

WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI PROBIOTYCZNE SZCZEPÓW *LACTOBACILLUS PLANTARUM* I MOŻLIWOŚCI ICH WYKORZYSTANIA W PRODUKCJI BIOAKTYWNYCH NAPOJÓW SŁODOWYCH

Joanna Kraszewska, Wiesław Wzorek, Eliza Sztando
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Celem pracy była ocena przeżywalności wybranych szczepów *Lactobacillus plantarum* w brzeczce napoju słodowego o pH 2,0 i 2,5 oraz w roztworze dezoksychołanu sodu o stężeniu 1, 2 i 3 mmol/dm³. Po 6 h inkubacji w pH 2,5 stwierdzano jeszcze żywe komórki stosowanych szczepów w ilości 10⁶-10⁷ jtk/cm³, a dla pH 2,0 – w ilości 10²-10³ jtk/cm³ (ilość wyjściowa około 10⁸ jtk/cm³). Badane szczepy *L. plantarum* przeżywały w środowisku roztworu dezoksychołanu sodu o stężeniu 1, 2 i 3 mmol/dm³ i po 24 h inkubacji, w środowisku najbardziej stężonego roztworu, stwierdzano jeszcze obecność żywych bakterii w ilości 10¹-10⁵ jtk/cm³. Po inkubacji kombinowanej, 4 h w brzeczce o pH 2,0, a następnie po doprowadzeniu do pH 8,0 oraz w roztworze dezoksychołanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm³ przez 24 h, w próbkach znajdowały się jeszcze żywe komórki bakterii w ilości 10¹-10² jtk/cm³.

Słowa kluczowe: bakterie fermentacji mlekowej, probiotyki, napój słodowy, napój bioaktywny, przeżywalność, niskie pH, dezoksychołan sodu

WSTĘP

Według aktualnej definicji probiotykiem nazywane są preparaty farmaceutyczne lub produkty żywnościowe zawierające odpowiednią liczbę żywych i aktywnych mikroorganizmów, które podane człowiekowi lub zwierzętom wywierają korzystny wpływ na ich zdrowie [Schrezenmeir i de Vrese 2001].

Minimalna liczba mikroorganizmów, jaką w chwili spożycia powinien mieć produkt uznawany za probiotyczny wynosi wg Desmond i in. [2002] co najmniej 10⁷ komórek/g lub cm³, wg Schillinger [1999] – 10⁵-10⁶ komórek/g, a wg Kristo i in. [2003] – 10⁶ komórek/g.

Adres do korespondencji – Corresponding author: mgr Joanna Kraszewska, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-787 Warszawa, e-mail: koskowska@alpha.sggw.waw.pl

Dobroczynne oddziaływanie produktów probiotycznych polega m.in. na zmniejszeniu częstotliwości występowania biegunek podróznych, łagodzeniu przebiegu niektórych biegunek bakteryjnych i wirusowych, zapobieganiu występowania lub łagodzeniu biegunek poantybiotykowych, zmniejszeniu objawów nietolerancji laktozy, hamowaniu rozwoju mikroorganizmów chorobotwórczych, działaniu hipocholesterolemicznemu, stymulacji systemu odpornościowego, aktywności antykancerogennej i przeciwalergicznnej [Bomba i in. 2002, Kaur i in. 2002, Cebeci i Gürakan 2003, Koop-Hoolihan 2001].

Większość badań i nowo opracowanych technologii z użyciem bakterii mlekowych dotyczy mleknych produktów żywnościowych. Ze względu na stwierdzoną u niektórych osób nietolerancję laktozy, alergię na białka mleka oraz to, iż dieta mleczna nie stanowi podstawy pożywienia dorosłego człowieka, naukowcy starają się wzbogacić asortyment dostępnych produktów o fermentowane wyroby roślinne takie, jak sałatki oraz soki warzywne [Molin 2001, Varnam 2002, Saarela i in. 2000, Roberfroid 2000].

Dobrym substratem do produkcji fermentowanej żywności oraz napojów funkcjonalnych o charakterze probiotycznym są zboża. Są one źródłem sacharydów (np. skrobi) trawionych opornie, ale jednocześnie stymulujących wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* obecnych w okrężnicy [Charalampopoulos i in. 2002, Blandino i in. 2003].

Wzorek i in. [2003] uważają, że produktem pochodzenia roślinnego zawierającym żywe bakterie fermentacji mlekowej może być kwas chlebowy lub podobny napój chłodzący (napój słodowy). Autorzy prowadzili proces fermentacji napoju z użyciem szczepów z gatunku *Lactobacillus plantarum*.

Nadal też są prowadzone badania mające na celu określenie potencjalnych właściwości probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej. W badaniach, które mają określić probiotyczne właściwości badanego szczepu uwzględnia się m. in. pochodzenie, bezpieczeństwo stosowania, odporność na niskie pH i wysokie stężenie soli żółciowych, antagonizm wobec bakterii gnilnych i chorobotwórczych, zdolność adhezji do śluzówki jelita, przeżywalność i aktywność w czasie produkcji oraz przechowywania preparatów lub żywności [Dunne i in. 2001, Tuomola i in. 2001, Mattila-Sandholm i in. 2002].

Jednym z podstawowych kryteriów selekcji szczepów probiotycznych jest zdolność przeżycia w warunkach fizjologicznych organizmu. Bakterie potencjalnie probiotyczne, aby mogły dotrzeć do jelita grubego i tam korzystnie oddziaływać na organizm gospodarza powinny charakteryzować się zdolnością przeżycia podczas procesów trawienia w żołądku i jelicie cienkim [Chou i Weimer 1999]. Pierwszą przeszkodą, jaką powinny pokonać, jest niskie pH żołądka, spowodowane wydzielaniem przez komórki gruczołowe błony śluzowej kwasu solnego oraz enzymów rozkładających pokarm [Hood i Zottola 1988]. Drugą barierę stanowią kwasy żółciowe produkowane w wątrobie z cholesterolu i wydzielane do dwunastnicy [Dunne i in. 2001].

Celem niniejszej pracy było określenie przeżywalności wybranych szczepów z gatunku *Lactobacillus plantarum* w brzezce napoju słodowego w obecności soli żółciowych oraz w niskim pH i określenie możliwości ich ewentualnego wykorzystania w produkcji fermentowanych napojów słodowych.

MATERIAŁY I METODY

Przedmiotem badań były szczepy z gatunku *Lactobacillus plantarum*:

- *Lactobacillus plantarum* 44 pochodzący z Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
- *Lactobacillus plantarum* 299 v o udokumentowanych w literaturze właściwościach probiotycznych, pochodzący z napoju ProViva (Skane Dairy – Szwecja),
- *Lactobacillus plantarum* 1 pochodzący z Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie,
- *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080,
- *Lactobacillus plantarum* NCAIM B.01834,
- *Lactobacillus plantarum* NCAIM B. 01149.

Podłoża

Brzeczke napoju słodowego stosowano do namnażania bakterii mlekowych oraz przygotowania kultur starterowych. W skład brzeczki napoju słodowego wchodził koncentrat brzeczki słodowej (Wytwórnia Ekstraktu Słodowego Wolsztyn) – 29 g/dm³, cukier konsumpcyjny – 50 g/dm³, cukier palony – 40 g/dm³. Brzeczke dopełniano wodą do 1 dm³. Sterylizację przeprowadzano w temperaturze 117°C przez 20 min.

Określenie przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w środowisku o niskim pH

Brzeczke napoju słodowego szczepiono *inoculum* kultury bakteryjnej jednego ze szczepów i namnażano 48 h w temp. 28°C (temperatura optymalna dla *L. plantarum* wynosi 28-32°C). Następnie próbki doprowadzano do pH 2,0 i 2,5 stosując 1 mol/dm³ HCl. Dawkę kwasu ustalano wstępnie metodą potencjometrycznego miareczkowania. Każdą próbkę inkubowano w 37°C przez 6 h. Przeżywalność bakterii określano metodą płytkową na podłożu MRS jako liczbę jednostek tworzących kolonię (jtk/cm³) próbki. Posiewy wykonywano po 0, 1, 2, 3, 4, i 6 h inkubacji. Płytki inkubowano 48 h w 28°C w atmosferze 5% (v/v) CO₂ [Drago i in. 1997, Klewicka i in. 1999].

Określenie przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w roztworze dezoksyholanu sodu

Kolbki zawierające roztwory dezoksyholanu sodu o stężeniu 1, 2 i 3 mmol/dm³ (po 45 cm³) szczepiono 5 cm³ kultury starterowej jednego ze szczepów, doprowadzano 1 mol/dm³ NaOH do pH 8,0 a następnie inkubowano w temp. 37°C przez 24 h. Zdolność przeżycia badanych szczepów w tych warunkach określano na podłożu MRS metodą płytkową. Posiewy wykonywano po 0, 3, 6 i 24 h inkubacji. Płytki inkubowano jak poprzednio.

Określenie przeżywalności szczepów *Lactobacillus plantarum* w pH 2,0 a następnie w roztworze dezoksyholanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm³

Brzeczke napoju słodowego szczepiono odpowiednimi kulturami starterowymi i inkubowano 48 h w temp. 28°C. Po doprowadzeniu próbki do pH 2,0 inkubowano ją w 37°C przez 4 h. Po tym czasie określano przeżywalność stosowanych szczepów tak,

jak poprzednio. Próbki doprowadzano 1 mol/dm³ NaOH do pH 8,0, a następnie 1 cm³ przenoszono do roztworu dezoksyholanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm³ (9 cm³) i nadal inkubowano w tych samych warunkach. Przeżywalność oceniano po 3 i 24 h inkubacji tak, jak poprzednio.

Analiza statystyczna

Wykonano 8 serii doświadczeń, każdą w dwóch powtórzeniach. Wyniki opracowano statystycznie używając programu Statgraphics Plus Ver. 4.1, stosując wieloczynnikową analizę wariancji ($\alpha = 0,05$) i obliczając NIR wg Tuckey'a (jako HSD).

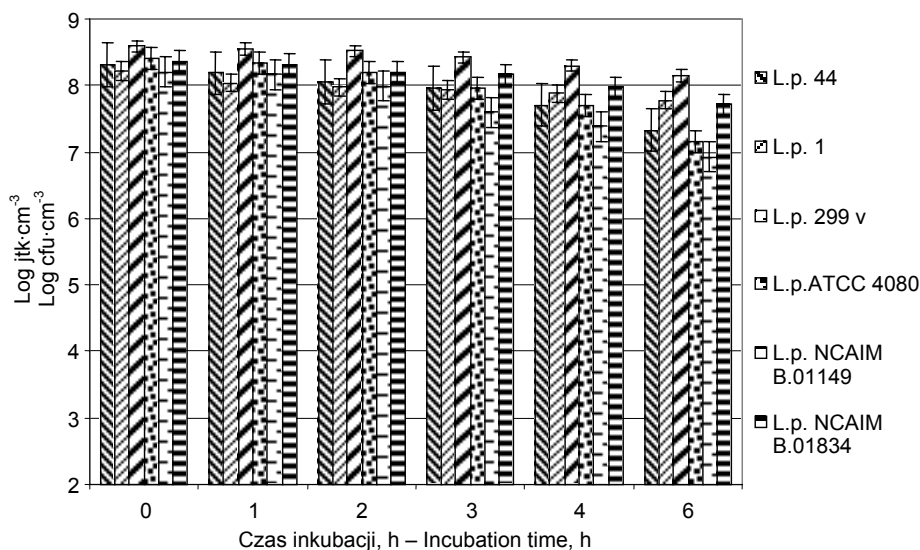
WYNIKI I DISKUSJA

W niniejszych badaniach szczep *L. plantarum* 299 v, ze względu na jego udokumentowane właściwości probiotyczne, został użyty jako szczep kontrolny. Tym niemniej nie znaleziono w dostępnej literaturze danych dotyczących przeżywalności tego szczepu w obecności soli żółciowych oraz w niskim pH.

W badaniach nad przeżywalnością bakterii mlekowych w warunkach podobnych do panujących w żywym organizmie przyjmowane są wartości pH 1,0-5,0. Duże rozbieżności stosowanych warunków wynikają z różnego pH żołądka, które wynosi 1,5-6,0 w zależności od spożytego pokarmu. Najczęściej jednak pH żołądka kształtuje się w zakresie 2,5-3,5 [Huang i Adams 2004].

Wpływ czasu inkubacji badanych szczepów z gatunku *L. plantarum* w brzeczce napoju słodowego o pH 2,5 na liczbę przeżywających komórek przedstawiono na rysunku 1. Stwierdzono, że w trakcie całego okresu inkubacji liczba bakterii dla wszystkich badanych szczepów malała. Ponieważ czas przebywania pokarmu w żołądku wynosi zwykle 2-4 godzin (w zależności od rodzaju posiłku) [Huang i Adams 2004], szczególnie ważna była przeżywalność bakterii po 4 godzinie inkubacji, w której to liczba żywych komórek wszystkich szczepów zmniejszyła się istotnie statystycznie w porównaniu z godziną „0”. Najlepszą przeżywalnością po tym czasie charakteryzował się szczep znajdujący się na liście szczepów probiotycznych – *L. plantarum* 299 v, którego liczba komórek wynosiła średnio $2,0 \times 10^8$ jtk/cm³, podczas gdy w godzinie zerowej – $3,86 \times 10^8$ jtk/cm³. Pozostałe badane szczepy przeżywały w ilości od $2,45 \times 10^7$ do $9,56 \times 10^7$ jtk/cm³ (liczba wyjściowa wynosiła od $1,61 \times 10^8$ do $2,52 \times 10^8$ jtk/cm³). Szczepy te wykazywały duży stopień tolerancji w stosunku do badanego pH. Po dalszej inkubacji (6 h) przeżywalność szczepu *L. plantarum* 299 v nadal była największa, a liczba komórek wynosiła średnio $1,41 \times 10^8$ jtk/cm³. Szczepy *L. plantarum* 44, 1, ATCC 4080 i NCAIM B.01834 po 6 h charakteryzowały się liczbą komórek przeżywających około 10^7 jtk/cm³. Najbardziej wrażliwy okazał się szczep *L. plantarum* NCAIM B.01149, którego liczba komórek wynosiła średnio $8,4 \times 10^6$ w cm³.

Charalampopoulos i in. [2003] badali przeżywalność *L. plantarum* na podłożach o pH 2,5 zawierających jeden z ekstraktów: słodowy, pszeniczny lub jęczmienny. Stwierdzili, iż dodatek ekstraktów zbożowych działa ochronnie na komórki bakterii mlekowych, zwiększając ich przeżywalność w środowisku o niskim pH. Po 6-godzinnej inkubacji liczba żywych komórek zmniejszyła się odpowiednio dla w/w podłoż o 0,61, 1,68 i 1,59 cykli log₁₀ jtk/cm³.



┌ – NIR wg Tuckey'a, wieloczynnikowa analiza wariancji, $\alpha = 0,05$
 └ – Tuckeys HSD Intervals, Multifactor ANOVA, $\alpha = 0.05$

Rys. 1. Przeżywalność wybranych szczepów z gatunku *Lactobacillus plantarum* w środowisku o pH 2,5 w różnym czasie inkubacji (średnia z 8 serii)

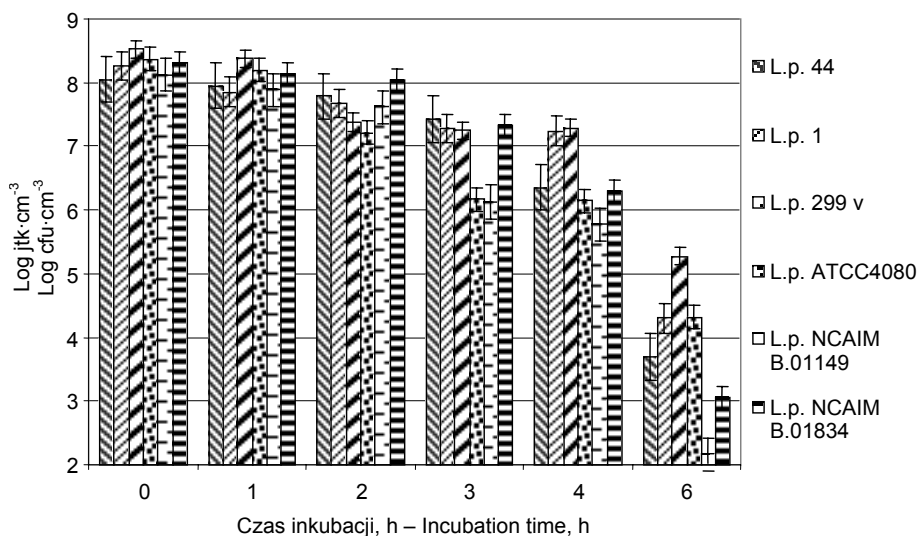
Fig. 1. The survival ability of chosen *Lactobacillus plantarum* strains at pH 2.5 at different incubation time (mean from 8 series)

Wpływ inkubacji bakterii mlekowych w środowisku o pH 2,0 na ich przeżywalność przedstawiono na rysunku 2. Zaobserwowano znaczne różnice w przeżywalności badanych szczepów, a także spadek liczby komórek w miarę upływu czasu. Po 4-godzinnej inkubacji wszystkie badane szczepy charakteryzowały się dużą przeżywalnością. Liczba komórek wynosiła średnio 10^5 do 10^7 jtk/cm³, przy wyjściowej około 10^8 jtk/cm³. Po sześciu godzinach inkubacji w podłożu o pH 2,0 najlepszą tolerancją (obserwowaną również dla pH 2,5) charakteryzował się szczep *L. plantarum* 299 v, którego liczba komórek wynosiła średnio $1,88 \times 10^5$ jtk/cm³. Szczepy *L. plantarum* 1 oraz ATCC 4080 przeżywały w ilości odpowiednio $1,98 \times 10^4$ i $2,09 \times 10^4$ jtk/cm³, a najniższą oporność wykazywał szczep *L. plantarum* NCAIM B.01149, którego liczba komórek zmniejszyła się do $1,47 \times 10^2$ jtk/cm³.

Zaobserwowana zróżnicowana zdolność przeżywania badanych szczepów bakterii w brzeczce napoju słodowego o niskim pH, szczególnie podczas dłuższej inkubacji, sugeruje, że jest to cecha związana z właściwościami szczepu.

Vinderola i Reinheimer [2003] stwierdzają podobnie donosząc, iż zdolność bakterii probiotycznych do pokonania bariery żołądka jest różnorodna i zależy od cech szczepu.

Złotkowska i in. [2002] badali przeżywalność bakterii wyizolowanych z naturalnie fermentujących surowców. Po 5 h inkubacji w pH 2,0 stwierdzili, dla szczepu o największej oporności, liczbę żywych komórek wynoszącą $3,0 \times 10^5$ (liczba wyjściowa wynosiła $7,0 \times 10^9$ jtk/cm³).



┌ – NIR wg Tuckey'a, wieloczynnikowa analiza wariancji, $\alpha = 0,05$
└ – Tuckeys HSD Intervals, Multifactor ANOVA, $\alpha = 0.05$

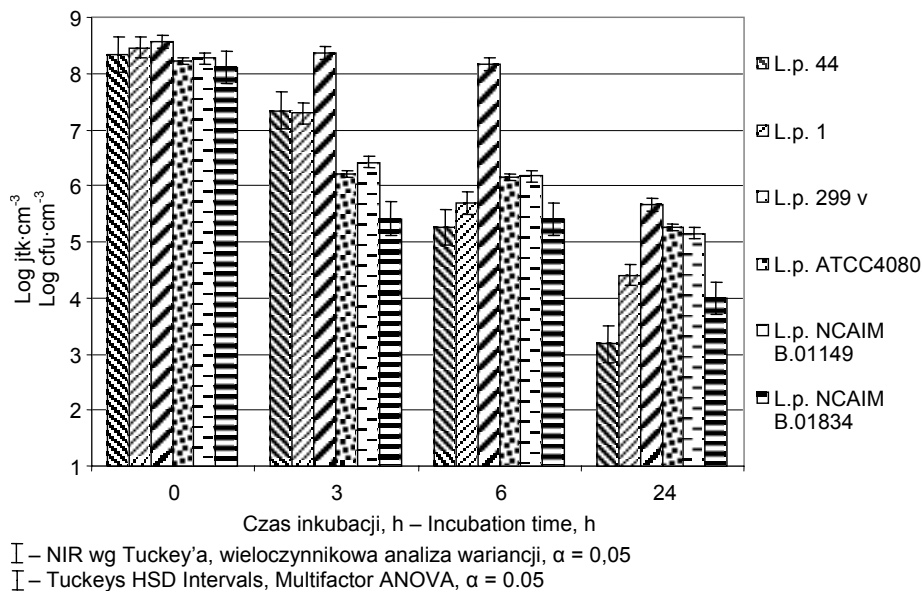
Rys. 2. Przeżywalność wybranych szczepów z gatunku *Lactobacillus plantarum* w środowisku o pH 2,0 w różnym czasie inkubacji (średnia 8 serii)

Fig. 2. The survival ability of chosen *Lactobacillus plantarum* strains at pH 2.0 at different incubation time (mean from 8 series)

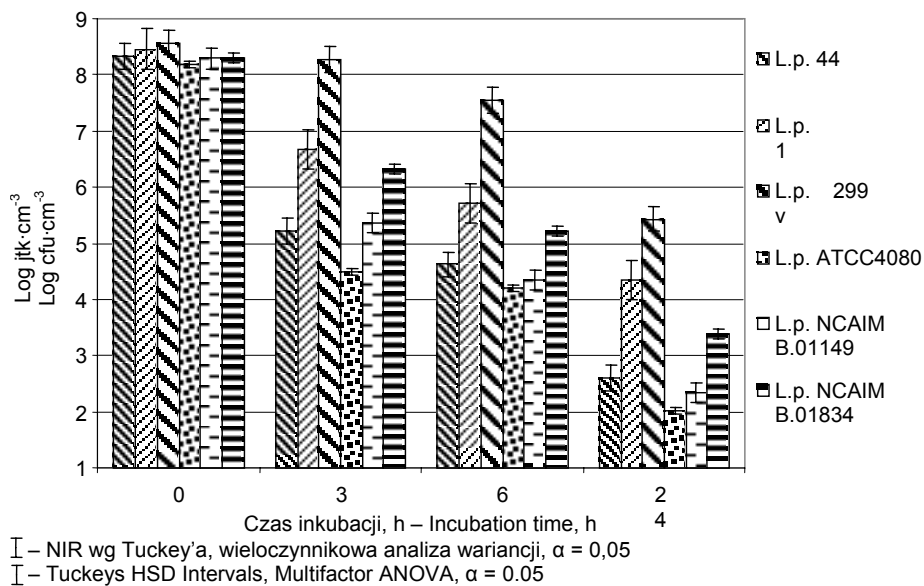
Tolerancja bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na niskie pH przypisywana jest ich zdolnością do utrzymywania stałego gradientu pomiędzy pH środowiska a pH cytoplazmatycznym komórki. Gdy pH wewnątrz komórki osiąga wartość graniczną funkcje życiowe zostają zahamowane i komórka umiera [Charalampopoulos i in. 2003].

Kolejną barierą, jaką napotyka w przewodzie pokarmowym bakterie fermentacji mlekowej są warunki panujące w jelicie cienkim. Czas przebywania spożytego produktu w jelicie cienkim wynosi 1-4 h, a wartość pH treści jelita – około 8,0 [Huang i Adams 2004]. Ponieważ pokarm po przejściu przez jelito cienkie trafia do jelita grubego (pH obojętne lub lekko zasadowe), gdzie przebywa zwykle 8-12 h, określano liczbę bakterii przeżywających po 3, 6 i 24 h inkubacji. W badaniach nad opornością bakterii mlekowych na składniki żółci stosowane są oprócz żółci takie sole żółciowe, jak oxgall i dezoksycholan sodu w stężeniach 0,15-0,3%. W naszych badaniach, w celu określenia oporności badanych szczepów bakterii mlekowych na żółć zastosowano roztwory dezoksycholanu sodu (jeden ze składników żółci) o stężeniach 1, 2 i 3 mmol/dm³.

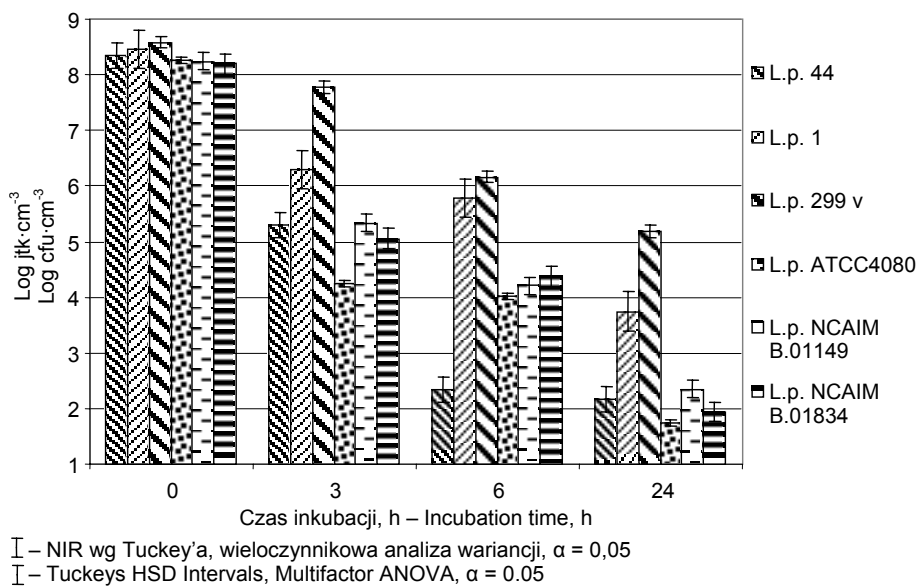
Wpływ czasu inkubacji badanych szczepów w obecności soli żółciowej przedstawiono na rysunkach 3, 4 i 5. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia stosowanej soli żółciowej oraz w miarę upływu czasu zmniejszała się liczba żywych komórek bakterii mlekowych. I tak np. w roztworze dezoksycholanu sodu o stężeniu 1 mmol/dm³ po 24 h najlepszą przeżywalnością charakteryzowały się szczepy *L. plantarum* 299 v, ATCC 4080 i NCAIM B.01149. Liczba ich komórek wynosiła około 10⁵ jtk/cm³ (liczba wyjściowa wynosiła 10⁸ jtk/cm³) (rys. 3). Szczep *L. plantarum* 1 wykazywał się również dobrą



Rys. 3. Przeżywalność wybranych szczepów z gatunku *Lactobacillus plantarum* w roztworze dezoksycholalanu sodu o stężeniu 1 mmol/dm³ w różnym czasie inkubacji (średnia 8 serii)
Fig. 3. The survival ability of chosen *Lactobacillus plantarum* strains at solution 1 mmol/dm³ deoxycholate sodium at different incubation time (mean from 8 series)



Rys. 4. Przeżywalność wybranych szczepów z gatunku *Lactobacillus plantarum* w roztworze dezoksycholalanu sodu o stężeniu 2 mmol/dm³ w różnym czasie inkubacji (średnia 8 serii)
Fig. 4. The survival ability of chosen *Lactobacillus plantarum* strains at solution 2 mmol/dm³ deoxycholate sodium at different incubation time (mean from 8 series)



Rys. 5. Przeżywalność wybranych szczepów z gatunku *Lactobacillus plantarum* w roztworze dezoksycholanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm^3 w różnym czasie inkubacji (średnia 8 serii)
 Fig. 5. The survival ability of chosen *Lactobacillus plantarum* strains at solution 3 mmol/dm^3 deoxycholate sodium at different incubation time (mean from 8 series)

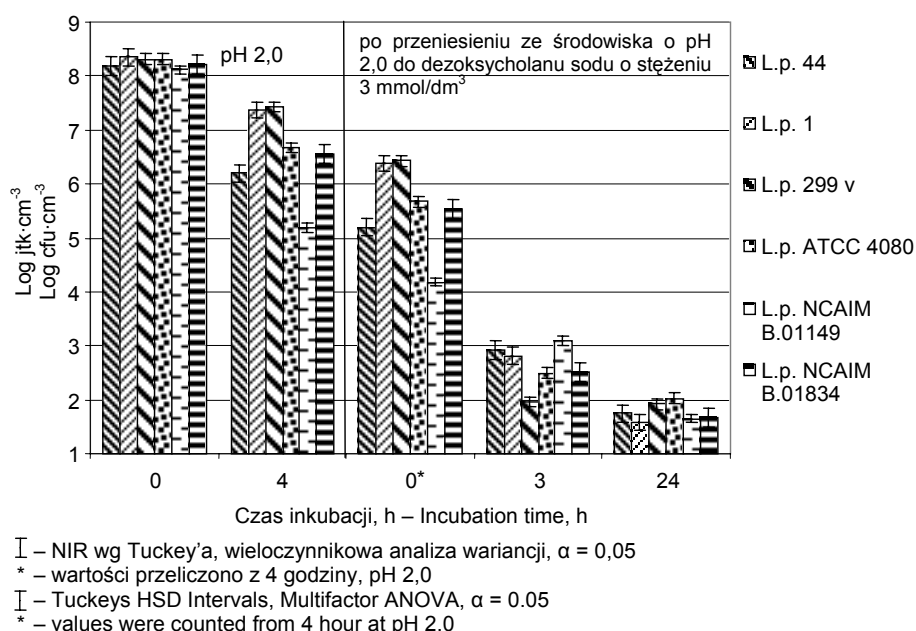
przeżywalnością ($2,53 \times 10^4 \text{ jtk/cm}^3$). Gdy badane szczepy umieszczono w dezoksycholanie sodu o stężeniu 2 mmol/dm^3 , po 24 h inkubacji największą liczbę komórek przeżywających stwierdzano (podobnie jak w niższym stężeniu) dla szczepu *L. plantarum* 299 v i wynosiła ona $2,7 \times 10^5 \text{ jtk/cm}^3$, podczas gdy szczep *L. plantarum* 1 przeżywał w ilości $2,24 \times 10^4 \text{ jtk/cm}^3$, a szczepy *L. plantarum* 44, ATCC 4080 i NCAIM B.01149 – około 10^2 jtk/cm^3 (rys. 4). Po 24 h inkubacji, w największym stężeniu stosowanej soli żółciowej, najlepiej przeżywał szczep *L. plantarum* 299 v ($1,54 \times 10^5 \text{ jtk/cm}^3$) oraz *L. plantarum* 1 ($5,53 \times 10^3 \text{ jtk/cm}^3$). Szczepami najbardziej wrażliwymi okazały się szczepy *L. plantarum* ATCC 4080 i NCAIM B.01834, które przeżywały w ilości około 10^1 jtk/cm^3 (rys. 5).

Łaniewska-Moroz i in. [1996] stwierdzili, że po 24-godzinnej inkubacji w roztworze dezoksycholanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm^3 liczba żywych komórek *Lactobacillus acidophilus* 294 zmniejszyła się z 10^6 jtk/cm^3 do około 10^2 jtk/cm^3 .

Patel i in. [2004] prowadzili badania nad przeżywalnością bakterii mlekowych w środowisku o pH 7,0 zawierającym 2% żółci. Dodatkowo określili wpływ różnych dodatków (ekstraktu: słodowego, pszenicznego i jęczmiennego oraz różnych stężeń glukozy i ekstraktu drożdżowego) na przeżywalność badanych szczepów w 2-procentowym roztworze żółci. Po 4 h inkubacji stwierdzono lepszą tolerancję szczepów *L. plantarum*, *L. reuteri* i *L. acidophilus* w stosunku do żółci w podłożach dodatkowo wzbogaconych w ekstrakty zbożowe i glukozę. Obecność ekstraktu drożdżowego również zwiększała oporność bakterii na żółć, ale w mniejszym stopniu niż pozostałe dodatki. Najlepszą tolerancją charakteryzowały się szczepy przetrzymywane w próbkach wzbogaconych

w ekstrakt słodowy. Autorzy sugerują, iż oporność szczepów w stosunku do żółci zależy nie tylko od samych właściwości testowanego szczepu, ale również od pozostałych składników wprowadzonych do środowiska. Różnorodność spożywanych pokarmów jest duża, a ich stężenie w przewodzie pokarmowym stopniowo maleje, dlatego w niniejszym doświadczeniu zdolność przeżywania badanych szczepów określaliśmy w roztworach dezoksycholanu sodu zawierających brzeczkę napoju słodowego rozcieńczoną dziesięciokrotnie.

Większość badań nad przeżywalnością szczepów bakterii fermentacji mlekowej w niskim pH lub w obecności soli żółciowych jest przeprowadzana w osobnych doświadczeniach. Jednak bakterie, aby mogły korzystnie oddziaływać na organizm gospodarza, poza pokonaniem bariery niskiego pH muszą również przejść kolejną barierę, jaką jest żółć. Dlatego w ramach niniejszej pracy zastosowano inkubację kombinowaną, polegającą na przetrzymaniu szczepów przez 4 h w środowisku o pH 2,0, a następnie zobojętnieniu i przeniesieniu ich do roztworu dezoksycholanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm³ (rys. 6).



Rys. 6. Przeżywalność wybranych szczepów z gatunku *Lactobacillus plantarum* w pH 2,0 a następnie w roztworze dezoksycholanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm³ w różnym czasie inkubacji (średnia 8 serii)

Fig. 6. The survival ability of chosen *Lactobacillus plantarum* strains at pH 2.0 and next at solution 3 mmol/dm³ deoxycholate sodium at different incubation time (mean from 8 series)

Po 4 h inkubacji w środowisku o pH 2,0 stwierdzano jeszcze 10⁵-10⁷ jtk/cm³ badanych szczepów. Po 3 h od momentu przeniesienia szczepów ze środowiska o pH 2,0 do roztworu dezoksycholanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm³ największą liczbą żywych komórek (średnio 1,24 × 10³ jtk/cm³) charakteryzował się szczep *L. plantarum* NCAIM B.01149. Najmniejszą liczbę żywych komórek stwierdzano dla szczepu *L. plantarum* 299 v

i wynosiła ona średnio $9,11 \times 10^1$ jtk/cm³. Ponieważ badany szczep zarówno we wszystkich stężeniach stosowanej soli, jak również w niskim pH odznaczał się najlepszymi zdolnościami przeżycia, uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, iż zmienne warunki środowiska (przeniesienie z niskiego pH do roztworów dezoksyholanu sodu) wywierają istotny wpływ na oporność bakterii na wysokie stężenia soli żółciowych. Po 24 h inkubacji w roztworze dezoksyholanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm³ liczba komórek bakterii zmniejszała się, osiągając dla większości szczepów około 10^1 jtk/cm³. Najlepszą przeżywalnością charakteryzowały się szczepy *L. plantarum* ATCC 4080 i *L. plantarum* 299 v, których liczba żywych komórek wynosiła odpowiednio $1,05 \times 10^2$ i $8,28 \times 10^1$ jtk/cm³.

Prasad i in. [1999] stwierdzili, że nie wszystkie szczepy przeżywające w warunkach niskiego pH są zdolne do pokonania bariery wysokiego stężenia soli żółciowych (1%) w jelicie cienkim, mimo iż podczas inkubacji wyłącznie w roztworze soli żółciowych przeżywają. Wśród badanych szczepów z gatunku *L. rhamnosus* znajdowały się szczepy wrażliwe na następujące po sobie zmiany warunków z niskiego pH na środowisko żółci.

Usajewicz i in. [2001], prowadząc badania nad przeżywalnością bakterii kefirowych w obecności 3% żółci, po 12-godzinnej inkubacji stwierdzili około 10^2 - 10^3 jtk/cm³ (liczba wyjściowa około 10^8 jtk/cm³). Jednocześnie po przeniesieniu bakterii z bulionu o pH 1,5 do bulionu zawierającego 3% żółci, po półgodzinnej inkubacji stwierdzono zaledwie pojedyncze komórki.

Pokonanie niekorzystnych warunków panujących w żołądku i jelicie cienkim umożliwia bakteriom dotarcie do jelita grubego i dalszy wpływ na organizm człowieka oraz ewentualne zasiedlenie jelita grubego.

WNIOSKI

1. Badane szczepy z gatunku *Lactobacillus plantarum* charakteryzują się zróżnicowaną zdolnością do przeżycia zarówno w brzeczce napoju słodowego o niskim pH, jak i w roztworach dezoksyholanu sodu.

2. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, iż badane szczepy potrafią pokonać barierę żołądka. Po 6 h inkubacji stwierdzano jeszcze w środowisku o pH 2,5 10^6 - 10^7 jtk/cm³, a w środowisku o pH 2,0 – 10^2 - 10^5 jtk/cm³ (liczba wyjściowa około 10^8 jtk/cm³).

3. Po 24 h inkubacji, w próbkach roztworu dezoksyholanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm³ stwierdzano jeszcze obecność żywych komórek bakterii – 10^1 - 10^5 jtk/cm³ (w zależności od szczepu).

4. Stosowane szczepy bakterii są prawdopodobnie zdolne do pokonania jelita cienkiego i dotarcia do jelita grubego. Po inkubacji kolejno przez 4 h w brzeczce o pH 2,0, a następnie 24 godziny w roztworze dezoksyholanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm³, w próbkach znajdowały się jeszcze żywe komórki bakterii: 10^1 - 10^2 jtk/cm³ (liczba wyjściowa 10^8 jtk/cm³).

5. Szczepem o najlepszej przeżywalności zarówno w niskim pH, jak i w obecności soli żółciowej był szczep probiotyczny *L. plantarum* 299 v. Podczas inkubacji kombinowanej w pH 2,0 a następnie w roztworze dezoksyholanu sodu o stężeniu 3 mmol/dm³ największą opornością w stosunku do w/w warunków charakteryzował się (oprócz *L. plantarum* 299 v) szczep *L. plantarum* ATCC 4080. Dlatego sugeruje się ewentualne jego wykorzystanie w produkcji napoju słodowego.

PIŚMIENNICTWO

- Blandino A., Al-Aseeri M.E., Pandiella S.S., Cantero D., Webb C., 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* 36, 527-543.
- Bomba A., Nemcova R., Mudronova D., Guba P., 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 13, 121-126.
- Cebeci A., Gürakan C., 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiol.* 20, 511-518.
- Charalampopoulos D., Pandiella S.S., Webb C., 2003. 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.* 82, 133-141.
- Charalampopoulos D., Wang R., Pandiella S.S., Webb C., 2002. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 131-141.
- Chou L., Weimer B., 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 82, 23-31.
- Desmond C., Stanton C., Fitzgerald G.F., Collins K., Ross R.P., 2002. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *Int. Dairy J.* 12, 183-190.
- Drago L., Gismondo M.R., Lombardi A., Haën C., Gozzini L., 1997. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 455-463.
- Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G., Shanahan F., Collins J.K., 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 386S-92S.
- Hood S.K., Zottola E.A., 1988. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.* 53, 5, 1514-1516.
- Huang Y., Adams M.C., 2004. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 253-260.
- Kaur I.P., Chopra K., Saini A., 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 1-9.
- Klewicka E., Libudzisz Z., Czajka D., Kuc K., 1999. Antagonistyczna aktywność bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus acidophilus*. *Żywność, Supl.* 42(21), 168-175.
- Koop-Hoolihan L., 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 101, (2), 229-239.
- Kristo E., Biliaderis C.G., Tzanetakis N., 2003. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *Int. Dairy J.* 13, 517-528.
- Laniewska-Moroz L., Nalepa B., Roczniakowa B., 1996. Fermentowane soki warzywne o właściwościach probiotycznych. *Przem. Spoż.* 10, 39-40 i 43.
- Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., Saarela M., 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* 12, 173-182.
- Molin G., 2001. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 380S-5S.
- Patel H.M., Pandiella S.S., Wang R.H., Webb C., 2004. Influence of malt, wheat, and barley extracts on the bile tolerance of selected strains of lactobacilli. *Food Microbiol.* 21, 83-89.
- Prasad J., Harsharanjit G., Smart J., Gopal P.K., 1999. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.* 8, 993-1002.
- Roberfroid M.B., 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1682S-7S.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84, 197-215.

- Schillinger U., 1999. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yogurts and their stability during refrigerated storage. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 79-87.
- Schrezenmeir J., de Vrese M., 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 361S-4S.
- Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E., Salminen S., 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 393S-8S.
- Usajewicz I., Herman J., Nalepa B., 2001. Przeżywalność bakterii kefirowych w niskich wartościach pH i w obecności żółci. *Biul. Nauk. UWM* 13, 61-64.
- Varnam A., 2002. *Lactobacillus*: occurrence and significance in non-dairy foods. *Microbiol. Today* 29, 2, 13-17.
- Vinderola C.G., Reinheimer J.A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristic and biological barrier resistance. *Food Res. Int.* 36, 895-904.
- Wzorek W., Bonin S., Koskowska J., 2003. Attempt to obtain beverage containing viable lactic acid bacteria and estimation of their survival ability at the selected temperatures. *Acta Sci. Pol., Technologia Alimentaria* 2(2), 47-56.
- Złotkowska H., Juszcakiewicz D., Krakowiak A., 2002. Selekcja szczepów bakterii kwasu mlekowego o właściwościach probiotycznych. *Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.* 57, 71-85.

THE SELECTED PROBIOTIC PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* STRAINS AND THEIR APPLICATION TO PRODUCTION OF BIOACTIVE MALT BEVERAGES

Abstract. The survival ability at malt beverage wort with pH 2.0 and 2.5 of tested strains was investigated at the time 0, 1, 2, 3, 4 and 6 hours. In general, tested strains of lactic acid bacteria showed high resistance at low pH and after 6 hours of incubation observed viable cells on the range 10^6 - 10^7 cfu/cm³ in case of pH 2.5, and 10^2 - 10^5 cfu/cm³ for pH 2.0. A number of lactic acid bacteria was examined in 1, 2 and 3 mmol/dm³ of deoxycholate sodium solution after the time of 3, 6 and 24 hours of incubation. After 24 h of incubation in 3 mmol/dm³ solution of deoxycholate sodium the determined amount of bacteria was 10^1 - 10^5 cfu/ml.

Key words: lactic acid bacteria, probiotics, malt beverage, bioactive beverage, pH 2.0-2.5, deoxycholate sodium

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 18.01.2005 r.

Do cytowania - For citation: Kraszewska J., Wzorek W., Sztando E., 2005. Wybrane właściwości probiotyczne szczepów *Lactobacillus plantarum* i możliwości ich wykorzystania w produkcji bioaktywnych napojów słodowych. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 4(1), 27-38.