

ANNA RZEPKOWSKA, DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA

PRZEŻYWALNOŚĆ SZCZEPÓW *LACTOBACILLUS* WYIZOLOWANYCH Z ŻYWNOŚCI W WARUNKACH MODELOWEGO PRZEWODU POKARMOWEGO

Streszczenie

Celem pracy było określenie przeżywalności szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, wyizolowanych z żywności, w warunkach modelowego przewodu pokarmowego. Materiał do badań stanowiły 2 szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, wyizolowane z oscypka i bundzu oraz probiotyczny szczep *Lactobacillus plantarum* 299v. Wykazano, że dodatek lizozymu i pepsyny do soku żołądkowego oraz dodatek pankreatyny do soku jelitowego nie miały istotnego wpływu na przeżywalność bakterii *Lactobacillus*. Istnieje związek pomiędzy żywotnością komórek bakterii a czasem inkubacji badanych szczepów. Inkubacja szczepów przez 5 h w modelowym przewodzie pokarmowym spowodowała obniżenie liczby komórek bakterii o 2 ÷ 3 rzędy logarytmiczne. Największy wpływ na przeżywalność badanych szczepów miało pH soku żołądkowego. Ponadto wykazano, że dodatek medium żywnościowego w postaci mleka UHT zwiększał tolerancję badanych szczepów bakterii na modelowy sok żołądkowy, działając w sposób ochronny. Stwierdzono także, że badane szczepy *Lactobacillus*, poddane działaniu soku jelitowego, tolerowały wysokie fizjologiczne stężenie soli żółciowych. Uzyskane wyniki badań mogą służyć do optymalizacji dyskryminacyjnych metod badań *in vitro* zdolności bakterii potencjalnie probiotycznych do przeżycia w warunkach stresowych przewodu pokarmowego człowieka.

Słowa kluczowe: bakterie kwasu mlekowego, *Lactobacillus*, przeżywalność, przewód pokarmowy, probiotyki, badania *in vitro*

Wprowadzenie

Bakterie fermentacji mlekowej (LAB) występują na powierzchni roślin, mięsa, w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt oraz w mleku i produktach fermentacyjnych.

Mgr inż. A. Rzepkowska, dr inż. D. Zielińska, prof. dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa.
Kontakt: anna_rzepkowska@sggw.pl

towanych, w tym w serach produkowanych metodą tradycyjną z mleka owczego: w oscypku i bundzu [14]. Badania mikroflory przewodu pokarmowego dorosłego człowieka wskazują, że bakterie pochodzące z żywności fermentowanej mogą zasiedlać jelito cienkie i wpływać na jego prawidłowe funkcjonowanie [16].

Właściwości probiotyczne LAB są szczepozależne. Zgodnie z definicją FAO/WHO [4] probiotyki to „żywe drobnoustroje, które podane w odpowiedniej liczbie wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza”. Zgodnie ze schematem badań probiotyków, zaproponowanym przez FAO/WHO, po identyfikacji szczepu należy dokonać charakterystyki funkcjonalności, w tym przeprowadzić badania *in vitro* [4]. Wielu autorów podkreśla brak jednolitej metodyki badań *in vitro* dotyczącej probiotyków [2, 3, 5, 12]. Testy te umożliwiają szybką ocenę właściwości potencjalnie probiotycznych bakterii. Uważa się, że tolerancja na niskie pH żołądka i wysokie stężenie żółci są najważniejszymi kryteriami selekcji szczepów probiotycznych i te cechy można zbadać w testach *in vitro* [5, 12].

Zaleca się [4], aby probiotyki pochodziły z przewodu pokarmowego człowieka. Obecnie poszukuje się także organizmów potencjalnie probiotycznych wśród mikroflory naturalnie fermentowanych produktów roślinnych i zwierzęcych [7, 14]. Szczepy izolowane z żywności spontanicznie fermentowanej cechują się dobrą przeżywalnością w przechowywanym produkcie, jak również wysoką opornością na ekstremalne warunki panujące w przewodzie pokarmowym [10]. Tym samym mogą być cenne pod względem technologicznym.

Celem pracy była ocena przeżywalności szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności, w warunkach modelowego przewodu pokarmowego i wstępna ocena ich potencjalnych właściwości probiotycznych.

Material i metody badań

Material do badań stanowiły 3 szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowane z oscypka OS1 i bundzu B1 oraz szczep referencyjny pochodzenia ludzkiego *Lactobacillus plantarum* 299v, o potwierdzonych klinicznie właściwościach probiotycznych, wyizolowany z suplementu diety Sanprobi IBS. Szczepy pochodziły z kolekcji mikroorganizmów Zakładu Higieny i Zarządzania Jakością Żywności SGGW. Kultury muzealne przechowywano w temp. -80 °C w bulionie MRS (Merck) z 20-procentowym dodatkiem glicerolu. Szczepy ożywiano przez dwukrotny pasaż na bulionie MRS z dodatkiem 1 % inoculum i inkubację w temp. 37 °C przez 24 h.

Modelowy przewód pokarmowy przygotowywano z różnych roztworów elektrolitów (tab. 1). Każdorazowo pobierano po 1 ml 24-godzinnej hodowli badanych szczepów bakterii o początkowej gęstości 10^9 jtk/ml, odwirowywano ($8000 \times g/\text{min}$), zlewano supernatant i dodawano po 5 ml soku żołądkowego. Próby inkubowano 2 h

w temp. 37 °C, następnie odwirowywano, zlewano supernatant i dodawano po 10 ml soku jelitowego. Próby inkubowano przez następne 3 h [2].

Tabela 1. Skład soku żołądkowego i jelitowego w zastosowanym modelowym przewodzie pokarmowym
Table 1. Composition of gastric and intestinal juices in simulated GI tract model applied

Typ soku Type of juice	Skład soku Composition of juice	Czas inkubacji w temp. 37 °C Incubation time at 37 °C	Źródło References
Sok żołądkowy* Gastric juice*	Sterylny roztwór 0,5 % NaCl z dodatkiem lizozymu (1 g/l) i pepsyny (0,3 g/l) doprowadzony do pH 2,0; 2,5 lub 3,0 przy użyciu 5 M HCl. Sterile 0,5 % NaCl solution, with lysozyme (1 g/l) and pepsin addition (0,3 g/l), adjusted to pH 2,0; 2,5 and 3,0 with 5M HCl.	2 h	[2, 6, 14]
Sok jelitowy* Intestinal juice*	Sterylny roztwór NaHCO ₃ (6,4 g/l), KCl (0,239 g/l), NaCl (1,28 g/l), o pH 7,8 z 0,15, 0,3 lub 0,5-procentowym dodatkiem żółci wołowej oraz pankreatyny (1 g/l). Sterile NaHCO ₃ (6,4 g/l), KCl (0,239 g/l), NaCl (1,28 g/l) solution, adjusted to pH 7,8 and with addition of 0,15 %, 0,3 % and 0,5 % bovine bile and pancreatin (1 g/l).	3 h	[1, 2, 3]

*Wszystkie odczynniki pochodziły z firmy Sigma Aldrich / All chemicals were obtained in Sigma Aldrich Co.

W celu sprawdzenia, czy medium żywnościowe wykazuje ochronny wpływ na komórki bakteryjne, do soku żołądkowego dodawano 15 % (m/v) bulionu MRS (Merck), mleka w proszku (SM Gostyń), mleka UHT o zawartości 3,2 % tłuszczu (Łaciate, SM Mlekoop) oraz bulionu wołowego [6, 14]. Badano wpływ następujących czynników na przeżywalność bakterii w modelowym przewodzie pokarmowym: wartość pH soku żołądkowego i dodatek medium żywnościowego, dodatek enzymów trawiennych, stężenie żółci w soku jelitowym oraz czas inkubacji w modelowym soku żołądkowym i jelitowym. Określano liczbę komórek bakterii zgodnie z PN-ISO 15214:2002 [12] na podłożu stałym MRS (Merck). Próbkę pobierano po 0, 1, 2 i 5 h inkubacji.

Wszystkie doświadczenia wykonano w 3 powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica 10 (StatSoft®). Wykonano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA (p = 0,05).

Wyniki i dyskusja

Wpływ pH soku żołądkowego i dodatku medium żywnościowego na przeżywalność szczepów LAB w modelowym przewodzie pokarmowym

Szacuje się, że w ciągu doby organizm dorosłego człowieka wydziela 2,5 l soku żołądkowego o pH 1 ÷ 3 i 0,5-procentowej zawartości związków mineralnych. Żywność trawiona jest w żołądku przez 1 ÷ 3 h, w zależności od rodzaju treści pokarmowej. Można więc przyjąć, że czas inkubacji komórek bakteryjnych w modelowym soku żołądkowym powinien wynieść ok. 2 h. Charteris i wsp. [2] wskazują, że wartość pH tego środowiska jest kluczowa dla przeżywalności bakterii w górnych odcinkach przewodu pokarmowego. Tolerancja szczepów na enzymy i niskie pH żołądka jest cechą szczepozależną [10].

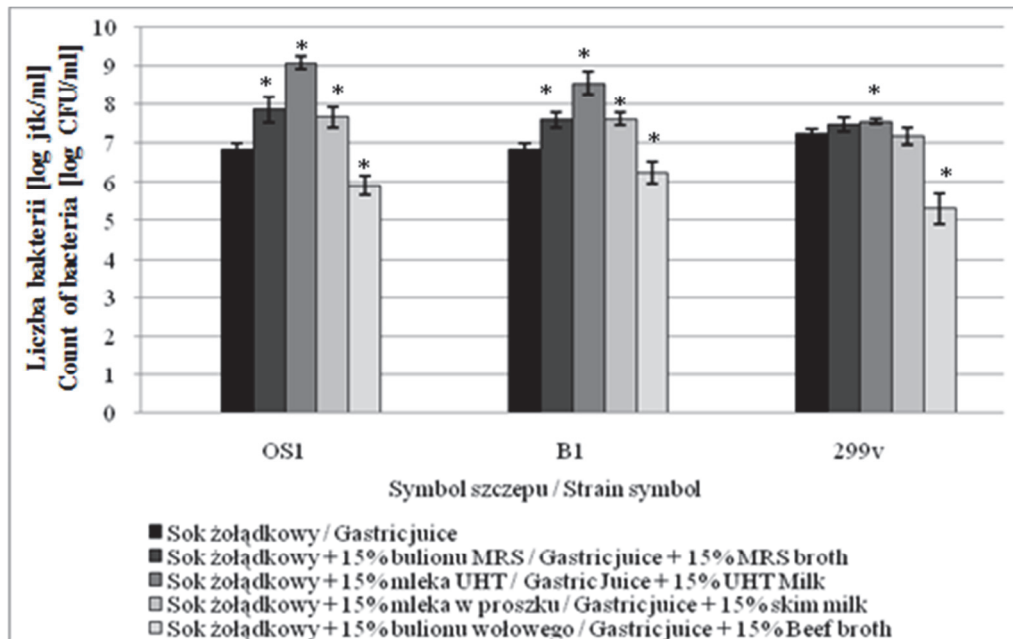
W wyniku przeprowadzonych badań wykazano statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) wpływ pH soku żołądkowego na przeżywalność badanych szczepów *Lactobacillus* (tab. 2). Zaobserwowano znaczne (o 7 log jtk/ml) obniżenie liczby komórek bakterii po 2 h inkubacji w soku o pH 2,0, w porównaniu z liczbą początkową (ponad 9 log jtk/ml). Po inkubacji szczepów w soku żołądkowym o pH 2,5 i 3,0 zaobserwowano obniżenie liczby komórek bakterii kolejno o 2 rzędy i 1 rząd log.

Wpływ zastosowania soku żołądkowego o pH 2,0 może posłużyć jako metoda dyskryminacyjna, gdyż tylko najbardziej odporne szczepy są w stanie przeżyć w tak ekstremalnych warunkach [8]. Autorzy podkreślają dużą wrażliwość szczepów bakterii fermentacji mlekowej na niskie pH soku żołądkowego [3]. Zaobserwowano, że probiotyczne szczepy, np. *Lactobacillus rhamnosus* GG wykazują oporność na kwasowość żołądka, a liczba żywych komórek po 3 h inkubacji obniża się o 3 rzędy log [2]. Z kolei Jensen i wsp. [5] wskazali na szczególnie wysoką tolerancję na sok żołądkowy szczepów z gatunku *Lactobacillus reuteri*, natomiast Schillinger i wsp. [13] podkreślili większą wrażliwość na niskie pH szczepów z gatunku *Lactobacillus casei* niż *Lactobacillus acidophilus*. Korelację pomiędzy żywotnością szczepów bakterii fermentacji mlekowej a wartością pH soku żołądkowego stwierdzili również Pitino i wsp. [11]. Wskazali oni na większą przeżywalność szczepów probiotycznych w stosunku do potencjalnie probiotycznych.

W badaniach własnych stwierdzono, że dodatkowe zastosowanie medium żywnościowego w czasie trawienia w modelowym soku żołądkowym ma istotny wpływ na przeżywalność bakterii (rys. 1). Po 2 h inkubacji liczba komórek bakterii wszystkich szczepów obniżyła się o ok. 2 rzędy logarytmiczne, z początkowej liczby powyżej 9 log jtk/ml. Najlepszą przeżywalność szczepów OS1, B1 i 299v zaobserwowano w soku żołądkowym z dodatkiem mleka UHT. Może to dowodzić, że składniki mleka wpływają ochronnie na żywotność tych bakterii. Natomiast bulion wołowy dodany do soku żołądkowego nie pełnił funkcji ochronnej.

Bakterie fermentacji mlekowej, w tym probiotyki, zwykle dodawane są do żywności lub występują w postaci suplementu diety. Obecność matrycy żywnościowej lub osłonki w suplementie diety korzystnie wpływa na żywotność komórek bakterii w przewodzie pokarmowym [3, 6, 10, 12, 14, 19]. Kos i wsp. [6] wykazali korzystny wpływ dodatku matrycy żywnościowej podczas symulacji pasażu bakterii *Lactobacillus acidophilus* M92 przez przewód pokarmowy. Stwierdzono hamowanie aktywności proteaz przez zastosowanie medium żywnościowego. Za najlepszy czynnik ochronny dla bakterii fermentacji mlekowej uznano białka serwatkowe.

Właściwości ochronne mleka wykazano także w innych badaniach [17]. Stwierdzono, że buforujące właściwości białek mleka korzystnie wpływają na przeżywalność probiotycznych kultur *Lactobacillus acidophilus*, co potwierdzono także w badaniach własnych.



*różnice statystycznie istotne pomiędzy próbkami z medium w odniesieniu do prób z samym sokiem żołądkowym, w obrębie jednego szczepu ($p < 0,05$) / statistically significant differences between applied medium in comparison to gastrin juice, within one strain samples ($p < 0.05$)

Rys. 1. Wpływ 15-procentowego dodatku medium żywnościowego na przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym soku żołądkowym po 2 h inkubacji w środowisku o pH 2,5

Fig. 1. Effect of addition of 15 % food medium on the viability of LAB strains studied in gastric juice simulant after 2 h of incubation in environment with pH equal 2.5

Tabela 2. Przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym soku żołądkowym, w zależności od jego pH
 Table 2. Survival of studied LAB strains in gastric juice simulant depending on its pH value

Symbol szczepu / Strain symbol	Liczba komórek bakterii [log jtk/ml] / Counts of bacterial cells [log CFU/ml]					
	Czas inkubacji 0 h / Incubation time 0 h		Czas inkubacji 2 h / Incubation time 2 h		Czas inkubacji 3 h / Incubation time 3 h	
	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0
OSI	9,24 ± 0,38	9,53 ± 0,24	9,21 ± 0,14	2,29* ± 0,12	7,91* ± 0,41	8,68* ± 0,22
B1	9,32 ± 0,38	9,62 ± 0,01	9,29 ± 0,31	2,43* ± 0,14	7,59* ± 0,20	8,39* ± 0,41
299v	9,19 ± 0,24	9,66 ± 0,04	9,31 ± 0,39	< 1,00*	7,47* ± 0,17	8,74 ± 0,09

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; n = 3.

*różnice statystycznie istotne pomiędzy kolumnami (p < 0,05) / statistically significant differences between the columns (p < 0.05).

Tabela 3. Przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym soku żołądkowym i soku jelitowym, w zależności od dodatku enzymów
 Table 3. Survival of studied LAB strains in gastric juice simulant and intestinal juice simulant depending on enzymes added

Symbol szczepu Strain symbol	Czas inkubacji 0 h Incubation time 0 h	Liczba bakterii [log jtk/ml] / Counts of bacteria [log CFU/ml]					
		Żołądek (pH 2,5) / Stomach (pH value 2,5) Czas inkubacji 2 h / Incubation time 2 h		Jelito cienkie (pH 7,8) / Intestine (pH value 7,8) Czas inkubacji 3 h / Incubation time 3 h			
		E	X	E	X	E	X
OSI	9,47 ± 0,33	7,72 ± 0,12	7,72 ± 0,11	7,37 ± 0,12	7,25 ± 0,06		
B1	9,30 ± 0,28	7,54 ± 0,17	7,58 ± 0,16	7,18 ± 0,07	7,16 ± 0,09		
299v	9,52 ± 0,23	7,49 ± 0,39	7,39 ± 0,28	7,44 ± 0,17	7,23 ± 0,20		

Objaśnienia / Explanatory notes:

E – sok żołądkowy i sok jelitowy z dodatkiem enzymów / gastric juice and intestinal juice with enzymes added; X – sok żołądkowy i sok jelitowy bez dodatku enzymów / gastric juice and intestinal juice with no enzymes added. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; n = 3.

Wpływ dodatku wybranych enzymów trawiennych na przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym przewodzie pokarmowym

Lizozym to enzym, który odpowiada za hydrolizę ściany komórkowej bakterii. Występuje naturalnie w ślinie człowieka, a także w innych wydzielinach, np. w śluzie żołądka, a bakterie Gram-dodatnie są szczególnie wrażliwe na jego działanie. Pepsyna jest natomiast wydzielana przez komórki gruczołowe żołądka i jest składnikiem soku żołądkowego. Prowadzi hydrolizę białek do krótszych łańcuchów polipeptydowych. Oprócz pH soku żołądkowego, oddziaływanie tego enzymu może mieć istotny wpływ na żywotność bakterii podczas trawienia pokarmu w przewodzie pokarmowym [15].

W badaniach zaobserwowano obniżenie liczby komórek badanych bakterii o 2 rzędy log po 2 h inkubacji, w porównaniu z ich liczbą początkową. Stwierdzono, że dodatek lizozymu i pepsyny nie miał istotnego wpływu na przeżywalność badanych szczepów w modelowym soku żołądkowym o pH 2,5 (tab. 3).

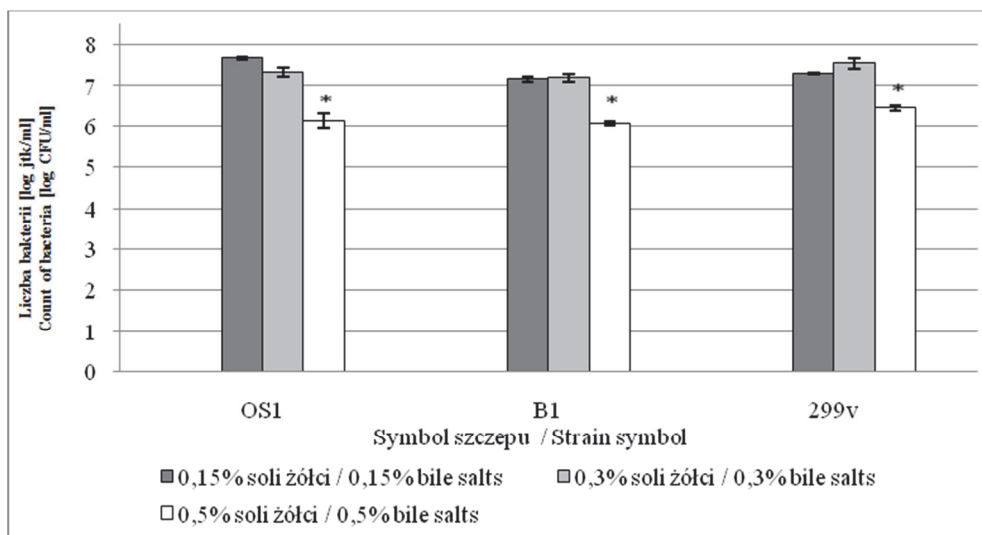
Pankreatyna jest mieszaniną enzymów (amylaz, lipaz i proteaz), wydzielaną przez zewnątrzwydzielnicze komórki trzustki. Ułatwia procesy trawienia i wchłaniania białek, tłuszczów i skrobi oraz może oddziaływać na komórki bakterii.

Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia wykazano, że liczba bakterii badanych szczepów nie różniła się, niezależnie od dodatku enzymów i stwierdzono, że dodatek pankreatyny do modelowego soku jelitowego nie miał statystycznie istotnego ($p < 0,05$) wpływu na przeżywalność szczepów (tab. 3). Monteagudo-Mera i wsp. [10] również wykazali brak wpływu enzymów trawiennych i stwierdzili, że bakterie fermentacji mlekowej wykazują naturalną oporność na pankreatynę soku jelitowego.

Wpływ stężenia soli żółci w soku jelitowym na przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym przewodzie pokarmowym

Sok jelitowy jest wydzielany w ilości 0,7 l/dzień. Jego pH wynosi ok. 8, a stężenie soli mineralnych to ok. 0,5 %. Czynniki determinującymi przeżywalność bakterii w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego są: żółć i obecność enzymów, które zasadniczo wpływają na lizę komórek oraz na przepuszczalność błon komórkowych [20]. Sole kwasów żółciowych są syntetyzowane z cholesterolu w wątrobie. Ich stężenie w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego oscyluje w granicach 0,15 ÷ 0,5 %, jednak naukowcy nie są zgodni co do stężenia soli żółciowych, które należałoby zastosować w badaniach *in vitro* [6, 7, 9]. Czas przebywania pokarmu w jelicie cienkim szacuje się na ok. 3 h [18], dlatego w niniejszej pracy zastosowano taki czas inkubacji.

Zaobserwowano istotny ($p < 0,05$), hamujący wpływ 0,5-procentowego dodatku żółci na przeżywalność badanych bakterii (rys. 2). Szczepy OS1, B1 i 299v cechowały się opornością na fizjologiczne stężenia żółci (0,15 ÷ 0,3 %).



*różnice statystycznie istotne pomiędzy próbami w obrębie jednego szczepu ($p < 0,05$) / statistically significant differences between measurements within one strain samples ($p < 0.05$)

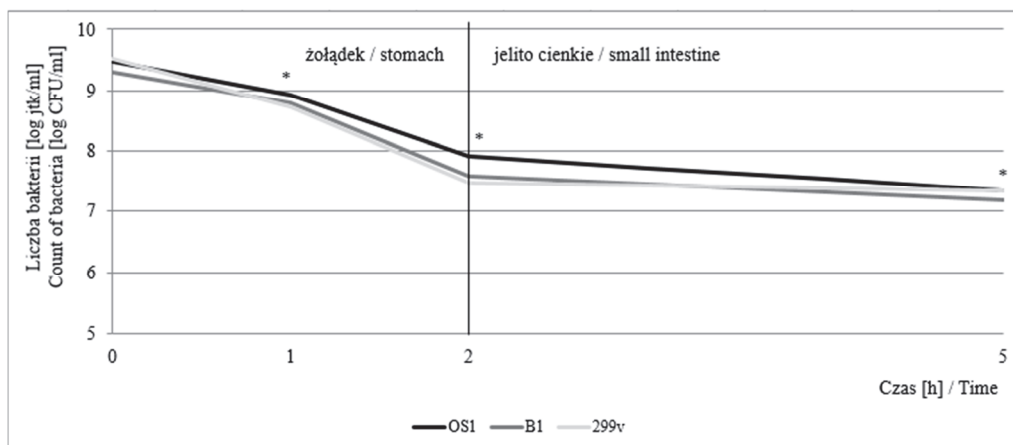
Rys 2. Wpływ stężenia soli żółciowych na przeżywalność badanych szczepów LAB po 3 h inkubacji w modelowym soku jelitowym

Fig 2. Effect of bile salts concentration on survival of studied LAB strains after 3 h incubation in intestinal juice simulant

Zaręba i wsp. [18] wykazali, że przeżywalność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w modelowym soku jelitowym zależy w głównej mierze od początkowej liczby bakterii, co potwierdzono także w badaniach własnych. Z kolei Ziarno [19] oraz Schillinger i wsp. [13] sugerują, że zdolność szczepów do wytwarzania BSH (hydrolazy soli żółci) ma istotny wpływ na oporność komórek bakterii na toksyczne działanie soli żółci. Enzym ten jest specyficznym czynnikiem obrony, a jego funkcją jest hydroliza soli żółciowych sprzężonych z tauryną lub glicyną do wolnych aminokwasów i do wolnych kwasów żółciowych. Możliwość regulacji aktywności BSH może być wykorzystana do badania zdolności zasiedlania układu pokarmowego przez *Lactobacillus*, ale jej brak nie dyskryminuje szczepów w kategorii probiotyczności, gdyż nadal mogą być odporne na wysokie, fizjologiczne stężenia żółci [13]. Dodatkowo stwierdzono, że poszczególne szczepy i gatunki *Lactobacillus* mogą wykazywać różną aktywność tej hydrolazy [1, 19].

Wpływ pasażu na przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym przewodzie pokarmowym

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że istnieje statystyczny związek pomiędzy żywotnością komórek bakterii a zastosowanymi warunkami pasażu badanych szczepów w modelowym przewodzie pokarmowym (rys. 3).



*różnice statystycznie istotne pomiędzy próbami w obrębie jednego szczepu ($p < 0,05$) / statistically significant differences between measurements within one strain samples ($p < 0.5$).

Rys 3. Wpływ zastosowanych warunków pasażu na przeżywalność szczepów LAB w modelowych warunkach przewodu pokarmowego

Fig 3. Effect of passage conditions applied on survival of LAB strains under simulated conditions of GI tract model

Zaobserwowano, że po 2 h inkubacji w soku żołądkowym, w przypadku wszystkich badanych szczepów, liczba komórek bakterii obniżyła się o ok. 2 rzędy log, a po 3 h inkubacji w soku jelitowym o niecały 1 rząd log.

Uzyskane wyniki badań mogą służyć do optymalizacji dyskryminacyjnych metod badań *in vitro* zdolności bakterii potencjalnie probiotycznych, do przeżycia w warunkach stresowych przewodu pokarmowego człowieka.

Wnioski

1. Największy wpływ na przeżywalność badanych szczepów bakterii miała wartość pH modelowego soku żołądkowego, przy czym dodatek mleka UHT jako medium żywnościowego zwiększał oporność badanych szczepów, działając w sposób ochronny.

2. Dodatek pepsyny i lizozymu do modelowego soku żołądkowego oraz pankreatyny do modelowego soku jelitowego nie miał istotnego wpływu na przeżywalność badanych szczepów *Lactobacillus*. Bakterie tolerowały fizjologiczne stężenie soli żółciowych w modelowym soku jelitowym.
3. Zaobserwowano statystycznie istotne ($p < 0,05$) zmniejszenie liczby komórek bakterii (do ok. $7 \log$ jtk/ml) w czasie pasażu w warunkach modelowego przewodu pokarmowego.
4. Udowodniono, że szczepy z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowane z żywności tradycyjnej wykazują jedną z cech probiotyczności, rekomendowanych przez FAO/WHO do badań probiotyków. W celu potwierdzenia właściwości probiotycznych badanych szczepów konieczne są dalsze badania, a szczególnie pożądane są testy *in vivo*.

Literatura

- [1] Casey P.G., Casey G.D., Gardiner G.E., Tangney M., Stanton C., Ross R.P., Hill C., Fitzgeralds G.F.: Isolation and characterization of anti-*Salmonella* lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. Lett. Appl. Microbiol., 2004, **39**, 431-438.
- [2] Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K.: Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. J. Appl. Microbiol., 1998, **84**, 759-768.
- [3] Del Piano M., Morelli L., Strozzi G.P., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garelo E., Carmagnola S., Pagliarulo M., Capurso L.: Probiotics: from research to consumer. Digest Liver Dis., 2006, **2 (38)**, 248-255.
- [4] FAO/WHO: Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Canada 2002, pp. 1-56.
- [5] Jensen H., Grimmer S., Naterstad K., Axelsson L.: *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol., 2012, **153**, 216-222.
- [6] Kos B., Šušćkovic J., Goreta J., Matošić S.: Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. Food Technol. Biotechnol., 2000, **2 (38)**, 121-127.
- [7] Kumar M., Ghosh M., Ganguli A.: Mitogenic response and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from indigenously pickled vegetables and fermented beverages. World J. Microbiol. Biotechnol., 2012, **28**, 703-711.
- [8] Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K., Guigas C., Franz C., Holzapfel W.H.: Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. Curr. Microbiol., 2008, **56**, 315-321.
- [9] Mathara J.M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P.M., Mbugua S.K., Shin H.K., Holzapfel W.H.: Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. Int. J. Food Microbiol., 2008, **126**, 57-64.
- [10] Monteagudo-Mera A., Rodríguez-Aparicio L., Rúa J., Martínez-Blanco H., Navasa N., García-Armesto M.R., Ferrero M.A.: *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. J. Funct. Food, 2012, **4**, 531-541.
- [11] Pitino I., Randazzo C.L., Mandalari G., Lo Curto A., Faulks R.M., Le Marc Y., Bisignano C., Caglia C., Wickham M.S.: Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. Food Microbiol., 2010, **27**, 1121-1127.
- [12] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.

- [13] Schillinger U., Guigas C., Holzapfel W.H.: *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 1289-1297.
- [14] Sip A., Więckowicz M., Olejnik-Schmidt A., Grajek W.: Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food Control*, 2012, **26**, 117-124.
- [15] Vizoso Pinto M.G., Franz C., Schillinger U., Holzapfel W.H.: *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, **109**, 205-214.
- [16] Walter J.: The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract. In: *Probiotics and prebiotics: scientific aspects*. Ed. G.W. Tannock. Caister Academic Press, Norfolk 2005, pp. 51-82.
- [17] Zaręba D.: Przeżywalność probiotycznego szczepu *Lactobacillus acidophilus* w mleku niefermentowanym i fermentowanym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **5 (60)**, 189-196.
- [18] Zaręba D., Ziarno M., Strzelczyk B.: Przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej w warunkach modelowych jelita cienkiego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **5 (60)**, 197-205.
- [19] Ziarno M.: Znaczenie aktywności hydrolazy soli żółci u bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Post. Mikrobiol.*, 2004, **3 (43)**, 285-296.
- [20] Ziarno M., Zaręba D., Jamiółkowska D.: Studia nad czynnikami determinującymi przeżywalność LAB w warunkach symulujących układ pokarmowy. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 2009, **3 (42)**, 990-994.

SURVIVAL OF *LACTOBACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM FOOD UNDER CONDITIONS OF SIMULATED GASTROINTESTINAL TRACT MODEL

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the survival of strains of *Lactobacillus*, isolated from food, under the conditions of a gastrointestinal (GI) tract model. The research material constituted two strains of *Lactobacillus* isolated from oscypek and bundz cheeses, and a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* 299v. It was proved that the addition of lysozyme and pepsin to gastric juice and of pancreatin to intestinal juice had no significant effect on the survival of *Lactobacillus*. There is a relationship between the viability of cells and the incubation time of bacteria strains studied. The 5 h lasting incubation of strains in the simulated GI tract model caused the count of bacteria to decrease by 2 ÷ 3 logarithmic orders. The pH value of gastric juice had the greatest effect on the survival of the bacteria studied. Furthermore, it was found that the addition of a food medium in the form of UHT milk increased the tolerance of the bacteria studied to the gastric juice simulant and had a protective effect. Also, it was found that the *Lactobacillus* strains analyzed, when treated by intestinal juice, tolerated a high physiological concentration of bile salts. The results obtained can be applied to optimize discriminant methods in *in vitro* studies on the ability of potentially probiotic bacteria to survive under stress conditions of human GI tract.

Key words: lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, survival, gastrointestinal (GI) tract, probiotics, *in vitro* study ☒