

ANNA GAŚSIOR, MILENA GIEMZA, WERONIKA PONIKIEWSKA,  
AGNIESZKA MACHUL-ŻWIRBLA, JANUSZ MAGIERA, JACEK BUŁKA,  
KRYSTYNA SKWARCZYŃSKA-MAJ, ELŻBIETA POMIETŁO

### ZASTOSOWANIE SZCZEPU PROBIOTYCZNEGO *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* PL8 W PRODUKCJI WYROBÓW CZEKOLADOWYCH O POROWATYM RDZENIU

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Promowany w ostatnich latach zdrowy styl życia przejawia się zwiększonym zapotrzebowaniem na produkty spożywcze o najwyższej wartości żywieniowej oraz określonych właściwościach prozdrowotnych. Z tego względu konsumenci coraz częściej sięgają po żywność funkcjonalną, która poza efektem odżywczym wykazuje udowodniony badaniami naukowymi, korzystny wpływ na jedną bądź więcej funkcji organizmu. Celem przeprowadzonych badań było opracowanie innowacyjnego produktu w postaci wyrobów czekoladowych o porowatym rdzeniu wzbogaconych w składniki funkcjonalne. W celu wyselekcjonowania szczepu probiotycznego najlepiej przystosowanego do warunków produkcyjnych drażetek czekoladowych, przeprowadzono szczegółową charakterystykę 20 bakterii z rodzajów *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus* oraz *Limosilactobacillus* tj. identyfikację fenotypową i genotypową, badanie lekowrażliwości, analizę oporności na sole żółci i sok żołądkowy, test zdolności do adherencji do komórek nabłonka jelitowego, badanie aktywności antibakteryjnej. Szczepy przebadano także pod kątem przeżywalności w warunkach przemysłowych takich jak: podwyższona temperatura i wilgotność, niskie pH, obecność tlenu, dodatek prebiotyku i skład podłoża przemysłowego do hodowli. Opracowano także sposób wytwarzania drażetki czekoladowej składającej się z nagazowanego czekoladowego rdzenia zawierającego szczep probiotyczny i prebiotyk oraz z cukrowej otoczki.

**Wyniki i wnioski.** Wyselekcjonowano szczep *Lactiplantibacillus plantarum* PL8 i opracowano sposób jego aplikacji do drażetek czekoladowych w postaci płynnej, mikrokapsułkowanej w nośniku tłuszczowym szczepionki. Otrzymany w ten sposób wyrób czekoladowy, zawierający probiotyk i prebiotyk (glukooligosacharyd) spełnia wymagania WHO/FAO w zakresie zawartości bakterii probiotycznych w żywności tj. liczebność bakterii  $\geq 10^6$  jtk/g przez cały okres przydatności do spożycia. Opracowane drażetki czekoladowe wykazują unikalne właściwości prozdrowotne, a także atrakcyjne cechy organoleptyczne.

---

Mgr A. Gąsior, mgr M. Giemza, mgr inż. W. Ponikiewska, dr n. med. A. Machul-Żwirbla, Prolab Sp. z o.o. Sp. Komandytowa, ul. Daliowa 4/LU8, 30-612 Kraków; mgr inż. J. Magiera, mgr inż. J. Bulka, mgr inż. K. Skwarczyńska-Maj, mgr E. Pomietło, Maspex-GMW Sp z o.o. ul. Chopina 10, 34-100 Wadowice. Kontakt: e-mail: gasior@pro-lab.pl

**Słowa kluczowe:** probiotyki, prebiotyki, *Lactiplantibacillus plantarum* PL8, wyroby czekoladowe, żywność funkcjonalna

## Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się nieustający wzrost zainteresowania żywnością funkcjonalną, która obok właściwości odżywczych wykazuje również działania prozdrowotne. Czynniki takie jak: starzenie się społeczeństwa, wzrost zachorowań na choroby cywilizacyjne, wysokie koszty opieki medycznej, rozwój technologii żywności, dostęp do nowych składników a także rosnąca świadomość konsumentów na temat oddziaływania pokarmu na organizm ludzki, doprowadziły do intensywnego rozwoju tej kategorii żywności.

W tradycji Dalekiego Wschodu nie ma wielkiej różnicy pomiędzy pożywieniem a lekiem, dlatego też Japończycy już w 1980 roku podjęli badania nad wpływem składników żywności na organizm człowieka, a w 1984 r. w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia Japonii pierwszy raz pojawiło się pojęcie żywności specjalnego przeznaczenia zdrowotnego (FOSHU, ang. *Foods for Specific Health Uses*) [4]. Definicja żywności funkcjonalnej, zaproponowana w 1999 r. przez europejski program badawczy FUFOSÉ (ang. *Functional Food Science in Europe*), brzmi: „Żywność może być uznawana za funkcjonalną, jeżeli udowodniono jej korzystny wpływ na jedną lub kilka funkcji organizmu ponad efekt odżywczy, a jej działanie prozdrowotne powinno być udokumentowane badaniami naukowymi” [2, 7]. Pojęcie żywności funkcjonalnej obejmuje zarówno żywność specjalnego przeznaczenia żywieniowego, żywność wzbogaconą, jak również żywność powszechnego spożycia. Należy jednak pamiętać, że nie posiada ona jeszcze regulacji prawnej, natomiast żywność wzbogacona ma swoje odniesienie i uwzględnione wymagania w Rozporządzeniu (UE) nr 1925/2006.

Żywność funkcjonalna musi pozostać żywnością konwencjonalną i wykazywać korzystne oddziaływanie (m.in. pozytywnie wpływać na czynności organizmu, przyczyniać się do poprawy samopoczucia, wspomagać działanie układu pokarmowego czy regulować poziom stresu) w ilościach, które oczekuje się, że będą normalnie spożywane z dietą [15, 18]. Istnieje wiele kryteriów jej podziału i tak na rynku spożywczym znajdziemy produkty niskoenergetyczne, wysokobiałkowe, niskosodowe, energizujące, o obniżonej zawartości cholesterolu, a także wzbogacone w takie składniki bioaktywne jak: probiotyki, prebiotyki, postbiotyki, błonnik, witaminy, składniki mineralne i inne. Ze względu na przeznaczenie żywność funkcjonalna dedykowana jest osobom w podeszłym wieku, aktywnym fizycznie, niemowlętom, kobietom w ciąży, a także w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia chorób nowotworowych, chorób krążenia, osteoporozy i zwiększenia sprawności psychofizycznej [22, 24].

Żywność probiotyczna stanowiąca specyficzny rodzaj żywności funkcjonalnej zawiera w swoim składzie: *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei* czy *Bifidobacterium bifidum*. Produkt, aby mógł zostać nazwany probiotycznym, musi spełniać określone warunki, tj. zawarte w nim drobnoustroje muszą posiadać status GRAS (ang. *Generally Recognized As Safe*), zostać wyizolowane z prawidłowej mikrobioty człowieka, a w przypadku podania doustnego – wykazywać antagonizm do patogennych bakterii przewodu pokarmowego oraz oporność na działanie soli żółci, enzymów trawiennych i soku żołądkowego o niskim pH. Produkty probiotyczne muszą wywierać pozytywny wpływ na funkcjonowanie organizmu, a obecne w nich drobnoustroje powinny zachować żywotność w trakcie całego ich terminu przydatności do spożycia. Aktualnie obowiązująca definicja probiotyków, wprowadzona przez WHO a zatwierdzona przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Naukowe Probiotyków i Prebiotyków (ISAPP), brzmi „żywe mikroorganizmy, które podane w odpowiedniej ilości wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza” [13].

Prebiotyki, czyli składniki pokarmowe niepodlegające trawieniu w przewodzie pokarmowym, to kolejny przykład substancji bioaktywnych dodawanych do żywności funkcjonalnej. Pobudzają wzrost bakterii probiotycznych, a także zwiększają ich aktywność w jelicie grubym [16]. Prebiotyki, podobnie jak probiotyki, muszą posiadać kilka specyficznych właściwości, m.in: obniżać pH treści jelitowej, być odporne na hydrolizę i enzymy trawienne oraz nie ulegać przyswojeniu w górnym odcinku przewodu pokarmowego [10]. Dodatkowo powinny wykazywać pozytywny wpływ na motorykę przewodu pokarmowego, a także być odporne na procesy technologiczne. Przedstawicielami prebiotyków są oligosacharydy (glukooligosacharydy, fruktooligosacharydy, laktuloza) i polisacharydy (inulina, celuloza, skrobia oporna, pektyny) [30].

Połączenie probiotyków z prebiotykami stanowią synbiotyki. Spożywanie produktów synbiotycznych wspiera funkcjonowanie mikrobioty jelitowej, przyczynia się do kolonizacji jelita grubego bakteriami probiotycznymi, przyspiesza trawienie cukrów, wpływa na redukcję stanów zapalnych, a także w przypadku niektórych produktów, obniża ciśnienie krwi i poziom cholesterolu [25]. Synbiotyki zmniejszają stężenie szkodliwych metabolitów, zapobiegają biegunkom, a także zaparciom. Dodatkowo stwarzają w jelicie lepsze warunki do wytwarzania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (np. kwasu masłowego), ułatwiają wchłanianie składników mineralnych i witamin z pożywienia, a także oddziałują pozytywnie na układ immunologiczny [8].

Produkty czekoladowe, pomimo tego, że cieszą się szczególnym zainteresowaniem, głównie wśród dzieci, nie są produktami o wysokiej wartości odżywczej. Zawierają bowiem w swoim składzie głównie cukier i tłuszcze. Sektor spożywczy poszukuje zatem nowych receptur i technologii wytwarzania wyrobów czekoladowych, które dostarczą produktów mniej kalorycznych i posiadających wartości prozdrowotne.

Celem niniejszych badań było opracowanie innowacyjnego produktu w postaci wyrobów czekoladowych o porowatym rdzeniu wzbogaconych w składniki funkcjonalne, tj. probiotyki oraz prebiotyki.

## **Materiały i metody badań**

### *Szczepy bakterii*

Materiał do badań stanowiło 20 szczepów bakterii kwasu mlekowego (LAB; ang. *Lactic Acid Bacteria*) z rodzajów *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus* oraz *Limosilactobacillus*, które zostały wyizolowane z przewodu pokarmowego zdrowych noworodków urodzonych siłami natury, karmionych mlekiem matki, bez objawów stanu zapalnego przewodu pokarmowego. Materiał po pobraniu został opracowany w Laboratorium Mikrobiologicznym firmy Prolab Sp. z o.o. Sp. Komandytowa a wyizolowane szczepy bakterii scharakteryzowane w oparciu o metody genotypowe oraz fenotypowe, zgodnie z zaleceniami Światowej Organizacji Żywnienia (FAO), Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) [13] oraz Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) [12].

### *Identyfikacja fenotypowa i genotypowa*

Identyfikację fenotypową przeprowadzono za pomocą testu API 50 CH firmy bioMérieux (Francja), który jest wystandaryzowanym zestawem do identyfikacji gatunków bakterii z rodzajów: *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Limosilactobacillus*, a także pokrewnych. Składa się z 50 studzienek reakcyjnych, zawierających liofilizowane substraty (m.in. cukry: D-glukozę, D-fruktozę, D-mannozę; glukonian potasu; cytrynian żelaza itd.). Analizy przeprowadzono w oparciu o instrukcję producenta, a wyniki odczytano za pomocą oprogramowania apiweb™ (bioMérieux, Francja).

Ponadto szczepy bakterii (n = 20) zostały poddane identyfikacji z wykorzystaniem metod genotypowych: PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) [32]. Izolację genomowego DNA przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta załączoną do zestawu DNA GeneMATRIX Basic DNA Purification Kit (EURx, Polska). W przeprowadzonych reakcjach PCR wykorzystano sekwencje starterów umieszczone w Tabeli 1 oraz warunki opisane w literaturze [8,33].

Amplikony DNA uzyskane w reakcji PCR rozdzielono za pomocą elektroforezy agarozowej w obecności kontroli dodatnich, które stanowiły materiały genetyczne szczepów wzorcowych: *L.plantarum* ATCC 8014, *L.rhamnosus* ATCC 53103, *L.fermentum* ATCC 14931 oraz markera wielkości DNA. Wyniki wizualizowano za pomocą transiluminatora UV Gel Doc XR+ (Bio-Rad, USA)..

Tabela 1. Sekwencje starterów zastosowanych do identyfikacji szczepów bakterii kwasu mlekowego

Table 1. Sequences of primers used to identify lactic acid bacteria strains

Gatunek / Species	Startery / Primers	Sekwencja 5'-3' / Sequence 5'-3'
<i>L.plantarum</i>	Lfpr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT
	PlanII	TTACCTAACGGTAAATGCGA
<i>L.fermentum</i>	Lfpr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT
	FermII	CTGATCGTAGATCAGTCAAG
<i>L.rhamnosus</i>	RrI	CAGACTGAAAGTCTGACGG
	RhaII	GCGATGCGAATTTCTATTATT
<i>L.paracasei</i>	Lpar-4	GGCCAGCTATGTATTCACTGA
	LU-5	CTAGCGGGTGCGACTTTGTT

### Lekowrażliwość

Bezpieczeństwo 20 analizowanych szczepów bakterii kwasu mlekowego potwierdzono w badaniach lekowrażliwości na wybrane antybiotyki metodą dyfuzyjno-krażkową Kirby-Bauera [1]. Zgodnie z tą procedurą hodowle bakterii z rodzajów *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Lacticaseibacillus* doprowadzano do gęstości 0,5 w skali MacFarlanda, a następnie zanurzano jałową wymazówkę w 10 ml inokulum i rozprowadzano na powierzchni stałej pożywki MRS Agar (Oxoid, UK). Na tak przygotowanym podłożu umieszczono krążki nasycone odpowiednim antybiotykiem, o określonym stężeniu: penicylina (1 µg), ciprofloksacyna (5 µg), doksycyklina (30 µg), oksacylina (1 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (25 µg), erytromycyna (15 µg), ampicylina (2 µg), klindamycyna (2 µg), wankomycyna (30 µg), gentamycyna (30 µg) oraz metronidazol (5 µg) (Oxoid, UK). Płytki inkubowano następnie w warunkach beztlenowych z wykorzystaniem systemu GasPak (BD BBL™, USA) przez 48 h, w temp. 37 °C. Po zakończeniu inkubacji dokonywano pomiaru stref zahamowanego wzrostu badanego szczepu bakterii wokół krążka z antybiotykiem (w mm), które porównano z wartościami otrzymanymi dla szczepów wzorcowych (*Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014, *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 14931, *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Lacticaseibacillus paracasei* BAA-52).

### Oporność na sok żołądkowy

Stopień przeżywalności 20 szczepów w warunkach symulujących środowisko żołądka oznaczono posługując się metodą Clarka [33], którą zmodyfikowano w ten sposób, iż zamiast stężonego kwasu solnego zastosowano modelowy sok żołądkowy składający się ze sterylnego roztworu 0,5 % NaCl z dodatkiem lizozymu (1 g/l) i pepsyny (0,3 g/l) doprowadzony do pH 2,5 przy użyciu 5 M HCl. Modelowy sok żołądkowy rozlewano po 1 ml do jałowych próbek, a następnie do każdej z nich kolejno doda-

wano po 100  $\mu\text{l}$  24-godzinnej hodowli LAB o gęstości  $10^7$  jednostek tworzących kolonię ( $\text{jtk}/\text{cm}^3$ ). Mieszaninę inkubowano przez 30 min. w  $37^\circ\text{C}$  w warunkach ściśle beztlenowych z wykorzystaniem systemu GasPak (BD BBL™, USA). Po upływie wyznaczonego czasu próbkę starannie mieszano, wykonywano szereg dziesięciokrotnych rozcieńczeń i posiew powierzchniowy na agar MRS (Oxoid, UK) w celu określenia liczby żywych komórek LAB. Wyniki wyrażono jako  $\log \text{jtk}/\text{cm}^3$ .

#### *Oporność na sole żółci*

Oporność 20 szczepów bakterii na sole żółci oznaczono w oparciu o metodę Dashkevicza i Feighnera [9]. Polegała ona na dodaniu do agaru MRS (Oxoid, UK) barwnika: purpury bromokrezolowej (POCH, Polska) w ilości  $0,17 \text{ g}/\text{dm}^3$  oraz soli żółci (OXGAL, BD) w pięciu kolejnych stężeniach: 1; 2; 5; 10;  $20 \text{ g}/\text{dm}^3$ . Na tak przygotowane stałe podłoża posiewano metodą redukcyjną po 100  $\mu\text{l}$  hodowli LAB, które następnie inkubowano przez 48 godzin w warunkach beztlenowych z wykorzystaniem GasPak (BD BBL™, USA). Po zakończonej inkubacji kolonie szczepów opornych na dane stężenie soli żółci nabierały koloru jasnożółtego, jak również podłoże wzrostowe zmieniało swoje zabarwienie z fioletowego na żółte. Intensywność wzrostu badanego szczepu i zabarwienia podłoża na kolor żółty oceniono w skali półilościowej (od „-” do „+++”), gdzie: - brak zmiany zabarwienia podłoża, + słaba zmiana zabarwienia podłoża, ++ średnia zmiana zabarwienia podłoża, +++ silna zmiana zabarwienia podłoża.

#### *Zdolność adherencji do komórek nabłonka jelitowego*

W celu sprawdzenia czy badane szczepy ( $n = 20$ ) posiadają zdolność adherencji do komórek nabłonka jelitowego wykorzystano ludzką linię tkankową Caco-2. Hodowlę tkanki prowadzono przez 15 dni w atmosferze zawierającej 10 %  $\text{CO}_2$ , w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  oraz w podłożu hodowlanym DMEM (Gibco, USA) z dodatkiem 10 % surowicy wołowej (FBS; Sigma-Aldrich, USA). Płyny hodowlane wymieniano regularnie, a po osiągnięciu zlewnego wzrostu czyli tzw. „monolayer”, komórki pasażowano stosując 0,25-procentową trypsynę (Sigma-Aldrich, USA), a następnie przesiewano je na płytki 24-dołkowe doprowadzając do gęstości  $5 \times 10^5$  komórek/dołek. Hodowlę tkankową linii Caco-2 prowadzono dalej na powierzchni jałowych szkiełek podstawowych umieszczonych na dnie 24-dołkowych płytek przez kolejne 3 dni do osiągnięcia na ich powierzchni zlewnego wzrostu. Następnie do komórek dodawano po 100  $\mu\text{l}$  zawiesin szczepów bakterii uprzednio hodowanych przez 24 godziny w 10 ml płynnego podłoża MRS Broth (Oxoid, UK). Zawartość dołków hodowlanych uzupełniano 900  $\mu\text{l}$  świeżego podłoża DMEM (Sigma-Aldrich, USA). Końcowa gęstość populacji bakterii wynosiła około  $1 \times 10^8 \text{ jtk}/\text{cm}^3$ . Następnie komórki linii tkankowej Caco-2 wraz z badanymi szczepami inkubowano w temp.  $37^\circ\text{C}$  w atmosferze o zwiększonej wilgotności i przy 10 % zawartości  $\text{CO}_2$  przez okres 2 godzin. Po tym czasie

zawartość dołków przepłukiwano PBS (Sigma-Aldrich, USA) w celu usunięcia niezadherowanych bakterii i całość utrwalano 3,7 % paraformaldehydem (Sigma-Aldrich, USA). Szkiełka płukano PBS i przeprowadzono ich barwienie metodą Grama. Otrzymane w ten sposób preparaty były oceniane w mikroskopie świetlnym (Olympus BX51) pod powiększeniem 1000x. Komórki badanych szczepów, które zaadherowały do linii tkankowej były zliczane w 5 polach widzenia preparatu, a następnie wyliczono wynik średni, któremu przyporządkowano odpowiedni stopień adherencji zgodnie z zakresem podanym w literaturze [31].

#### *Aktywność antybakteryjna*

Antagonistyczne działanie 20 badanych szczepów wobec bakteryjnych czynników etiologicznych próchnicy oraz biegunek badano za pomocą półilościowej metody słupkowej [28]. W tym celu szczepy posiewano na stałe podłoża MRS Agar (Oxoid, UK). Hodowle prowadzono przez 48 godzin w temp. 37 °C w warunkach ściśle beztlenowych z wykorzystaniem GasPak (BD BBL™, USA). Po uzyskaniu wzrostu wycinano w podłożu MRS Agar słupki o średnicy 9 mm, które następnie umieszczano na powierzchni podłoż stałych, na które wcześniej naniesiono zawiesiny szczepów wzorcowych (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Streptococcus mutans* PCM 2502) o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Następnie płytki pozostawiano na cztery godziny w lodówce w temp. 4 °C, a po upływie tego czasu dalej inkubowano je w temperaturze 37 °C, w warunkach tlenowych przez 18 godzin dla wszystkich bakterii tlenowych, z wyjątkiem szczepu wzorcowego *Campylobacter jejuni*, który inkubowano w temperaturze 42 °C w warunkach mikroaerofilnych przez 72 godziny. Po inkubacji mierzono średnice stref zahamowania wzrostu szczepów wskaźnikowych podając wynik w mm.

#### *Przystosowanie do warunków technologicznych*

Pięć probiotycznych szczepów bakterii (65A, 124B (PL8), 75B, 113B, 9B) wyselekcjonowanych w pierwszym etapie badań na podstawie wybranych właściwości (m.in. najwyższej aktywności antybakteryjnej czy zdolności do adherencji) poddano analizie przystosowania do warunków technologicznych produkcji drażetek czekoladowych. W tym celu porównano ich wzrost na podłożach produkcyjnych względem wzrostu na standardowym podłożu laboratoryjnym dedykowanym dla bakterii kwasu mlekowego tj. MRS Broth (Oxoid, UK) jako podłożu kontrolnym. Zastosowano warunki hodowli odzwierciedlające parametry stosowane w wielu procesach przemysłowych przy produkcji żywności tj. temperaturę 45 °C, wilgotność do 100 %, pH 5.1, warunki tlenowe. Szczepy zawieszano w następujących płynnych podłożach wzrostowych: podłożu kontrolnym (MRS Broth, Oxoid, UK), podłożu przemysłowym (skład: ekstrakt drożdżowy, bezwodny octan sodu, cytrynian sodu, siarczan magnezu, chlorek

manganu, siarczan amonu, glukoza), wzbogaconym dodatkowo w kazeinę (10 %), podłożu przemysłowym z glicyną i treoniną (10 %), podłożu przemysłowym z lizyną (10 %), podłożu przemysłowym z peptonem roślinnym (10 %). W tym celu pobierano jedno oczko z 24-godzinnej hodowli szczepu bakterii na podłożu stałym (MRS Agar, Oxoid, UK) i dodawano do 10 ml danego płynnego podłoża wzrostowego. Hodowlę prowadzono przez 48 godzin w warunkach wymienionych powyżej. Liczebność bakterii sprawdzano za pomocą metody rozcieńczeń dziesięciokrotnych w następujących punktach czasowych: na początku hodowli (0h) oraz po upływie 12, 24, 36 oraz 48 godzin. Liczbę kolonii bakterii wyrosłych na podłożach stałych zliczano, a wyniki podawano w jednostkach tworzących kolonie w przeliczeniu na 1 ml (jtk/cm<sup>3</sup>).

*Ustalenie optymalnej metody przygotowania probiotyków do aplikacji do drażetek czekoladowych*

Hodowle pięciu szczepów probiotycznych na wyselekcjonowanym podłożu przemysłowym z kazeiną wykorzystano następnie do opracowania kultur starterowych przeznaczonych do aplikacji do drażetek czekoladowych. W tym celu przeprowadzono ich proces liofilizacji, suszenia rozpyłowego oraz zagęszczania. Suszenie liofilizacyjne wykonano w liofilizatorze Beta1-8 LSC firmy Christ. Zawiesinę komórek przygotowano poprzez zamrożenie w temp. -80 °C. W pierwszej fazie procesu biomasę suszono w temp. -5 °C (16 h), następnie w 10 °C (24 h). Faza dosuszania trwała 8 h (temp. 20 °C). Suszenie rozpyłowe wykonano na suszarni Mobile Minor firmy GEA wyposażonej w układ do sterylizacji powietrza wlotowego za pomocą filtra hepa (GEA). Temperatura powietrza wlotowego wynosiła 180 °C a wylotowego – 80 °C. Proces suszenia trwał 60 min. Zagęszczenie hodowli szczepów probiotycznych uzyskano przez odwirowanie (wirówka Eppendorf Centrifuge 5920R) 10 dm<sup>3</sup> hodowli (temperatura 4 °C, 20 minut, 3 500 rpm), usunięcie nadsącza i zawieszenie pozostałego osadu bakterii w 1 l tłuszczu kakaowego. Otrzymane w ten sposób kultury starterowe wysiano z wykorzystaniem metody rozcieńczeń dziesięciokrotnych na podłoża hodowlane (MRS Agar, Oxoid, UK) w celu określenia liczby komórek bakterii (jtk/cm<sup>3</sup> lub g), a następnie dodano do czekolady, żeby dokonać wyboru najkorzystniejszego wariantu. Czekoladę z probiotykami poddano ocenie organoleptycznej. Posłużono się 5-punktową skalą (Tabela 2), w której weryfikowano barwę, zapach, smak i konsystencję. Przyjęto następujące współczynniki ważkości: barwa – 0,20, zapach – 0,20, smak – 0,35, konsystencja – 0,25. Do przeprowadzenia oceny organoleptycznej wykorzystano normę PN-A-88032:1998.



Tabela 2. Tabela do skali oceny organoleptycznej  
Table 2. Table for the organoleptic evaluation scale

Cecha / Characteristic	Wyniki oceny / Evaluation	Współczynnik ważkości / Weight factor	Wynik oceny przy uwzględnieniu współczynnika ważkości / Evaluation result taking into account the weight factor
Barwa / Color	1 ÷ 5	0,20	Wynik oceny x współczynnik ważkości / Results x weighting factor
Zapach / Odor	1 ÷ 5	0,20	
Konsystencja / Consistency	1 ÷ 5	0,25	
Smak / Taste	1 ÷ 5	0,35	

Objaśnienia / Explanatory notes:

Liczba punktów: 5 – bardzo dobry, produkt idealny, typowy; 4 – dobry, produkt typowy z nieznacznymi odchyleniami; 3 – dostateczny, produkt z wyraźnymi odchyleniami lub nieznacznymi defektami; 2 – niedostateczny, silne defekty; 1 – zły, produkt całkowicie zmieniony

Number of points: 5-very good, ideal and typical product, 4-good, typical product with slight deviations, 3-sufficient, product with clear deviations or slight defects, 2-insufficient, product with strong defects, 1-bad, product completely changed.

#### *Aplikacja bakterii probiotycznych do wyrobu czekoladowego*

Wyselekcjonowany szczep probiotyczny *L.plantarum* 124B (PL8) o najlepszej przeżywalności w warunkach technologicznych w kolejnym kroku zaaplikowano do gotowego produktu w postaci wyrobu czekoladowego. W tym celu płynną szczepionkę wprowadzono:

- wyłącznie do otoczki drażetek,
- wyłącznie do rdzenia drażetek,
- zarówno do otoczki jak i do rdzenia drażetek.

Liczebność bakterii w poszczególnych miejscach aplikacji zbadano przez rozpuszczenie 10 g drażetek czekoladowych w 90 ml płynnego podłoża MRS Broth (Oxoid, UK), w wyniku czego uzyskano homogenną zawiesinę, którą następnie posiano metodą rozcieńczeń dziesięciokrotnych na płytki ze stałym podłożem MRS Agar (Oxoid, UK). Hodowlę płytek prowadzono w temp. 37 °C, w warunkach beztlenowych przez 48 h. Liczbę wyrosłych kolonii zliczano, a wyniki podawano w jednostkach tworzących kolonie w przeliczeniu na 1 ml (jtk/cm<sup>3</sup>).

#### *Wpływ prebiotyków na żywotność szczepu *L.plantarum* 124B (PL8)*

Aby utrzymać żywotność szczepu probiotycznego *L.plantarum* 124B (PL8) w drażetkach czekoladowych przez możliwie najdłuższy czas na poziomie zalecanym przez WHO/FAO (nie mniej niż 10<sup>6</sup> jtk/g), przeprowadzono badania mające na celu wybór najlepszego układu prebiotyków i cukrów w czekoladzie. W tym celu, bazując na opracowanych przez producenta autorskich recepturach dla drażetek czekolado-

wych, przygotowano 6 rodzajów czekolad mlecznych z różną zawartością procentową prebiotyków w stosunku do wszystkich składników w ujęciu wagowym.

Przeanalizowano następujące warianty:

1. Czekolada mleczna inulina (13.5 %) / cukier;
2. Czekolada mleczna glukooligosacharyd (37 %) / fruktoza;
3. Czekolada mleczna glukooligosacharyd (37 %) / miód w proszku;
4. Czekolada mleczna oligofruktoza (13.5 %) / cukier;
5. Czekolada mleczna oligofruktoza (13.5 %) / fruktoza;
6. Czekolada mleczna inulina (13.5 %) / fruktoza.

Z 24-godzinnej hodowli szczepu *L. plantarum* 124B (PL8) w podłożu MRS Agar (Oxoid, UK) pobierano po 100 µl i umieszczano na spodzie 24-dółkowych płytek. Na płynną hodowlę szczepów probiotycznych наносono 1 ml rozpuszczonej czekolady z prebiotykiem o temperaturze 45 °C. Całość dokładnie mieszano. Płytki umieszczano w temperaturze 45 °C na 72 godziny. Następnie wykonywano rozcieńczenia dziesięciokrotne w celu oznaczenia liczby komórek bakterii probiotycznych, które przeżyły w 1 ml płynnej czekolady (jtk/cm<sup>3</sup>).

#### *Opracowanie technologii otrzymywania aerodrażetek*

W celu wytworzenia wyrobu czekoladowego o porowatym rdzeniu płynną hodowlę szczepu *L. plantarum* 124B (PL8) o liczebności bakterii na poziomie  $3,0 \times 10^{10}$  jtk/cm<sup>3</sup> zadawano do czekolady mlecznej zawierającej w składzie glukooligosacharyd (37 %) i fruktozę. Całość mieszano przez 2 godziny w temperaturze 39 °C. Gotową czekoladę rozlewano na rolki i formowano z niej rdzenie dodatkowo napowietrzane gazem. W ramach badań opracowano układ formujący do wykonywania aerordzeni produktów spożywczych, zwłaszcza czekolady, a urządzenie go zawierające oraz sposób wytwarzania stały się przedmiotem zastrzeżenia patentowego nr P.443733. Na gotowe aerordzenie natryskiwano następnie syrop do osłonki i intensywnie mieszano. Rdzenie pokrywano dodatkowo osłonką kolorową oraz glazurą. Gotowe drażetki czekoladowe pakowano do trzech rodzajów opakowań: standardowego opakowania, folii barierowej (pakowanie bez powietrza), folii barierowej (pakowanie w atmosferze azotu). Następnie przechowywano je w temperaturze 16 °C. Kontrolę żywotności szczepu *L. plantarum* 124B (PL8) w drażetkach czekoladowych prowadzono raz w miesiącu przez kolejnych 9 miesięcy celem wyznaczenia ich terminu przydatności do spożycia.

Badania wykonano w trzech powtórzeniach a zmienne ilościowe zostały opisane za pomocą średniej arytmetycznej ± odchylenie standardowe (SD).

#### **Wyniki i dyskusja**

Szczepy bakterii kwasu mlekowego zostały poddane identyfikacji do gatunku z wykorzystaniem metody fenotypowej (test biochemiczny API) oraz metody genoty-

powej (reakcji łańcuchowej polimerazy, ang. PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Identyfikacja szczepów bakterii kwasu mlekowego  
Table 3. Identification of lactic acid bacteria strains

Szczep bakterii / Bacteria strain	Metoda badawcza / Research method	
	Metoda biochemiczna (API) / Biochemical method (API)	Metoda molekularna (PCR) / Molecular method (PCR)
97B, 100B, 123B, 124B (PL8), 127B, 31B, 18B, 113B, 65A, 75B, 9B	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
86A, 92A, 103A, 108A, 120A, 127A	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
87B, 109B	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
12B	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>

Zidentyfikowano 11 szczepów *Lactiplantibacillus plantarum*, 6 szczepów *Limosilactobacillus fermentum*, 2 szczepy *Lacticaseibacillus rhamnosus* oraz 1 szczep *Lacticaseibacillus paracasei*. Dla poszczególnych szczepów wyniki uzyskane z dwóch zastosowanych metod identyfikacji były tożsame.

Bakterie probiotyczne nie mogą posiadać specyficznych determinant oporności na antybiotyki przenoszonych na ruchomych elementach genetycznych, takich jak geny oporności na tetracyklinę, gdyż wówczas mogą stanowić rezerwuar oporności dla potencjalnych drobnoustrojów patogennych [11]. Bezpieczeństwo analizowanych szczepów LAB potwierdzono zatem w badaniach lekowrażliwości. Uzyskane wyniki odniesiono do rezultatów otrzymanych dla szczepów wzorcowych i przedstawiono w Tabeli 4.

Wykazano, że szczepy bakterii kwasu mlekowego mają oporność typową dla rodzaju i gatunku. Nie posiadają mechanizmów oporności na antybiotyki, a więc wydaje się, że nie stanowią rezerwuaru genów lekooporności w naturalnym mikrobiomie. Należy jednak zaznaczyć, że przedstawione badanie stanowi wyłącznie analizę fenotypową lekowrażliwości dwudziestu szczepów LAB. Szczep *L.plantarum* 124B (PL8) wybrany w końcowym etapie badań nad inkorporacją do rdzeni czekoladowych poddano potem, poza opisanym tutaj projektem, sekwencjonowaniu całego genomu do celów ochrony patentowej. Analiza porównawcza rezultatów tego sekwencjonowania wobec wzorcowego szczepu *L.plantarum* ATCC 8014 nie wykazała genów oporności na antybiotyki innych niż te charakterystyczne dla gatunku *L.plantarum*, jak i nie wykazała obecności ruchomych elementów genetycznych zawierających geny kodujące oporność na antybiotyki (wyniki nieopublikowane).

Tabela 4. Oporność na antybiotyki szczepów bakterii kwasu mlekowego  
 Table 4. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria strains

Antybiotyk [stężenie] / Antibiotic [concentration]	Średnica strefy zahamowania wzrostu [mm] / Diameter inhibition zone [mm]			
	6 ÷ 16	17 ÷ 27	28 ÷ 38	> 39
Penicylina / Penicillin [1 µg]	ATCC 14931, 123B, 75B	ATCC 8014, ATCC 53103, 97B, 100B, 124B, 127B, 31B, 113B, 65A, 9B, 87B, 109B, 86A, 92A, 103A, 127A	BAA-52, 18B, 108A, 120A, 12B	-
Ciprofloksacyna / Ciprofloxacin [5 µg]	ATCC 8014, 97B, 123B, 127B, 86A, 103A, 127A, ATCC 14931	ATCC 53103, 100B, 124B, 31B, 18B, 113B, 65A, 75B, 9B, 92A, 108A, 120A	87B, 109B, 12B, BAA-52	-
Doksycyklina / Doxycycline [30 µg]	-	ATCC 8014, 97B, 100B, 123B, 124B, 127B, 86A, 92A, 103A, 127A	ATCC 53103, 31B, 18B, 113B, 65A, 75B, 9B, 87B, 108A, 120A, ATCC 14931, BAA-52	109B, 12B
Oksacylina / Oxacillin [1 µg]	ATCC 53103, ATCC 8014, 97B, 100B, 123B, 124B, 127B, 31B, 18B, 113B, 65A, 75B, 9B, 87B, 109B, 86A, 92A, 103A, 108A, 120A, 127A, ATCC 14931, 12B, BAA-52	-	-	-
Trimetoprim/sulfametoksazol / Trimethoprim/sulfamethoxazole [25 µg]	ATCC 53103, 127B, 87B, 109B, 86A, 92A, 103A, 108A, 120A, 127A, ATCC 14931, 12B, BAA-52	ATCC 8014, 97B, 100B, 123B, 124B, 31B, 18B, 113B	65A, 75B, 30B, 109B	-

Erytromycyna / Erythromycin [15 µg]	-	ATCC 8014, 97B, 100B, 123B, 124B, 127B, 86A, 103A	31B, 18B, 65A, 75B, 9B, 87B, 109B, ATCC 53103, 92A, 108A, 120A, 127A, ATCC 14931, BAA- 52	12B
Ampicylina / Ampicillin [2 µg]	ATCC 53103, 31B, 113B, 87B, 109B, 12B, BAA-52	ATCC 8014, 97B, 100B, 123B, 124B, 127B, 65A, 75B, 9B, 86A, 92A, 103A, 108A, 120A, 127A, ATCC 14931	-	-
Klindamycyna / Clindamycin [2 µg]	-	ATCC 53103, ATCC 8014, 97B, 100B, 123B, 124B, 127B, 31B, 113B, 65A, 75B, 9B, 92A	18B, 87B, 109B, 86A, 103A, 108A, 120A, 127A, ATCC 14931, BAA-52	12B
Gentamycyna / Gentamicin [30 µg]	-	ATCC 53103, ATCC 8014, 100B, 123B, 124B, 127B, 18B, 65A, 75B, 9B, 87B, 109B, 86A, 92A, 103A, 108A, 120A, 127A, ATCC 14931, 12B, BAA- 52	97B, 31B, 113B	-
Wankomycyna / Vancomycin [30 µg]	ATCC 53103, ATCC 8014, 97B, 100B, 123B, 124B, 127B, 31B, 18B, 113B, 65A, 75B, 9B, 87B, 109B, 86A, 92A, 103A, 108A, 120A, 127A, ATCC 14931, 12B, BAA-52	-	-	-
Metronidazol / Metronidazole [5 µg]	ATCC 53103, 87B ATCC 8014, 97B, 100B, 123B, 124B, 127B, 31B, 18B, 113B, 65A, 75B, 9B, 109B, 86A, 92A, 103A, 108A, 120A, 127A, ATCC 14931, 12B, BAA-52	-	-	-

Tabela 5. Przeżywalność szczepów bakterii kwasu mlekowego w modelowym soku żołądkowym

Table 5. Evaluation of tolerance of lactic acid bacteria to simulated gastric juice

Szczep bakterii / Bacteria strain		87B	86A	92A	97B	100B	103A	108A	109B	120A	123B	124B (PL8)	127A	127B	31B	18B	113B	65A	75B	12B	9B
Liczebność bakterii [log.jtk/g] / Number of bacterial cells [log CFU/cm <sup>3</sup> ]	Czas wyjściowy (0h) / Initial time (0h)	7,30 ± 0,81	7,70 ± 1,32	7,48 ± 0,72	7,30 ± 1,00	7,00 ± 0,15	7,95 ± 1,00	7,30 ± 1,00	7,70 ± 0,71	7,26 ± 0,76	7,30 ± 1,00	7,48 ± 0,31	7,70 ± 2,00	7,70 ± 0,76	8,65 ± 1,00	8,38 ± 1,20	8,79 ± 4,45	8,61 ± 1,64	8,41 ± 1,01	8,11 ± 0,75	8,11 ± 0,58
	Po 20 min. inkubacji w modelowym soku żołądkowym o pH 2.5 / After 20 minute incubation in simulated gastric juice at pH 2.5	6,48 ± 0,20	7,00 ± 0,16	6,00 ± 0,79	5,70 ± 0,50	6,00 ± 0,31	6,60 ± 1,15	5,78 ± 0,56	6,30 ± 1,77	6,00 ± 0,77	6,00 ± 0,31	6,00 ± 0,16	6,30 ± 1,41	6,30 ± 1,38	7,78 ± 1,90	7,60 ± 0,10	8,00 ± 0,89	7,78 ± 1,15	7,60 ± 2,65	7,60 ± 1,67	7,60 ± 1,50

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / The table shows mean values ± standard deviation

Kolejną cechą, którą powinny charakteryzować się szczepy bakterii probiotycznych jest duża oporność na niskie pH soku żołądkowego (Tabela 5) oraz sole żółci (Tabela 6, Rycina 1), gdyż tylko wówczas szczepy te podczas pasażu przez układ pokarmowy nie będą podlegały trawieniu i z powodzeniem będą mogły zostać zastosowane w preparatach doustnych.

Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano, że po 20 minutach inkubacji w modelowym soku żołądkowym o pH = 2,5 tylko 2 szczepy bakterii wykazały spadek żywotności o 2 logarytmy w stosunku do poziomu wyjściowego, a aż 18 – redukcję jedynie o 1 logarytm. Zjawisko to może wynikać z przystosowania aparatu metabolicznego bakterii do rozwoju w środowisku o niskim pH. Niektóre bakterie w środowisku o pH = 2,5 będą wykazywać obniżoną aktywność metaboliczną, ulegać osłabieniu i w miarę upływu czasu obumierać. Inne z kolei szybko przystosują się do zmiennych warunków wzrostu i będą dobrze tolerować silnie kwaśne środowisko. Może to być także wynikiem uruchamiania przez szczepy LAB odpowiedzi komórkowej związanej z syntezą białek szoku kwasowego [27,19]. Przeprowadzone badania wykazały, iż oporność bakterii na niskie pH soku żołądkowego jest cechą szczepozależną.

Tabela 6. Oporność szczepów bakterii kwasu mlekowego na sole żółci w stężeniach

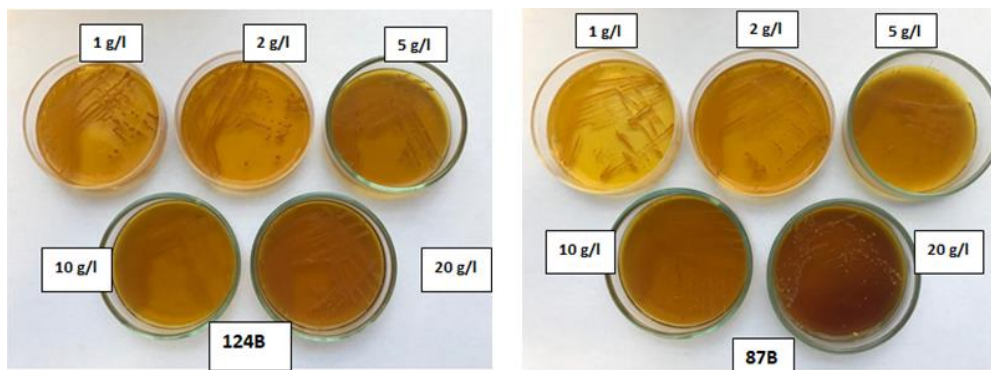
Table 6. Bile acid resistance of lactic acid bacteria strains

Stężenie soli żółci / Bile salt concentration [g/dm <sup>3</sup> ]	Szczep bakterii / Bacteria strain					
	87B, 97B,108A, 127A, 127B, 18B	86A, 124B(PL8),11 3B, 65A, 75B, 9B	92A, 31 B, 12B	100B	103A, 109B, 123B	120A
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	+++	+++	+++	+++	+++	++
5	+++	+++	++	+++	++	++
10	++	+++	++	+++	++	+
20	++	++	+	+++	++	+

Objaśnienia / Explanatory notes:

Legenda: - brak oporności, + słaba oporność, ++ średnia oporność, +++ silna oporność na sole żółci

Legend: - no resistance, + low resistance, ++ medium resistance, +++ high resistance



Ryc. 1. Oporność wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na sole żółci w stężeniach: 1, 2, 5, 10, 20 g/dm<sup>3</sup>

Fig. 1. Bile acid resistance of lactic acid bacteria strains (concentrations: 1, 2, 5, 10, 20 g/ dm<sup>3</sup>)

Przeprowadzone badania wykazały, iż oporność bakterii na sole żółci jest cechą szczepozależną, podobnie jak zdolność przetrwania w niskim pH soku żołądkowego. Oznacza to, że pewne szczepy bakterii kwasu mlekowego wykazują większą zdolność do wzrostu w wysokich stężeniach kwasu żółciowego niż pozostałe. Dzięki wykonanej analizie do badań związanych z opracowaniem technologii wytwarzania gotowego produktu wybrano pięć szczepów (szczepy nr: 65A, 124B, 75B, 113B, 9B) charakteryzujących się silną bądź średnią opornością na sole żółci. Zjawisko adherencji stanowi istotny proces dla przeżycia i namnażania się bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym, gdyż sam pasaż nie jest wystarczający do wywołania efektu zdrowotnego. Zdolność adherencji komórek bakterii probiotycznych do nabłonka determinuje czas ich przebywania w przewodzie pokarmowym, co stanowi ważne kryterium podczas selekcji szczepów probiotycznych [23,29]. W Tabeli 7 oraz na Rycinie 2 przedstawiono przykładowe wyniki zdolności szczepów probiotycznych do adherencji do komórek nabłonka jelitowego Caco-2.

Przedstawione wyniki badań wskazują, że 8 szczepów wykazało silne powinowactwo do ludzkiego nabłonka jelitowego, co oznacza, że posiadają one wysoką (w porównaniu do pozostałych szczepów) zdolność do kolonizacji jelita grubego. Jest to cecha niezwykle pożądana w produktach probiotycznych przyjmowanych doustnie.

Docelowo szczepy probiotyczne miały stanowić dodatek do wyrobów czekoladowych, dlatego zbadano ich działanie antagonistyczne wobec patogennych bakterii *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz *Campylobacter jejuni* PCM 2627, będących czynnikami etiologicznymi zakażeń przewodu pokarmowego. W badaniach uwzględniono również czynnik etiologiczny próchnicy zębów u dzieci, jakim jest *Streptococcus mutans* PCM 2502. Wyniki przedstawiono w Tabeli 8.



Tabela 7. Adherencja szczepów bakterii kwasu mlekowego do tkanki nabłonkowej jelita (Caco-2)

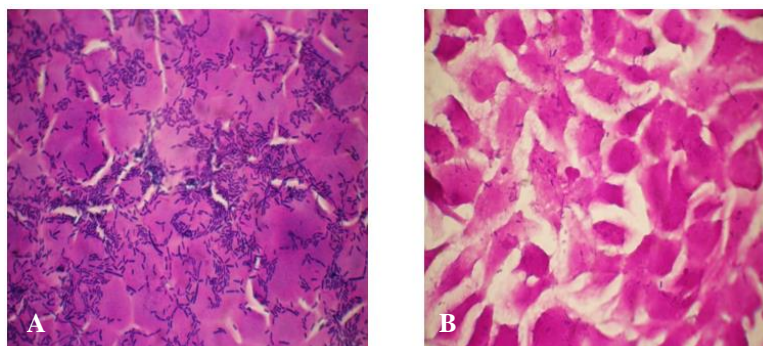
Table 7. Adherence of lactic acid bacteria strains to intestinal epithelial tissue (Caco-2)

Szczep bakterii / Bacteria strain	Średnia liczba komórek bakterii w polu widzenia / Average number of bacterial cells in the microscopic field	Stopień adherencji / Grade of adherence
87B	0	-
65A	100 ± 4	+++
124B (PL8)	105 ± 2	+++
86A	102 ± 4	+++
127B	62 ± 4	++
109B	78 ± 2	++
18B	65 ± 4	++
75B	100 ± 10	+++
92A	14 ± 3	-
97B	68 ± 11	++
113B	105 ± 5	+++
120A	13 ± 5	-
100B	62 ± 6	++
12B	45 ± 3	+
9B	98 ± 5	+++
103A	90 ± 4	+++
123B	16 ± 3	-
108A	2 ± 1	+
31B	70 ± 4	++
127A	96 ± 2	+++

Objaśnienia / Explanatory notes:

Legenda: +++ silna adherencja (> 80 komórek bakterii w polu widzenia), ++ średnia adherencja (60÷80 komórek bakterii w polu widzenia), + słaba adherencja (40÷60 komórek bakterii w polu widzenia), - brak adherencji (< 40 komórek bakterii w polu widzenia). W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe

Legend: +++ strong adherence (> 80 bacterial cells in the field of view), ++ medium adherence (60÷80 bacterial cells in the field of view), + low adherence (40÷60 bacterial cells in the field of view), - no adherence (< 40 bacterial cells in the field of view). Table shows mean values ± standard deviation



Ryc. 2. Adherencja wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego do linii tkankowej Caco-2. A. Silna adherencja *L.plantarum* 124B (PL8). B. Słaba adherencja *L.rhamnosus* 87B. Powiększenie 100x, mikroskop świetlny BX 51 firmy Olympus.

Fig. 2. Adherence of selected lactic acid bacteria strains to the Caco-2 tissue line. A. Strong adherence of *L. plantarum* 124B (PL8). B. Low adherence of *L.rhamnosus* 87B. 100x magnification, Olympus BX 51 light microscope.

Tabela 8. Aktywność antybakteryjna szczepów bakterii kwasu mlekowego wobec czynników etiologicznych próchnicy u dzieci oraz zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego

Table 8. Antibacterial activity of the lactic acid bacteria strains against etiological factors of caries in children and gastrointestinal disorders

Szczep bakterii / Bacteria strain	Stopień zahamowania wzrostu czynników etiologicznych [mm] / Growth inhibition of etiological factors [mm]				
	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>S.enteritidis</i> ATCC 13076	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>S.mutans</i> PCM 2502	<i>C.jejuni</i> PCM 2627
87B	27 ± 1,71	34 ± 0,78	16 ± 1,15	17 ± 1,01	14 ± 0,87
65A	24 ± 1,31	18 ± 0,5	11 ± 0,2	23 ± 0,46	26 ± 0,75
124B (PL8)	22 ± 0,5	17 ± 0,85	14 ± 0,85	14 ± 0,72	22 ± 0,36
86A	27 ± 2,16	22 ± 0,1	11 ± 0,1	15 ± 0,25	8 ± 0,35
127B	27 ± 0,67	30 ± 1,5	12 ± 1,37	15 ± 0,82	8 ± 0,76
109B	30 ± 2,95	25 ± 1,42	14 ± 0,49	20 ± 1,05	13 ± 1,43
18B	22 ± 0,5	16 ± 0,7	9 ± 0,4	19 ± 0,69	10 ± 1,22
75B	20 ± 0,75	17 ± 1,01	11 ± 0,1	21 ± 0,5	23 ± 0,5
92A	28 ± 0,9	23 ± 1,0	11 ± 0,56	15 ± 0,67	9 ± 0,35
97B	34 ± 1,32	28 ± 0,76	18 ± 0,44	21 ± 0,5	12 ± 0,46
113B	23 ± 0,3	17 ± 1,07	12 ± 0,44	22 ± 1,04	25 ± 0,75
120A	18 ± 0,7	16 ± 1,15	10 ± 0,35	12 ± 1,1	17 ± 1,01
100B	22 ± 1,32	20 ± 0,1	15 ± 0,21	20 ± 1,25	11 ± 0,53
12B	22 ± 0,5	18 ± 0,85	11 ± 0,53	20 ± 0,29	10 ± 0,72
9B	17 ± 0,8	16 ± 1,0	11 ± 0,96	19 ± 0,5	24 ± 0,15

103A	27 ± 1,08	29 ± 0,85	12 ± 0,61	13 ± 0,26	10 ± 0,3
123B	26 ± 0,7	35 ± 2,44	15 ± 0,31	19 ± 0,85	14 ± 0,95
108A	28 ± 0,95	22 ± 1,0	12 ± 1,37	14 ± 0,46	12 ± 0,5
31B	23 ± 0,21	18 ± 1,53	12 ± 0,46	21 ± 0,97	15 ± 0,26
127A	24 ± 0,1	31 ± 1,4	11 ± 0,32	14 ± 0,52	10 ± 0,53

Objaśnienia / Explanatory notes:

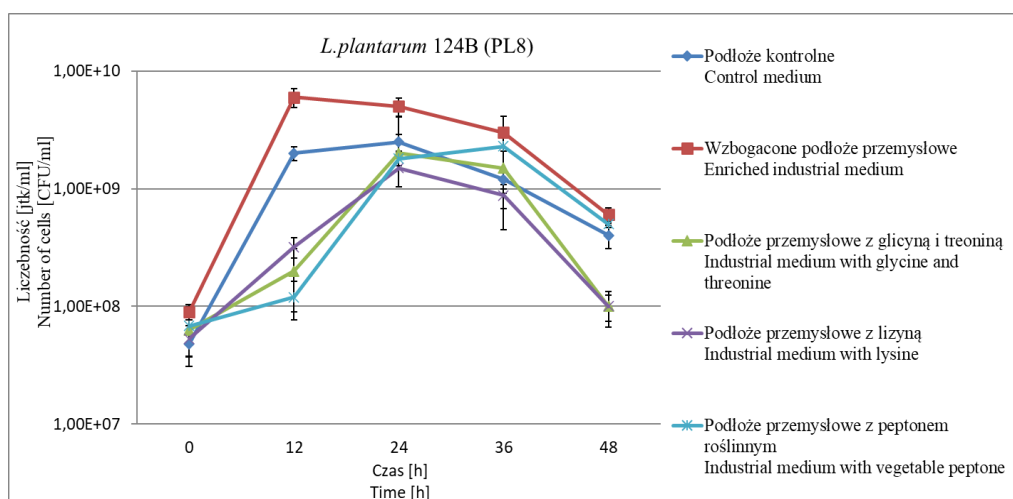
W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / The table shows mean values ± standard deviation

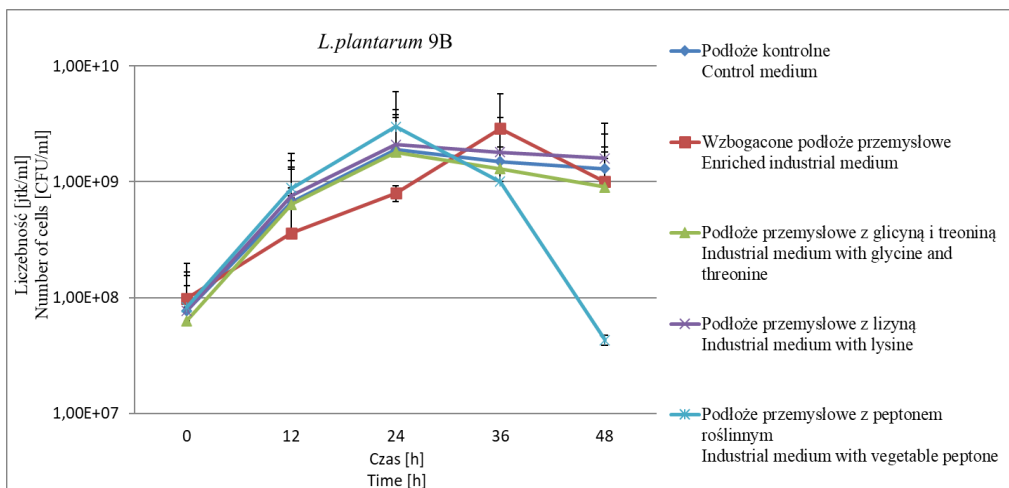
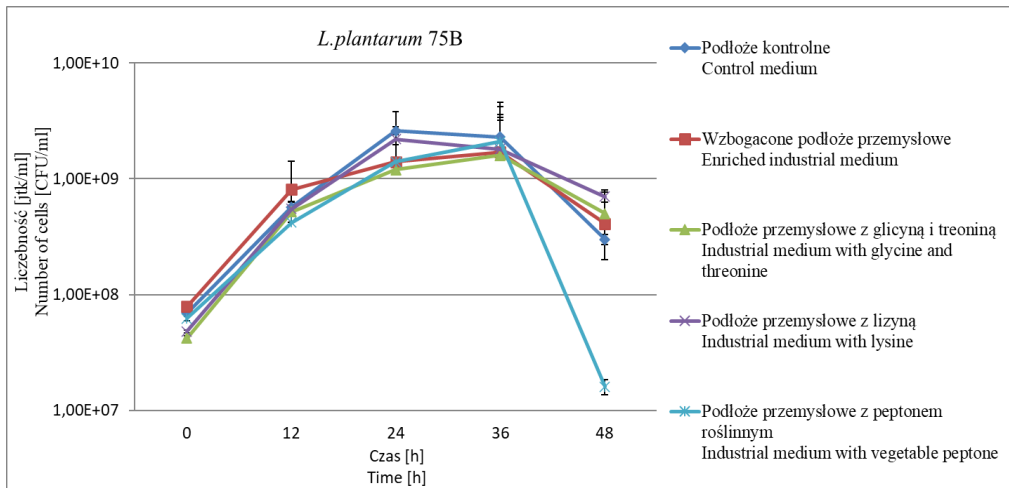
Badanie aktywności antybakteryjnej wobec wybranych czynników etiologicznych pozwoliło na wyselekcjonowanie 5 szczepów, które charakteryzowały się największymi strefami zahamowania wzrostu bakterii patogennych. Były to szczepy o numerach: 124B (PL8), 113B, 65A, 75B oraz 9B.

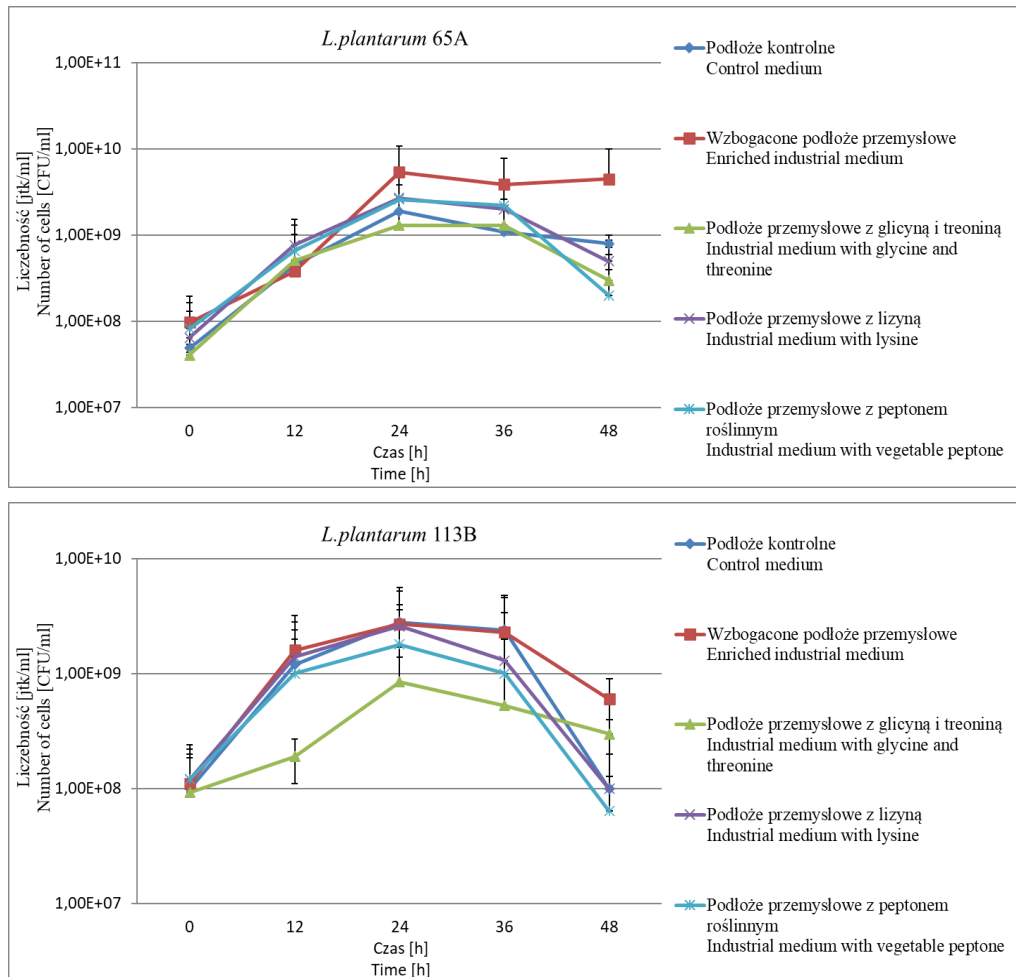
Z dwudziestu szczepów LAB wyselekcjonowano pięć (65A, 124B (PL8), 75B, 113B, 9B) charakteryzujących się: najwyższą opornością na kwas solny i sole żółci, najwyższą adherencją do tkanki nabłonkowej jelita oraz najwyższą aktywnością antybakteryjną.

Następnie sprawdzano przeżywalność wybranych szczepów bakterii w warunkach technologicznych produkcji drażetek czekoladowych (Wykres 1-5).

Porównanie wyników badań dotyczących przeżywalności szczepów bakterii probiotycznych w podłożach różniących się od siebie składem pozwoliło zauważyć, że drobnoustroje wykazywały najlepszą przeżywalność w wzbogaconym podłożu przemysłowym w stosunku do innych badanych wariantów. Podłoże to zostało zatem wybrane do dalszych testów, których celem było uzyskanie kultur starterowych.







Wykres 1-5. Przeżywalność szczepów w warunkach technologicznych produkcji draży czekoladowych (temperatura 45 °C, wilgotność do 100 %, pH: 5,1, warunki tlenowe)

Graph 1-5. Survival of probiotic bacterial strains in technological conditions during the production of chocolate dragées (temperature 45°C, humidity up to 100%, pH: 5.1, aerobic conditions)

Objaśnienia / Explanatory notes:

Na wykresach przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Graphs show mean values ± standard deviation

W kolejnym kroku opracowano trzy warianty kultur starterowych szczepów probiotycznych: liofilizat, susz oraz płynną szczepionkę, w której bakterie były mikrokap-sułkowane tłuszczem. Liczebność bakterii w każdej z wyżej wymienionych przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Liczebność bakterii probiotycznych w kulturach starterowych przeznaczonych do aplikacji do drażetek czekoladowych

Table 9. Number of probiotic bacteria in starter cultures intended for application to chocolate dragées

Szczep probiotyczny / Probiotic strain	Kultura starterowa / Starter cultures	Liczebność bakterii [log jtk/cm <sup>3</sup> lub g] / Number of bacterial cells [log CFU/ cm <sup>3</sup> or g]
<i>L.plantarum</i> 65B	Szczepionka płynna / Liquid graft	10,54 ± 1,50
	Liofilizat / Lyophilisate	11,00 ± 2,00
	Susz / Dried	10,00 ± 0,20
<i>L.plantarum</i> 124B (PL8)	Szczepionka płynna / Liquid graft	10,48 ± 1,11
	Liofilizat / Lyophilisate	11,30 ± 1,00
	Susz / Dried	10,70 ± 1,25
<i>L.plantarum</i> 75B	Szczepionka płynna / Liquid graft	10,40 ± 1,00
	Liofilizat / Lyophilisate	11,18 ± 0,71
	Susz / Dried	10,54 ± 2,4
<i>L.plantarum</i> 113B	Szczepionka płynna / Liquid graft	10,48 ± 0,27
	Liofilizat / Lyophilisate	11,00 ± 0,34
	Susz / Dried	10,70 ± 1,36
<i>L.plantarum</i> 9B	Szczepionka płynna / Liquid graft	10,30 ± 1,00
	Liofilizat / Lyophilisate	11,30 ± 0,27
	Susz / Dried	10,30 ± 0,87

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / The table shows mean values ± standard deviation

Na podstawie wyników badań stwierdzono, że wszystkie warianty kultur starterowych pozwoliły osiągnąć oczekiwaną liczebność bakterii probiotycznych w wyrobie czekoladowym, która oscylowała między  $10^{10} \div 10^{11}$  jtk w 1 cm<sup>3</sup>/1 g. Najwyższą ży-

wotność osiągnięto dla szczepu *L.plantarum* 124B (PL8), który został wybrany do aplikacji do drażetek czekoladowych.

Kolejnym ważnym aspektem wyboru rodzaju kultury starterowej była ocena organoleptyczna czekolady z dodatkiem szczepów probiotycznych w postaci liofilizatu, suszu oraz płynnej szczepionki. W Tabeli 10 przedstawiono wyniki badań oceny organoleptycznej gotowej czekolady w skali 5-stopniowej, gdzie 5 oznaczało produkt bardzo dobry, natomiast 1 – produkt zły, całkowicie zmieniony (Tabela 2).

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że najlepszą metodą aplikacji wyselekcjonowanych szczepów probiotycznych jest płynna szczepionka na bazie tłuszczu kakaowego, w której szczepy probiotyczne są mikrokapsułkowane. Taka forma kultury starterowej pozwoliła na osiągnięcie oczekiwanej liczebności bakterii probiotycznych (jtk) w 1 ml ( $10^{10} \div 10^{11}$ ). Dodatkowo czekolada do której dodano szczepionkę płynną, w skali oceny organoleptycznej według Tabeli 2, była idealna i typowa, natomiast zastosowanie liofilizatu bądź suszu powodowało niekorzystną zmianę konsystencji oraz smaku (proszek był wyczuwalny w czekoladzie).

Wyselekcjonowany szczep probiotyczny *L.plantarum* 124B (PL8) w formie płynnej szczepionki zaaplikowano do produktu w następujący sposób: wyłącznie do otoczki drażetek, wyłącznie do rdzenia drażetek oraz zarówno do otoczki, jak i do rdzenia drażetek (Tabela 11, Rycina 5).

Zbadano 3 warianty aplikacji szczepu probiotycznego do produktu: wyłącznie do otoczki drażetek, wyłącznie do rdzenia oraz aplikacja do otoczki i do rdzenia drażetek. Tabela 11 oraz Rycina 3.

Wykazano, że aplikacja szczepu bakterii *L.plantarum* 124B (PL8) wyłącznie do rdzenia lub do otoczki i rdzenia drażetek czekoladowych pozwala na spełnienie kryterium liczebności bakterii w żywności probiotycznej zalecanej przed WHO/FAO ( $10^6$  jtk w 1 gramie produktu). Aplikacja probiotyków wyłącznie do otoczki skutkuje brakiem wzrostu bakterii probiotycznych, co prawdopodobnie spowodowane jest zbyt wysoką temperaturą podczas procesu otoczkowania drażetek.

W kolejnym kroku dokonano wyboru odpowiedniego prebiotyku do produkcji drażetek czekoladowych ze szczepem probiotycznym *L.plantarum* 124B (PL8). W Tabeli 12 przedstawiono wyniki żywotności bakterii w trakcie inkubacji z czekoladą zawierającą różne kombinacje prebiotyków i cukrów.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że żywotność szczepu probiotycznego *L.plantarum* 124B (PL8) najdłużej utrzymywana jest po zastosowaniu prebiotyku w postaci glukooligosacharydu (37 %) lub inuliny (13,5 %).

Tabela 10. Wyniki oceny organoleptycznej czekolady z dodatkiem szczepów probiotycznych w postaci liofilizatu, suszu oraz płynnej szczepionki z uwzględnieniem współczynników ważkości

Table 10. Organoleptic evaluation of chocolate with the addition of probiotic strains in the form of lyophilisate, dried and liquid starter cultures taking into account the weighting factors

Cecha / Characteristic	Szczep bakterii / Bacteria strain														
	65B			124B (PL8)			75B			113B			9B		
	Szczepionka / Liquid starter culture	Liofilizat / Lyophilisate	Susz / Dried	Szczepionka / Liquid starter culture	Liofilizat / Lyophilisate	Susz / Dried	Szczepionka / Liquid starter culture	Liofilizat / Lyophilisate	Susz / Dried	Szczepionka / Liquid starter culture	Liofilizat / Lyophilisate	Susz / Dried	Szczepionka / Liquid starter culture	Liofilizat / Lyophilisate	Susz / Dried
Barwa / Color	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Zapach / Odor	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Konsystencja / Consistency	1	0,6	0,6	1	0,6	0,6	1	0,6	0,6	1	0,6	0,6	1	0,6	0,6
Smak / Taste	1	0,8	0,8	1	0,8	0,8	1	0,8	0,8	1	0,8	0,8	1	0,8	0,8

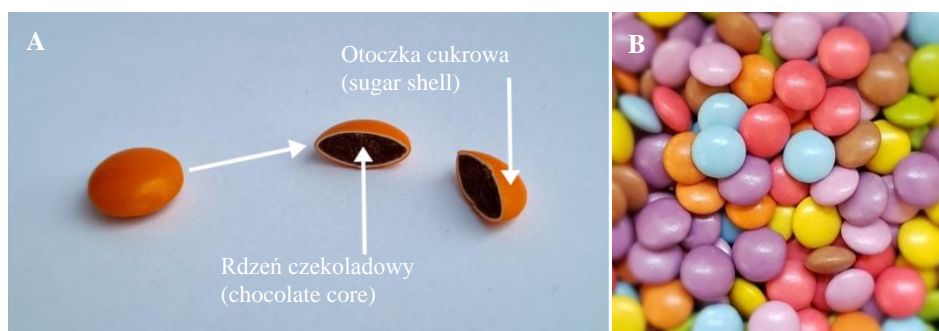


Tabela 11. Wyniki badań żywotności szczepu probiotycznego *Lactiplantibacillus plantarum* 124B (PL8) w drażkach czekoladowych  
 Table 11. Results of the viability study of the probiotic strain *Lactiplantibacillus plantarum* 124B (PL8) in chocolate dragées

Badany wariant / Examined variant	Liczebność bakterii <i>Lactobacillus plantarum</i> 124B (PL8) [jtk/g] / Number of <i>L.plantarum</i> 124B (PL8) cells [CFU/g]
Rdzeń bez bakterii probiotycznych + otoczka z bakteriami probiotycznymi / Core without probiotic bacteria + coating with probiotic bacteria	0
Rdzeń z bakteriami probiotycznymi + otoczka bez bakterii probiotycznych / Core with probiotic bacteria + coating without probiotic bacteria	$2,0 \times 10^7 \pm 0,7$
Rdzeń z bakteriami probiotycznymi + otoczka z bakteriami probiotycznymi / Core with probiotic bacteria + coating with probiotic bacteria	$1,2 \times 10^7 \pm 0,25$

Objaśnienia / Explanatory notes:

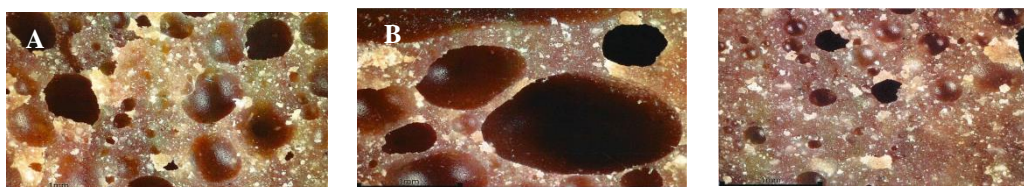
W tabeli przedstawiono wartości średnie  $\pm$  odchylenia standardowe / The table shows mean values  $\pm$  standard deviation



Ryc. 3. A. Miejsca aplikacji szczepu probiotycznego do drażetek czekoladowych. B. Gotowe drażetki czekoladowe  
 Fig. 3. A. Places of application of the probiotic strain for chocolate dragées. B. Ready-made chocolate dragées

Opracowanie wyrobu czekoladowego o porowatym rdzeniu wymagało zweryfikowania procesu technologicznego pod kątem wyboru najlepszego miejsca dozowania gazu. Sprawdzono wpływ temperatury czekolady, temperatury urządzenia formującego rdzenie (walców) oraz temperatury w tunelu chłodniczym. Oceniono wpływ różnych rodzajów gazów takich jak: azot, dwutlenek węgla, podtlenek azotu na jakość pęcherzyków znajdujących się w czekoladzie oraz ich ilość (tj. gęstość nasypową rdzeni

czekoladowych). Oceniono wpływ ciśnienia podawania gazu nie tylko na zamknięcie jak największej ilości gazu, ale również na gładkość i równomierność powierzchni rdzenia. Zauważono bowiem, że powierzchnia rdzenia, zmienia się pod wpływem zastosowanego gazu - ma ona kluczowy wpływ na jakość finalnego produktu (finalny wygląd kolorowych drażetek). Wypracowano sposób postępowania pozwalający na utrzymanie jak największej ilości dozowanego gazu w masie czekoladowej poddawanej następnie formowaniu w rdzeniu czekoladowym. Następnie przy pomocy gazu obojętnego (azotu i dwutlenku węgla) poddano napowietrzaniu różne rodzaje czekolad (zawierające w swoim składzie kakao, miążgę kakaową i dodatek błonnika) i zweryfikowano jakość oraz ilość napowietrzenia (Rycina 4 A-C).



Ryc. 4. Rozkład i wielkość pęcherzyków w rdzeniu czekoladowym przy zastosowaniu azotu (A), dwutlenku węgla (B) oraz podtlenku azotu (C).

Fig. 4. Distribution and size of bubbles in the chocolate core using nitrogen (A), carbon dioxide (B) and nitrous oxide (C).

Ważnym aspektem dla produktu zawierającego szczepy probiotyczne jest sposób jego przechowywania. Otrzymane w ramach badań drażetki czekoladowe z probiotykiem i prebiotykiem zapakowano do trzech rodzajów opakowań: standardowego opakowania, folii barierowej (pakowanie bez powietrza), folii barierowej (pakowanie w atmosferze azotu). Następnie przechowywano je w temperaturze 16 °C (temperatura magazynów do przechowywania u producenta). Przeprowadzone badania nie wykazały różnic pomiędzy zastosowanymi rodzajami opakowań gotowego produktu. We wszystkich testowanych wariantach, przez 9 miesięcy przechowywania drażetek czekoladowych w temperaturze 16 °C utrzymywana była odpowiednia dawka bakterii probiotycznych, zgodna z zaleceniami WHO/FAO (nie mniej niż  $1 \times 10^6$  jtk w 1 gramie produktu). Wyniki przedstawiono w Tabeli 13.

Czekolada stanowi doskonałą matrycę dla szczepów probiotycznych dzięki niskiej aktywności wody oraz znacznej zawartości tłuszczu i związków przeciwutleniających.

Tabela 12. Wyniki badań żywotności szczepu *L.plantarum* 124B (PL8) w czekoladzie z dodatkiem różnych wariantów prebiotyków i cukrów  
 Table 12. Results of viability studies of *Lactiplantibacillus plantarum* 124B (PL8) strain in chocolate with the addition of various variants of prebiotics and sugars

Szczep probiotyczny / Probiotic strain	Badany wariant / Examined variant	Liczebność bakterii probiotycznych [log jtk/g] / Count of probiotic bacteria [log CFU/g]						
		0h	12h	24h	48h	72h	144h	192h
<i>L.plantarum</i> 124B (PL8)	Kontrola hodowli (podłoże hodowlane MRS Broth) / Breeding control (breeding medium MRS Broth)	7,54 ± 0,35	7,26 ± 0,23	7,45 ± 0,31	3,59 ± 0,40	< 2	< 1	< 1
	Oligofruktoza (13,5%)/fruktoza / Oligofructose (13,5%)/fructose	7,54 ± 0,35	6,30 ± 0,75	6,30 ± 0,15	5,63 ± 0,49	5,23 ± 0,25	< 1	< 1
	Inulina (13,5%)/cukier / Inulin (13,5%)/sugar	7,54 ± 0,35	7,62 ± 0,40	6,95 ± 1,00	5,90 ± 0,21	5,28 ± 0,45	4,11 ± 0,15	2,30 ± 1,01
	Inulina (13,5%)/fruktoza / Inulin (13,5%)/fructose	7,54 ± 0,35	6,60 ± 0,83	5,52 ± 0,25	5,56 ± 0,35	4,00 ± 0,15	< 1	< 1
	Oligofruktoza (13,5%)/cukier / Oligofructose (13,5%)/sugar	7,54 ± 0,35	7,77 ± 0,30	7,41 ± 0,31	5,79 ± 0,32	5,00 ± 0,16	3,00 ± 0,32	< 1
	Glukooligosacharyd (37%)/miód w proszku / Glucooligosaccharide (37%)/honeypowder	7,54 ± 0,35	7,20 ± 0,42	7,40 ± 0,25	6,08 ± 0,25	5,79 ± 0,35	3,00 ± 0,14	< 1
	Glukooligosacharyd (37%)/fruktoza / Glucooligosaccharide (37%)/fructose	7,54 ± 0,35	7,66 ± 0,35	7,18 ± 0,17	5,30 ± 0,76	5,53 ± 0,49	2,70 ± 0,20	1,48 ± 0,18

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / The table shows mean values ± standard deviation

Tabela 13. Liczba komórek bakterii szczepu *L.plantarum*124B (PL8) w trakcie przechowywania produktu gotowego (drażetki czekoladowej z probiotykiem w rdzeniu i glukoooligosacharydem)

Table 13. Counts of *L.plantarum* 124B (PL8) populations [log CFU/g] during storage of the final product (chocolate dragée with a probiotic in the core and glucoooligosaccharide)

Miesiąc / Month	Liczebność bakterii probiotycznych [log jtk/g] / Count of probiotic bacteria [log CFU/g]					
	Standardowe opakowanie / Standard packaging		Folia barierowa / Barrier foil		Próżniowe zamykanie / Vacuum packing	
	16°C	Temp. pokojowa / Room temperature	16 °C	Temp. pokojowa / Room temperature	16 °C	Temp. pokojowa / Room temperature
0	7,11 ± 0,25	7,11 ± 0,42	7,11 ± 0,35	7,26 ± 0,83	7,11 ± 0,35	7,08 ± 0,15
1	7,23 ± 0,44	7,18 ± 0,15	7,40 ± 0,16	7,30 ± 0,21	7,18 ± 0,42	7,08 ± 0,44
2	7,04 ± 0,83	7,00 ± 0,40	7,04 ± 0,15	6,92 ± 0,15	7,04 ± 0,16	6,81 ± 0,21
3	7,00 ± 0,15	6,72 ± 0,14	7,23 ± 0,83	6,73 ± 0,83	7,15 ± 0,21	6,72 ± 0,83
4	6,79 ± 0,42	6,34 ± 0,21	6,67 ± 0,17	6,11 ± 0,17	6,83 ± 0,17	6,34 ± 0,35
5	6,71 ± 0,21	5,45 ± 0,35	6,40 ± 0,21	5,00 ± 0,42	6,32 ± 0,83	5,61 ± 0,42
6	6,61 ± 0,35	4,63 ± 0,35	6,52 ± 0,14	3,00 ± 0,40	6,66 ± 0,42	4,79 ± 0,14
7	6,53 ± 0,83	3,23 ± 0,17	6,08 ± 0,76	< 2	6,60 ± 0,21	3,30 ± 0,17
8	6,43 ± 0,16	2,48 ± 0,21	6,11 ± 0,42	< 2	6,52 ± 0,17	3,72 ± 0,21
9	6,34 ± 0,15	2,30 ± 0,42	6,11 ± 0,83	< 2	6,45 ± 0,16	2,70 ± 0,42

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / The table shows mean values ± standard deviation

W literaturze znane są opisy nowatorskich połączeń probiotyków i prebiotyków z czekoladą [26]. Wykorzystuje się w nich szczepy bakterii pochodzenia zwierzęcego, roślinnego bądź środowiskowego, wyizolowane w innych krajach niż Polska [16]. Opracowane w ramach projektu drażetki czekoladowe wyróżniają się tym, że zawierają opatentowany szczep *Lactiplantibacillus plantarum* 124B (PL8) wyizolowany z mikrobiomu zdrowej osoby z polskiej populacji. Taki szczep posiada wyższe powinowactwo do receptorów ludzkich niż szczepy pochodzenia roślinnego, zwierzęcego czy środowiskowego.

W opublikowanych dotychczas badaniach jako nośnik bakterii probiotycznych stosowano liofilizat koncentratu komórkowego [26]. W niniejszej pracy wykorzystano po raz pierwszy płynną szczepionkę na bazie tłuszczu kakaowego, w której szczepy probiotyczne są mikrokapsułkowane. Takie rozwiązanie pozwala na uzyskanie produktu o lepszych cechach organoleptycznych, gdyż jak wykazały przeprowadzone w ramach projektu badania, liofilizat (proszek) jest wyczuwalny w gotowym produkcie i wpływa negatywnie na ocenę organoleptyczną. Zastosowane mikrokapsułkowane tłuszczem bakterii probiotycznych pozwoliło także na uzyskanie produktu gotowego o znacznie dłuższym terminie przydatności do spożycia niż wyroby opisywane w literaturze [20]. Liczebność bakterii na pożądanym poziomie, zalecanym przez WHO/FAO (tj. nie mniej niż  $10^6$  jtk/g), utrzymywana jest w drażetkach czekoladowych z probiotykami przez okres 9 miesięcy w temperaturze  $16^{\circ}\text{C}$ .

Na innowacyjność opracowanego produktu wpływa również fakt, że dotychczas bakterie probiotyczne były aplikowane wyłącznie do czekolady [14]. Po raz pierwszy wykorzystano zatem rdzeń drażetek czekoladowych jako miejsce dozowania probiotyków. W opracowanym wyrobie właściwości probiotyczne szczepów bakterii połączono ponadto z prebiotykiem oraz z czekoladą o obniżonej zawartości cukru, co pozwoliło na uzyskanie prozdrowotnego produktu o unikatowych cechach.

## Wnioski

Przeprowadzone w ramach projektu badania pozwoliły na opracowanie drażetek czekoladowych zawierających opatentowany szczep probiotyczny *Lactiplantibacillus plantarum* 124B (PL8) (zgłoszenie patentowe numer P.442281) wyróżniający się następującymi właściwościami:

1. Jako jeden z pierwszych szczepów pochodzenia ludzkiego, wyizolowanych w Polsce, posiada w pełni poznaną sekwencję genomową.
2. Wykazuje wysoki stopień adherencji do ludzkiej linii tkankowej nabłonka jelitowego (Caco-2), dzięki czemu może blokować adherencję bakterii i grzybów chorobotwórczych.
3. Wykazuje dużą oporność na niskie pH i działanie sztucznego soku żołądkowego, co świadczy o jego doskonałym przystosowaniu do niesprzyjających warunków

panujących w trakcie pasażu przez przewód pokarmowy oraz wskazuje na możliwości jego zastosowania w żywności bądź preparatach doustnych.

4. Posiada aktywność bakteriobójczą wobec patogennych bakterii: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter fetus*, *Streptococcus mutans*, a zatem może być wykorzystany do zapobiegania zakażeniom przewodu pokarmowego i próchnicy zębów oraz do przywrócenia równowagi zaburzonej mikrobioty jelitowej.
5. Wykazuje wysoką przeżywalność w warunkach produkcyjnych (m.in. podwyższonej temperaturze czy wilgotności), stąd może zostać wykorzystany jako probiotyczny składnik funkcjonalny do produkcji drażetek czekoladowych.

Uzyskane drażetki czekoladowe zawierają odpowiednią, zalecaną przez WHO/FAO liczebność szczepu probiotycznego *Lactiplantibacillus plantarum* 124B (PL8) (tj. nie mniej niż  $10^6$  jtk/g) w trakcie całego terminu przydatności do spożycia. Innowacyjna technologia wytwarzania wyrobów czekoladowych o porowatym rdzeniu została objęta ochroną patentową (numer zgłoszenia: P.443733), dzięki następującym rozwiązaniom:

1. Zastosowaniu technologii mikrokapsułkowania szczepów probiotycznych pochodzenia ludzkiego w nośniku tłuszczowym.
2. Utrzymaniu odpowiedniej żywotności szczepu probiotycznego w gotowym produkcie dzięki obniżeniu temperatury poszczególnych etapów procesu produkcji i aplikacji bakterii do rdzenia, którego powierzchnia została dodatkowo zabezpieczona otoczką cukrową, utrudniającą dostęp tlenu i wilgoci, negatywnie wpływających na przeżywalność probiotyków.
3. Wzbogaceniu gotowego produktu w prebiotyki (glukooligosacharyd), wspierający wzrost i namnażanie bakterii probiotycznych i sprawiający, że otrzymany produkt należy do kategorii synbiotyków.
4. Zastosowaniu korzystnego nagazowania draży czekoladowych oraz obniżeniu poziomu zawartego w nich cukru, co pozwoliło na uzyskanie produktu prozdrowotnego o pożądanym właściwościach organoleptycznych, w szczególności konsystencji i smaku.

*Badania przedstawione w niniejszej publikacji zostały zrealizowane i sfinansowane z projektu "Nowoczesne formy aplikacji substancji prozdrowotnych w postaci wyrobów czekoladowych o porowatym rdzeniu" Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Małopolskiego 2014-2020, Poddziałanie 1.2.1 "Projekty badawczo-rozwojowe przedsiębiorstw" przez Konsorcjum: Maspex-GMW Sp. z o.o. oraz Prolab Sp. z o.o. Sp. Komandytowa.*

*Numer projektu: RPMP.01.02.01-12-0413/17.*

## Literatura

- [1] Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turck M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1966, 45(4), 493-496.
- [2] Binns N., Howlett J.: Functional food in Europe: International developments in science and health claims. Summary report of an international symposium held 9-11 May 2007, Portomaso, Malta. *Eur. J. Nutr.*, 2009, 48, 3-13.
- [3] Błaszczak A., Grześkiewicz W.: Żywność funkcjonalna – szansa czy zagrożenie dla zdrowia? *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 2014, 20(2), 214-221.
- [4] Bojanowska A.: Badania komunikacji marketingowej na polskim rynku żywności. Wyd. Politechnika Lubelska, Lublin 2022, ss. 75-89.
- [5] Brolazo EM., Leite DS., Tiba MR., Villarroel M., Marconi C., Simoes JA.: Correlation between api 50 ch and multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in isolates. *Braz. J. Microbiol.*, 2011, 42(1), 225-32.
- [6] Chmielewska M., Tys J., Petkowicz J., Petkowicz B.: Żywność po pierwsze nie szkodzić. *Acta Agrophys.*, 2018, 25(1), 22-25.
- [7] Contor L.: Functional food science in Europe. *Nutr., Metab. Cardiovas. Dis.*, 2001, 11(14), 20-33.
- [8] Da Silva T.F., Casarotti S.N., de Oliveira G.L.V., Penna A.L.B.: The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics on the biochemical, clinical, and immunological markers, as well as on the gut-microbiota of obese hosts. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2021, 61, 337-355.
- [9] Dashkevich M.P., Feighner S.D.: Development of a differential medium for bile salt hydrolase activity *Lactobacillus spp.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55(1), 1-16.
- [10] Douglas L.C., Sanders M.E.: Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *J. Am. Diet. Assoc.*, 2008, 108, 510-521.
- [11] Gueimonde M., Sánchez B., de los Reyes-Gavilán C.G., Margolles A.: Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.*, 2013, 4, 1-6.
- [12] Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. [on line]. EFSA J. Dostęp w internecie [24.05.2023]: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5206>
- [13] Guidelines for the Evaluation Of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. [on-line]. FAO/WHO. Dostęp w internecie [24.05.2023]: <http://fanus.com.ar/posgrado/10-09-25/fao%20probiotics.pdf>.
- [14] Hossain M., Senaka Ranadheera C., Fang Z., et al.: Viability of *Lactobacillus delbrueckii* in chocolates during storage and *in-vitro* bioaccessibility of polyphenols and SCFAs. *Cur. Res. Food Sci.*, 2022, 5, 1266-1275.
- [15] Karwowska A., Bogacz A.: Żywność funkcjonalna w Polsce – dziś i jutro. *Przemysł Farmaceutyczny i Owocowo-Warzywny*, 2007, 12, 22.
- [16] Kobus-Cisowska J., Szymanowska D., Maciejewska P., et al.: Enriching novel dark chocolate with *Bacillus coagulans* as a way to provide beneficial nutrients. *Food Funct. J.*, 2019, 10(2), 997-1006.
- [17] Korbutowicz T.: Żywność funkcjonalna na rynku światowym. *Studia i Prace WNEiZ US.*, 2018, 53(2), 214-215.
- [18] Kubuński T.: Żywność funkcjonalna. *Życie Weterynaryjne*, 2010, 85(11), 932-935.
- [19] Michalska-Szymaszek M.: Wpływ kwaśnego odczynu na szczepy *Escherichia coli* O157 izolowane z wody powierzchniowej i materiału klinicznego. *Roczniki PZH.*, 2009, 60(3), 229-233.

- [20] Mirković M., Seratlić S., Kilcawley K., et al.: The Sensory Quality and Volatile Profile of Dark Chocolate Enriched with Encapsulated Probiotic *Lactobacillus plantarum* Bacteria. *Sensors*, 2018, 18(8), #2570.
- [21] Mojka K.: Probiotyki, prebiotyki i synbiotyki – charakterystyka i funkcje. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2014, 95(3), 541-549.
- [22] Olędzka R.: Nutraceutyki, żywność funkcjonalna – rola i bezpieczeństwo stosowania. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna.*, 2007, 40, 1-8.
- [23] Paliwoda A., Nowak A.: Czynniki warunkujące zdolności adhezyjne bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Postępy Mikrobiologii*, 2017, 56(2), 196-204.
- [24] Pascal G.: Safety impact-the risk/benefits of functional foods. *Eur. J. Nutr.*, 2009, 48, 33-59.
- [25] Rafter J., Bennett M., Caderni G.: Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007, 85(2), 488-496.
- [26] Pierazan, M., Camelo-Silva C., Ambrosi, A.: Probiotic and Synbiotic Chocolate. In: Gomes da Cruz, A., Silva, M., Colombo Pimentel.: *Probiotic Foods and Beverages. Methods and Protocols in Food Science.* Humana, New York, NY., 2023.
- [27] Rzepkowska A., Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D.: Przeżywalność szczepów *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności w warunkach modelowego przewodu pokarmowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2015, 3(100), 42-52.
- [28] Strus M.: Nowa metoda oceny antagonistycznego działania bakterii kwasu mlekowego (LAB), na wybrane, chorobotwórcze bakterie wskaźnikowe. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 1998, 50, 123-130.
- [29] Strus M., Kukla G., Rurańska-Smutnicka D.: Właściwości powierzchniowe bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. II Adherencja do lini komórkowych. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2001, 53, 253-8.
- [30] Śliżewska K., Nowak A., Barczyńska R., Libudzisz Z.: Prebiotyki – definicja, właściwości, i zastosowanie, w przemyśle. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2013, 1 (86), 5-20.
- [31] Tuomola E.M., Salminen S.J.: Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, 41, 45-51.
- [32] Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatosava T.: Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(1), 297-303.
- [33] Weiss C., Clark H.F.: Rapid inactivation of rotaviruses by exposure to acid buffer and acidic gastric juice. *J. Gen. Virol.*, 1985, 66, 2725-2730.

#### THE APPLICATION OF THE PROBIOTIC STRAIN *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* PL8 IN THE PRODUCTION OF CHOCOLATE PRODUCTS WITH A POROUS CORE

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

**Background.** A healthy lifestyle, which has been promoted in recent years, is manifested through increased demand for foodstuffs the biggest nutritional value and specific health-promoting features. For this reason, consumers often choose functional food, which, apart from the nutritional effect, has a beneficial effect on one or more functions of the body, proven by scientific research. The aim of the research was to develop an innovative chocolate product with a porous core enriched with functional ingredients. In order to select the probiotic strain best adapted to the production conditions of chocolate dragées, a detailed characterization of 20 bacteria from the genera *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus* and *Limosilactoba-*



*cillus* included in the study was carried out, i.e. phenotypic and genotypic identification, drug susceptibility testing, resistance analysis to bile salts and gastric juice, adherence to intestinal epithelial cells, testing of antibacterial activity. The strains were also subjected to quantitative analyses in terms of their survival under industrial conditions. The influence of increased temperature and humidity, low pH, the presence of oxygen, the addition of a prebiotic and the type of industrial medium on the growth of probiotic bacteria was studied. The method of producing a chocolate dragée composed of a chocolate core, aerated with gas, containing a probiotic strain a prebiotic, and sugar coating was also developed.

**Results and conclusions.** The conducted research allowed the selection of strain of *Lactiplantibacillus plantarum* PL8 and the development of a method of its application to chocolate dragées in the liquid microencapsulated form in the fat carrier of the graft. The obtained chocolate product, containing, apart from the probiotic, also a prebiotic (glucooligosaccharide), meets the requirements of WHO/FAO regarding the content of probiotic bacteria in food, i.e. the number of bacteria not less than  $10^6$  CFU/g throughout the shelf life. The developed chocolate dragées display unique health-promoting properties and attractive organoleptic qualities.

**Key words:** probiotics, prebiotics, functional food, *Lactiplantibacillus plantarum* PL8, chocolate products

