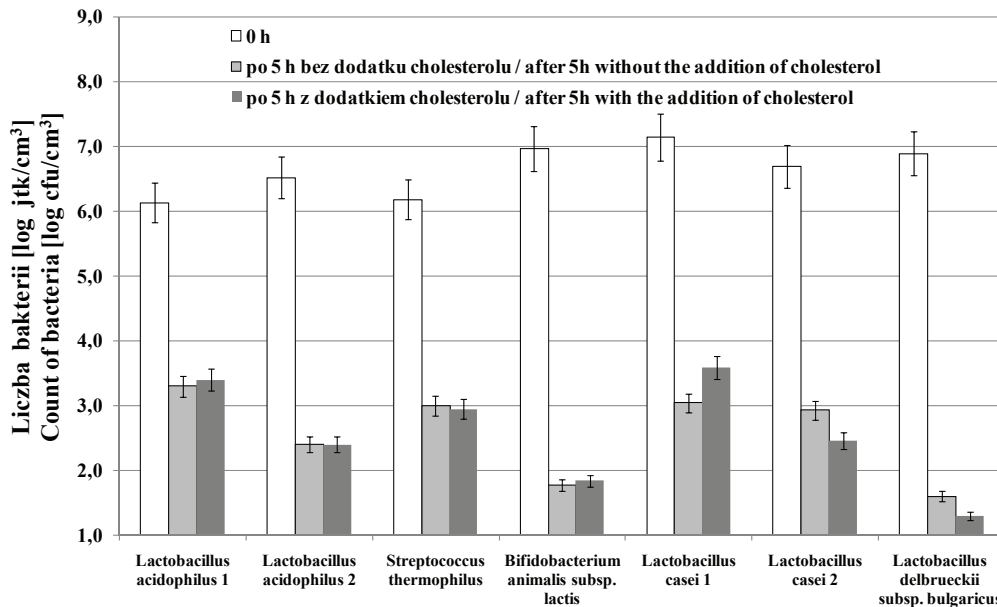
Badania przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną (wieloczynnikową ANOVA przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) otrzymanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu komputerowego Statgraphics Plus 4.1.

Wyniki i dyskusja

Początkowa liczba żywych komórek bakterii fermentacji mlekowej w modelowym soku jelitowym wyniosła $1,0 \times 10^6 - 1,6 \times 10^7$ jtk/cm³ i po 5 h inkubacji zmniejszyła się do $2,0 \times 10^1 - 4,0 \times 10^3$ jtk/cm³, bez względu na obecność cholesterolu (rys. 1). Zarówno w modelowym soku jelitowym z dodatkiem cholesterolu, jak i modelowym soku jelitowym bez tego dodatku, najlepiej przeżyły komórki *Lb. acidophilus* 1, chociaż różnice w przeżywalności nie zależały od gatunku badanych bakterii fermentacji mlekowej (p-Value = 0,5207). Wykazano także, że dodatek cholesterolu do modelowego soku jelitowego nie wpłynął statystycznie istotnie (p-Value = 0,5729) na przeżywalność badanych szczepów *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus* i *Bif. animalis* subsp. *lactis*.

Bakterie fermentacji mlekowej tradycyjnie stosowane do wyrobu mlecznych produktów fermentowanych są najczęściej uważane za słabo tolerujące warunki panujące w przewodzie pokarmowym. Jednak w dostępnej literaturze są przytaczane wyniki badań odnoszących się tylko do pojedynczych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, szczególnie szczepów probiotycznych [2, 5, 11, 12, 19]. Przeżywalność omawianych komórek bakterii jest ograniczona głównie niskimi wartościami pH środowiska, w jakim komórki bakterii się znajdują [9, 15]. Może to sugerować, że komórki bakterii fermentacji mlekowej powinny dobrze znieść warunki panujące w modelowym soku jelitowym, którego pH jest bliska wartości neutralnej [11]. Jednak sole żółciowe obecne w jelitach mogą być toksyczne dla komórek bakteryjnych. Taranto i wsp. [16] wykazali, że komórki bakteryjne rosnące w obecności cholesterolu są bardziej odporne na lizę niż rosnące przy braku tego związku. Cytowani autorzy stwierdzili, że dodatek cholesterolu do hodowli spowodował wzrost zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych w ścianie komórkowej *Lb. reuteri* CRL 1098 z 44,3 do 56,5 % łącznej ilości

kwasów, oraz kwasów nienasyconych z 1,26 do 43,5 % łącznej ilości kwasów tłuszczowych.



Rys. 1. Kształtowanie się liczby żywych komórek bakterii mlekowych po 5 h inkubacji w modelowym soku jelitowym z i bez dodatku cholesterolu (wartości średnie i odchylenia standardowe).

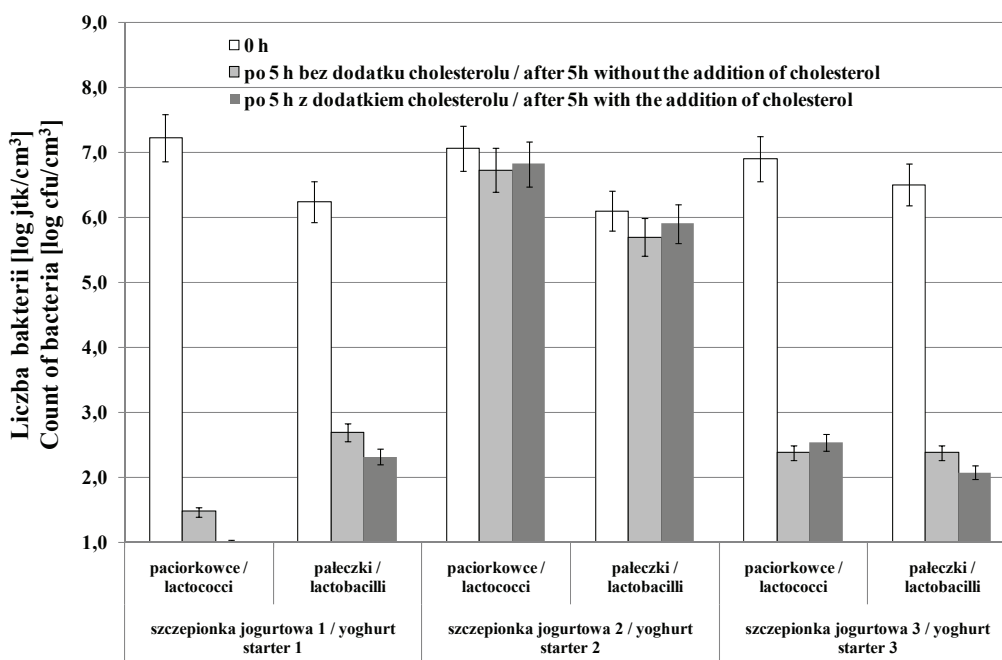
Fig. 1. Count of live lactic bacteria cells after 5 h incubation in model intestine juice with and without the addition of cholesterol (mean values and standard deviation).

Niewiele jest publikacji na temat wpływu cholesterolu na przeżywalność komórek bakterii fermentacji mlekowej w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka [7, 20]. Kimoto i wsp. [7] zaobserwowali, że obecność cholesterolu stymulowała wzrost komórek szczepu *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7. Cytowani badacze stosowali podłoże płynne GM17-THIO zawierające dodatkowo 0,2% taurocholalanu sodu, który mógł wpłynąć na uzyskane wyniki. Z kolei, jak wykazali Ziarno i Bartosz [18], przeżywalność kultur bakterii jogurtowych proporcjonalnie zależy od początkowej liczby komórek bakteryjnych zawieszonych w modelowym soku jelitowym.

Również po 5 h inkubacji jogurtowych kultur starterowych w modelowym soku jelitowym nie wykazano wpływu dodatku cholesterolu na przeżywalność (p-Value = 0,9727) (rys. 2). Stwierdzono brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy przeżywalnością *Str. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (p-Value = 0,2198). Początkowa liczba żywych komórek paciorkowców wyniosła $7,9 \times 10^6 - 2,0 \times 10^7$ jtk/cm³, zaś pałeczek mlekowych $1,3 \times 10^6 - 4,0 \times 10^6$ jtk/cm³. Po zakończeniu inkubacji w soku

jelitowym odnotowano zmniejszenie liczby żywych paciorkowców do $1,0 \times 10^1 - 6,3 \times 10^6$ jtk/cm³ oraz komórek pałeczek mlekowych do $1,3 \times 10^2 - 7,9 \times 10^5$ jtk/cm³.

Wykazano więc, że bakterie jogurtowe są wrażliwe na modelowy sok jelitowy, ale istnieje duże zróżnicowanie pomiędzy badanymi szczepami, co potwierdziła analiza statystyczna wyników (p-Value = 0,0004). Bakterie wchodzące w skład kultury starterowej 2 najlepiej tolerowały warunki panujące w modelowym soku jelitowym.



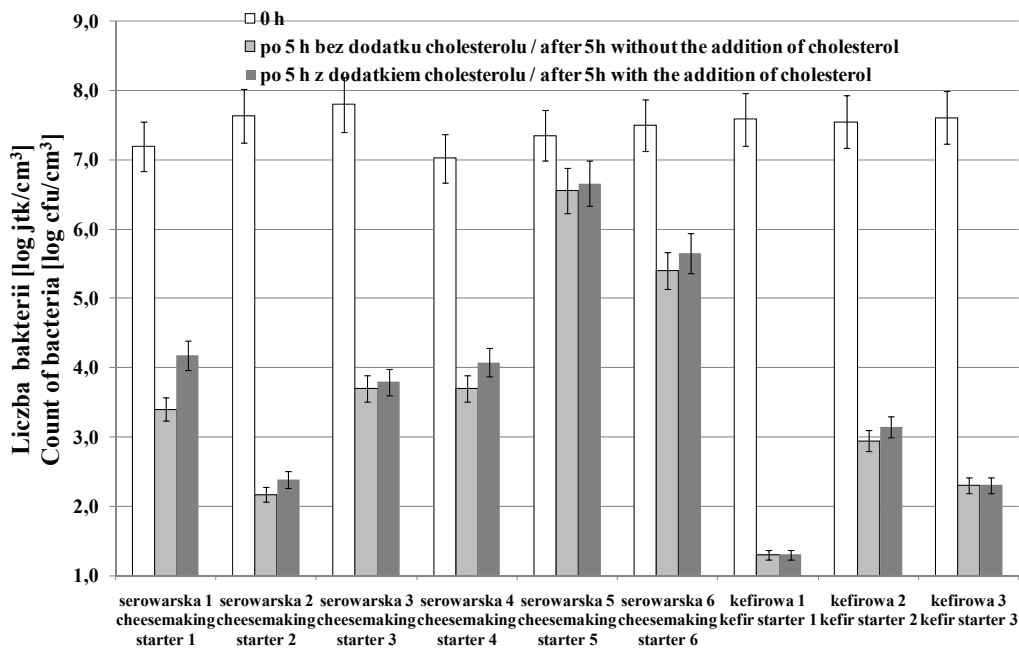
Rys. 2. Kształtowanie się liczby żywych komórek bakterii jogurtowych po 5 h inkubacji w modelowym soku jelitowym z i bez dodatku cholesterolu (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Fig. 2. Count of live yoghurt bacteria cells after 5 h incubation in model intestine juice with and without the addition of cholesterol (mean values and standard deviation).

Ziarno i Bartosz [18] wykazali, że szczepy *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* lepiej przeżywały w środowisku modelowego soku jelitowego niż szczepy *Str. thermophilus*. Badacze nie stwierdzili żywych komórek *Str. thermophilus* w 1 cm³ modelowego soku jelitowego po 5 h inkubacji, mimo że początkowa liczba żywych komórek streptokoków wynosiła średnio $2,5 \times 10^7$ jtk/cm³. Również inne dane literaturowe dowodzą, że bakterie te nie wykazują oporności na sok jelitowy [6]. Elli i wsp. [4] wykrywali żywe komórki *Str. thermophilus* w końcowej części przewodu pokarmowego oraz odchodach pobieranych od ohotników, którym podawano jogurt zawierający żywe bakterie fermentacji mlekowej. Jednak badania Ziarno [20] dowiodły, że stopień

przeżycia bifidobakterii, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*, *Lactococcus lactis* i *Streptococcus thermophilus* w modelowym soku z dwunastnicy zależał od początkowej liczby badanych bakterii. Im wyższa była początkowa liczba wprowadzonych bakterii, tym więcej ich przeżywało w modelowym soku z dwunastnicy.

Zaobserwowano, że bakterie wchodzące w skład szczepionki serowarskiej nr 5 znacznie lepiej tolerowały sok jelitowy niż komórki pozostałych szczepionek serowarskich (rys. 3). Po 5 h inkubacji w modelowym soku jelitowym liczba żywych komórek bakterii wyniosła średnio $4,1 \times 10^6$ jtk/cm³, niezależnie od dodatku cholesterolu. Dla porównania, po 5 h inkubacji pozostałych kultur serowarskich liczba żywych bakterii obniżyła się do $1,6 \times 10^2$ - $4,0 \times 10^5$ jtk/cm³. Otrzymane wyniki są potwierdzeniem badań *in vitro* prowadzonych przez Madureira i wsp. [9].



Rys. 3. Kształtowanie się liczby żywych komórek paciorkowców po 5 h inkubacji w modelowym soku jelitowym z i bez dodatku cholesterolu (wartości średnie i odchylenia standardowe).

Fig. 3. Count of *Lactococcus* cells after 5h incubation in simulated duodenal fluid with and without cholesterol addition (mean values and standard deviation).

Analiza statystyczna potwierdziła, że dodatek cholesterolu do modelowego soku jelitowego nie wpłynął istotnie na przeżywalność komórek bakterii (p-Value = 0,3025). Liczba żywych bakterii badanych szczepionek przetrzymywanych w modelowym soku jelitowym zmniejszyła się statystycznie istotnie po 5 h (p-Value = 0,0001).

Nie zaobserwowano także żadnego wpływu dodatku cholesterolu na przeżywalność kultur kefirowych, która wyniosła średnio 0,0001 %.

Lactococcus są typowymi kulturami starterowymi wykorzystywanymi do produkcji serów, maślanki i kefiru. Pomimo tego, dane literaturowe na temat badań przeżywalności tych bakterii w warunkach przewodu pokarmowego człowieka są skromne. Vinderola i Reinheimer [17] wykazali, że *L. lactis* są odporne na działanie soli żółciowych, bowiem rosły w ich obecności, mimo że nie zaobserwowano zdolności do ich dekonjugacji.

Wyniki niniejszej pracy potwierdziły, że zarówno bakterie probiotyczne, jak i mezofilne oraz termofilne wchodzące w skład szczepionek mleczarskich w podobnym stopniu tolerują modelowy sok jelitowy. Zdolność ich przeżycia była jednak zależna od szczepu bakterii.

Wnioski

1. Bakterie jogurtowe *Str. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* oraz bakterie mezofilne wchodzące w skład mezofilnych szczepionek mleczarskich są zdolne do przeżycia w środowisku symulującym warunki panujące w jelicie cienkim.
2. Stopień przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej jest specyficzną cechą szczepu, a nie gatunku bakterii i jego profilu temperaturowego.
3. Dodatek cholesterolu do modelowego soku jelitowego nie wpływa istotnie na przeżywalność komórek bakterii fermentacji mlekowej.

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

Literatura

- [1] Bezkorovainy A.: Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, **73** (2 suppl), 399-405.
- [2] Brink M., Todorov S.D., Martin J.H., Senekal M., Dicks L.M.T.: The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. *J. Appl. Microbiol.*, 2006, **100**, 813-820.
- [3] Czaczyk K., Olejnik A., Mięzał P., Grajek W.: Poszukiwanie prostych modeli do badania adhezji bakterii probiotycznych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **1** (42) 84-96.
- [4] 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.
- [5] Galdeano C.M., Perdigon G.: Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J. Appl. Microbiol.*, 2004, **97**, 673-681.

- [6] 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.
- [7] Kimoto H., Ohmomo S., Okamoto T.: Cholesterol removal from media by lactococci. J. Dairy Sci., 2002, **85**, 3182-3188.
- [8] Lankaputhra W.E.V., Shah N.P.: Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* in the presence of acid and bile salts. Cult. Dairy Prod. J, 1995, **30**, 2-6.
- [9] Madureira A.R., Pereira C.I., Truszkowska K., Gomes 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.
- [10] 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.
- [11] Masco L., Crockaert C., Van Hoorde K., Swings J., Huys G.: *In vitro* assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium*. J. Dairy Sci., 2007, **90** (8), 3572-3578.
- [12] 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.
- [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] Noh D.O., Kim S.H., Gilliland S.E.: Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. J. Dairy Sci., 1997, **80**, 3107-3113.
- [15] Oozer 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.
- [16] Taranto M.P., Murga M.L.F., Lorca G., Valdez G.F.: Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid membrane of *Lactobacillus reuteri*. J. Appl. Microbiol., 2003, **95**, 86-91.
- [17] 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.
- [18] Ziarno M., Bartosz P.: Badania nad wiązaniem cholesterolu przez bakterie jogurtowe w modelowym soku jelitowym. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2007, **4** (53), 126-138.
- [19] Ziarno M.: Mechanizmy obniżania poziomu cholesterolu przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Żywnienie Człowieka i Metabolizm, 2004, **31**, 172-180.
- [20] Ziarno M.: Survival of lactic acid bacteria in simulated duodenal fluid depending on the cholesterol presence. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2007, **57** (4C), 625-631.

VIABILITY OF LACTIC ACID BACTERIA UNDER THE MODEL CONDITIONS OF SMALL INTESTINE

Summary

The objective of this study was to determine whether or not cells of the lactic acid bacteria, contained in the commercial dairy starter cultures, were able to survive in the environment simulating the conditions in small intestine and whether or not the presence of cholesterol impacted their viability. The material studied were seven strains of lactic acid bacteria (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus* i *Bif. animalis* subsp. *lactis*), three yoghurt starter cultures, six cheese starter cul-

tures, and three kefir starter cultures. The study consisted in culturing strains of lactic acid bacteria in model intestine juice without and with the addition of cholesterol, at 37°C for 5 h, and in determining the count of lactic acid bacteria using a plate method prior to and after the incubation. Bacteria contained in the mesophilic, diary starter cultures showed a similar resistance to the conditions of the model intestine juice as thermophilic lactic acid bacteria, including the probiotic strains studied. The addition of cholesterol to the model intestine juice did not significantly impact the viability of lactic acid bacteria under investigation. No significant difference between the viability of *Lactococcus* sp., *Str. thermophilus*, and *Lactobacillus* sp. was reported.

Key words: lactic acid bacteria, starter cultures, viability, intestine juice ☒