



ŻYWNOŚĆ

Nauka Technologia Jakość

FOOD

Science Technology Quality

Nr 3 (120)

Kraków 2019

Rok 26

Redaktor naczelny: prof. dr hab. Lesław Juszczyk; e-mail: rrjuszcz@cyf-kr.edu.pl; tel. 12 662-47-78
Zastępca redaktora naczelnego: dr hab. Mariusz Witczak; e-mail: rrwitcza@cyf-kr.edu.pl
Sekretarz redakcji (kontakt z autorami): mgr inż. Jadwiga Ślawska; e-mail: redakcja@pttz.org; tel. 12 662-48-30; 609-800-458

Redaktorzy tematyczni: prof. dr hab. Grażyna Jaworska (żywność pochodzenia roślinnego), prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska (mikrobiologia, bezpieczeństwo i higiena żywności), prof. dr hab. Krzysztof Krygier (technologia tłuszczów, żywność funkcjonalna), prof. dr hab. Irena Ozimek (zachowania konsumentów na rynku żywności), prof. dr hab. Edward Pospiech (nauka o mięsie), dr hab. Anna S. Tarczyńska (mleczarstwo, zarządzanie jakością)

Redaktor językowy (język polski): dr Anna Piechnik

Native speaker: Stanley Holt (Bolton, UK)

Redaktor statystyczny: dr hab. Mariusz Witczak

Stali współpracownicy: dr Grażyna Morkis (Kraków)

Rada Naukowa: prof. dr hab. Tadeusz Sikora (przewodniczący), prof. dr hab. Barbara Baraniak, prof. dr Henryk Daun (USA), prof. dr hab. Teresa Fortuna, prof. dr hab. Mariola Friedrich, prof. dr Józef Golian (Słowacja), prof. dr hab. Anna Gramza-Michałowska, prof. dr hab. Waldemar Gustaw, prof. dr Jerzy Jankun (USA), prof. dr hab. Henryk Jeleń, prof. dr Miroslava Kačániová (Słowacja), prof. dr hab. Agnieszka Kita, prof. dr Józef Korolczuk (Francja), prof. dr hab. Andrzej Lenart, prof. dr hab. Zdzisława Libudzisz, prof. dr hab. Katarzyna Majewska, prof. dr hab. Jan Oszmiański, prof. dr hab. Mariusz Piskula, prof. dr Jan Pokorný (Czechy), prof. dr Roman Przybylski (Kanada), prof. dr hab. Piotr Przybyłowski, prof. dr hab. Zdzisław E. Sikorski, dr Andrzej Sośnicki (USA), prof. dr hab. Krzysztof Surówka, prof. dr hab. Tadeusz Trziszka, prof. dr hab. Stanisław Tyszkiewicz, prof. dr hab. Dorota Witrowa-Rajchert, dr John Wojciak (Kanada).

WYDAWCA: POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOSTI WYDAWNICTWO NAUKOWE PTTŻ

W latach 1994-1999 wydawcą czasopisma był Oddział Małopolski PTTŻ

© Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2019
Printed in Poland

e-ISSN 2451-0777 ISSN 2451-0769

Czasopismo w postaci elektronicznej jest wersją główną (pierwotną)

ADRES REDAKCJI: 30-149 KRAKÓW, ul. Balicka 122

Projekt okładki: Jolanta Czarnecka

Zdjęcie na okładce: mikelaptev-Fotolia.com

SKŁAD I DRUK:



Wydawnictwo Naukowe „Akapit”, Kraków

Tel. 608 024 572

e-mail: wn@akapit.krakow.pl; www.akapit.krakow.pl

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość

Organ naukowy PTTŻ – kwartalnik

Nr 3 (120)

Kraków 2019

Rok 26

SPIS TREŚCI

Od Redakcji.....	3
BARBARA SIOŃEK, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA: Bezpieczeństwo stosowania probiotyków przez ludzi.....	5
WIOLETA CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, ANNA ZADERNOWSKA: Bakterie fermentacji mlekowej w tym szczepy probiotyczne jako rezerwuariusze genów oporności na antybiotyki.....	22
ELŻBIETA ROSIAK, DANUTA JAWORSKA: Właściwości probiotyczne i prebiotyczne miodów pszczelich w aspekcie ich jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego.....	36
ELŻBIETA ROSIAK, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, ANTONI GORYL, MAŁGORZATA JAŁOSIŃSKA, KATARZYNA KAJAK-SIEMASZKO, MONIKA TRZĄSKOWSKA, DOROTA ZIELIŃSKA, ILONA TWARDOWSKA, STEFAN RUTKOWSKI, MATEUSZ GEMBA: Szacowanie wzrostu i przeżywalności bakterii probiotycznych, psujących i patogennych w żywności z wykorzystaniem prognostycznej bazy danych (ProgBaz SGGW).....	49
ALEKSANDRA OŁDAK, DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA: Porównanie aktywności antagonistycznej wykazywanej przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z różnych rodzajów żywności tradycyjnej.....	60
LIDIA PIEKARSKA-RADZIK, ELŻBIETA KLEWICKA, JOANNA MILALA, ROBERT KLEWICKI, NATALIA ROSOŁ, BOŻENA MATYSIAK, MICHAŁ SÓJKA, JAROSŁAW MARKOWSKI: Wpływ polifenoli z wytlóków z pseudoowoców <i>Rosa rugosa</i> Thunb. na wzrost bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i>	73
SYLWIA ŚCIESZKA, ELŻBIETA KLEWICKA, DOROTA ŻYŻELEWICZ: Wpływ alg <i>Chlorella vulgaris</i> na przeżywalność bakterii <i>Lactobacillus brevis</i> w obecności wysokich stężeń chlorku sodu.....	88
MARCIN KRUK, TOMASZ WÓJCIK, MONIKA TRZĄSKOWSKA: Zastosowanie naparu herbacianego kombucha i kultury symbiotycznej SCOBY do produkcji fermentowanego napoju mlecznego.....	97
ALEKSANDRA SZYDŁOWSKA, DOROTA ZIELIŃSKA: Wpływ wybranych technologii mrożenia na liczbę bakterii <i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0900, aktywność przeciwtleniającą i cechy sensoryczne sorbetów na bazie fermentowanej pulpy dyniowej.....	109
BEATA ŁASZKIEWICZ, PIOTR SZYMAŃSKI, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA: Wpływ wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na przydatność technologiczną i jakość mikrobiologiczną mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie.....	122
ANNA OKOŃ, PIOTR SZYMAŃSKI, ZBIGNIEW J. DOLATOWSKI: Wpływ serwatki kwasowej na jakość fizykochemiczną i stabilność barwy fermentowanych kielbas ekologicznych.....	135
DOROTA ZIELIŃSKA, ALEKSANDRA SZYDŁOWSKA, ANNA ŁEPECKA, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA: Wpływ wybranych składników żywności na zachowanie żywotności bakterii <i>Lactobacillus</i> spp. w przewodzie pokarmowym – badania <i>in vitro</i>	148
ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS, ALICJA DŁUBAŁA, JUSTYNA MALEC: Wiązanie cholesterolu przez bakterie fermentacji mlekowej izolowane od dzieci.....	160
PAULINA MARKOWIAK-KOPEĆ, KATARZYNA ŚLIŻEWSKA: Przeżywalność mikroorganizmów probiotycznych w modelu <i>in vitro</i> układu pokarmowego drobiu.....	171
KATARZYNA NEFFE-SKOCIŃSKA, KATARZYNA DYBKA-STĘPIEŃ, HUBERT ANTOLAK: Izolacja i identyfikacja szczepów bakterii kwasu octowego o potencjalnych właściwościach prozdrowotnych.....	183
AGNIESZKA CHLEBICZ-WÓJCIK, KATARZYNA ŚLIŻEWSKA, ADRIANA NOWAK: Właściwości probiotyczne drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> LOCK 0119.....	196
GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym.....	210
DOROTA ŻYŻELEWICZ: XLIV Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN.....	215
Technolog Żywności.....	219

Zamieszczone artykuły są recenzowane

Czasopismo jest referowane przez: Chemical Abstracts Service, IFIS, Scopus, AGRO, BazEkon, Index Copernicus, CrossRef

FOOD. Science. Technology. Quality

The Scientific Organ of Polish Food Technologists' Society (PTTŻ) – quarterly

No 3 (120)

Kraków 2019

Vol. 26

CONTENTS

From the Editor.....	3
BARBARA SIONEK, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA: Safety in use of probiotics by humans	5
WIOLETA CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, ANNA ZADERNOWSKA: Lactic acid bacteria including probiotic strains as a reservoir of antibiotic resistance genes	22
ELŻBIETA ROSIAK, DANUTA JAWORSKA: Probiotic and prebiotic properties of bee honeys in terms of their quality and health safety	36
ELŻBIETA ROSIAK, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, ANTONI GORYL, MAŁGORZATA JAŁOSIŃSKA, KATARZYNA KAJAK-SIEMASZKO, MONIKA TRZĄSKOWSKA, DOROTA ZIELIŃSKA, ILONA TWARDOWSKA, STEFAN RUTKOWSKI, MATEUSZ GEMBA: Estimation of growth and survival of probiotic, spoilage and pathogenic bacteria in food using prognostic database (ProgBaz SGGW)	49
ALEKSANDRA OŁDAK, DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA: Comparison of antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from various types of traditional food	60
LIDIA PIEKARSKA-RADZIK, ELŻBIETA KLEWICKA, JOANNA MILALA, ROBERT KLEWICKI, NATALIA ROSÓŁ, BOŻENA MATYSIAK, MICHAŁ SÓJKA, JAROSŁAW MARKOWSKI: Impact of polyphenols from <i>Rosa rugosa</i> Thunb. pseudofruits pomace on growth of <i>Lactobacillus</i> bacteria.....	73
SYLWIA ŚCIESZKA, ELŻBIETA KLEWICKA, DOROTA ŻYŻELEWICZ: Effect of algae <i>Chlorella vulgaris</i> on survival of bacteria <i>Lactobacillus brevis</i> at high concentrations of sodium chloride.....	88
MARCIN KRUK, TOMASZ WÓJCIK, MONIKA TRZĄSKOWSKA: Application of kombucha tea brew and SCOBY symbiotic culture to produce fermented milk beverage.....	97
ALEKSANDRA SZYDŁOWSKA, DOROTA ZIELIŃSKA: Effect of selected freezing technologies on count of <i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0900, antioxidant activity and sensory characteristics of fermented pumpkin-based sorbets	109
BEATA ŁASZKIEWICZ, PIOTR SZYMAŃSKI, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA: Effect of selected lactic acid bacteria on physicochemical characteristics and microbiological quality of mechanically separated poultry meat.....	122
ANNA OKOŃ, PIOTR SZYMAŃSKI, ZBIGNIEW J. DOLATOWSKI: Effects of acid whey on physicochemical quality and colour stability of fermented organic sausage.....	135
DOROTA ZIELIŃSKA, ALEKSANDRA SZYDŁOWSKA, ANNA ŁEPECKA, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA: Effect of selected food ingredients on behaviour of <i>Lactobacillus bacteria</i> in gastro-intestinal tract – <i>in vitro</i> study	148
ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS, ALICJA DŁUBAŁA, JUSTYNA MALEC: Cholesterol binding by lactic acid bacteria isolated from children	160
PAULINA MARKOWIAK-KOPEĆ, KATARZYNA ŚLIŻEWSKA: Survivability of probiotic microorganisms in <i>in vitro</i> model of poultry digestive tract	171
KATARZYNA NEFFE-SKOCIŃSKA, KATARZYNA DYBKA-STĘPIEŃ, HUBERT ANTOLAK: Isolation and identification of acetic acid bacteria with potential prohealth properties	183
AGNIESZKA CHLEBICZ-WÓJCIK, KATARZYNA ŚLIŻEWSKA, ADRIANA NOWAK: Probiotic properties of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> LOCK 0119 yeast	196
GRAŻYNA MORKIS: Food problems in Polish and EU legislation	210
DOROTA ŻYŻELEWICZ: 44 th Scientific Symposium of the Committee on Food and Nutrition Sciences, Polish Academy of Sciences	215
The Food Technologist.....	219

Only reviewed papers are published

Covered by: Chemical Abstracts Service, IFIS, Scopus, AGRO, BazEkon, Index Copernicus, CrossRef

OD REDAKCJI

Szanowni Czytelnicy,

przekazujemy Państwu nr 3 (120) czasopisma Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, który w całości został poświęcony problematyce Krokusowego X Jubileuszowego Sympozjum Naukowego pt. "Probiotyki w żywności", które miało miejsce w Kirach k. Zakopanego w dniach 10 - 12 kwietnia 2019 roku.

Sympozjum zostało zorganizowane przez Zakład Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie oraz Zarząd Główny PTTŻ.

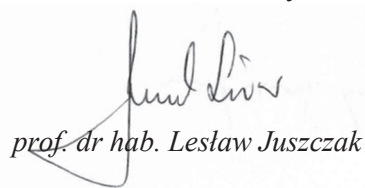
Zamieszczone artykuły są poszerzonymi opracowaniami materiałów, które były prezentowane w czasie konferencji. Polecamy je uwadze naszych Czytelników, mając nadzieję, że spełnią Państwa oczekiwania.

Zapraszamy również do lektury tzw. stałych działów, w których zamieściliśmy m.in. informacje o wybranych konferencjach współorganizowanych przez Polskie Towarzystwo Technologów Żywności.

Zapraszamy do odwiedzania naszej strony internetowej:
<http://wydawnictwo.pttz.org>

Kraków, wrzesień 2019 r.

Redaktor Naczelny



prof. dr hab. Lesław Juszcak

KOMUNIKAT

W latach 2019 – 2020 Wydawnictwo Naukowe PTTŻ realizuje zadanie z zakresu upowszechniania publikacji naukowych, które ukazały się na łamach czasopisma Żywność. Nauka. Technologia. Jakość:

„Digitalizacja publikacji naukowych wydanych w czasopiśmie Żywność. Nauka. Technologia. Jakość w latach 2019-2020 w celu zapewnienia otwartego dostępu do nich przez sieć Internet”.



**Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego**

Zadanie finansowane jest w ramach umowy nr 900/P-DUN/2019 ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego przeznaczonych na działalność upowszechniającą naukę.

BARBARA SIONEK, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA

BEZPIECZEŃSTWO STOSOWANIA PROBIOTYKÓW PRZEZ LUDZI

Streszczenie

Probiotyki są postrzegane przez konsumentów jako naturalne składniki żywności, których stosowanie przynosi korzyści zdrowotne. Liczne badania przeprowadzone w populacji ludzi zdrowych wskazują na dobrą tolerancję probiotyków. Zdarzenia niepożądane występują rzadko, są najczęściej łagodne i nie wymagają dodatkowych interwencji. W przypadku grup osób o zwiększonym ryzyku działań niepożądanych należy się liczyć z możliwością nawet ciężkich powikłań. W grupie najciężiej chorych probiotyki mogą przynieść największe korzyści, jednak decyzja o ich zastosowaniu powinna uwzględniać potencjalne zagrożenia powikłaniami. Mimo przeprowadzenia licznych badań oraz metaanaliz nie udało się niestety określić precyzyjnych wskazań i przeciwwskazań do stosowania probiotyków. Obecnie obowiązujące regulacje i przepisy dotyczące stosowania probiotyków nie są jednolite. W Ameryce Północnej kluczowe znaczenie ma zasada długiego, bezpiecznego dla zdrowia stosowania mikroorganizmu, tzw. status GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*). W Unii Europejskiej odpowiedzialny za regulacje, ocenę i monitorowanie bezpieczeństwa probiotyków jest Europejski Urząd Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Obowiązuje lista mikroorganizmów, które zostały uznane za bezpieczne i są dopuszczone do stosowania (ang. *Qualified Presumption of Safety* – QPS). Zarówno w Ameryce Północnej, jak i w Europie przepisy są restrykcyjne, a dopuszczenie mikroorganizmu wymaga przeprowadzenia licznych i drogich badań naukowych. W pracy oceniono bezpieczeństwo stosowania probiotyków w grupie ludzi zdrowych i o podwyższonym ryzyku wystąpienia działań niepożądanych oraz dokonano przeglądu dokumentów regulujących bezpieczne stosowanie mikroorganizmów probiotycznych.

Słowa kluczowe: probiotyki, korzyści zdrowotne, bezpieczeństwo, działania niepożądane, badania randomizowane, QPS

Wprowadzenie

Mikroorganizmy probiotyczne i potencjalnie probiotyczne coraz częściej stanowią składnik codziennej diety ludzi zdrowych. Celem ich stosowania jest przede wszystkim zapewnienie zdrowia i zapobiegania chorobom, szczególnie układu pokarmowego. Probiotyki znalazły zastosowanie w prewencji zachorowań i poprawianiu

Dr inż. B. Sionek, 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: barbara_sionek@sggw.pl

zdrowia grup ludzi przewlekle chorych oraz podatnych na wystąpienie różnych schorzeń, np. wcześniaków, noworodków, kobiet w ciąży, ludzi w podeszłym wieku. W związku z powszechnym zastosowaniem probiotyków ich bezpieczeństwo ma kluczowe znaczenie. Bazuje ono głównie na zasadzie udokumentowanej historii tradycyjnego, bezpiecznego stosowania [55]. Definicja opracowana w 2002 r. przez Organizację Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Światową Organizację Zdrowia (WHO) określa probiotyki jako mikroorganizmy, które podawane w odpowiednich dawkach wywierają korzystny wpływ na zdrowie [26]. Według de Simone [16] definicja probiotyków obejmuje zagadnienia związane ze stosowaniem probiotyków w diecie ludzi zdrowych, ale jest niewystarczająca, gdy probiotyki są zalecane w określonych stanach chorobowych. Do tej pory nie opracowano powszechnie akceptowanych rekomendacji stosowania probiotyków. W populacji ludzi zdrowych spożycie probiotyków ciągle wzrasta, co jest spowodowane najprawdopodobniej zainteresowaniem zdrowym trybem życia [53]. W grupie ludzi chorych obserwuje się częstsze stosowanie, wręcz nadużywanie, antybiotyków, które niekorzystnie wpływają na komensalną mikroflorę jelitową [68].

Bezpieczeństwo stosowania probiotyków w dużej mierze zależy od tego, kto je spożywa. Przez grupę zdrowych konsumentów są dobrze tolerowane, a występujące działania niepożądane mają łagodny przebieg i nie zagrażają życiu i zdrowiu. W przypadku grupy zwiększonego ryzyka działania niepożądane mogą sporadycznie mieć ciężki przebieg. Paradoksalnie, grupa najciężiej chorych może odnieść największe korzyści z zastosowania probiotyków, ale jest też najbardziej zagrożona działaniami niepożądanymi, w tym sepsą [3]. Zdaniem Marteau i wsp. [43] najlepsza sytuacja miałaby miejsce wtedy, gdyby bezpieczeństwo stosowania probiotyków i występowanie działań niepożądanych były porównywalne z efektem placebo [43].

Ocena bezpieczeństwa stosowania probiotyków jest zagadnieniem złożonym i powinna uwzględniać identyfikację wykorzystywanego drobnoustroju, sposób jego podawania, poziom narażenia, cel stosowania i stan zdrowia konsumenta. Podstawowymi narzędziami w ocenie bezpieczeństwa probiotyków są dobrze kontrolowane badania z udziałem ludzi, w których raportuje się działania niepożądane. Wyniki tych badań dostarczają cennych informacji, których efektem są długoterminowe działania następne, dotyczące wskazań w poszczególnych grupach konsumentów [56]. Bezpieczeństwo powinno być stale monitorowane, nawet pomimo powszechnego i długotrwałego stosowania danego szczepu mikroorganizmu probiotycznego. Niezależnie od wcześniej sprawdzonego profilu bezpieczeństwa należy uwzględniać możliwość zmian genetycznych szczepów probiotyków.

Celem większości badań obejmujących grupy zdrowych konsumentów jest głównie ocena korzyści wynikających ze stosowania probiotyków, natomiast w mniejszym zakresie są raportowane i oceniane zdarzenia niepożądane, a szczególnie poważne

zdarzenia niepożądane [8]. Na podstawie przeglądu literatury dotyczącej bezpieczeństwa stosowania probiotyków, opublikowanego w 2014 roku, Didari i wsp. stwierdzili, że przeważająca liczba istniejących dowodów wskazuje na to, że probiotyki są bezpieczne. Stwierdzenie to dotyczy populacji ogólnej zdrowych ludzi. Natomiast pacjenci ciężko chorzy, hospitalizowani, po operacjach oraz z obniżoną odpornością byli najbardziej zagrożeni wystąpieniem zdarzeń niepożądanych. Autorzy zalecają uwzględnienie stosunku ryzyka do korzyści przed zaleceniem stosowania probiotyków [19].

Lista działań niepożądanych wywołanych przez probiotyki jest ciągle rozszerzana, jednak nadal niereprezentatywna. Wynika to z braku wystandaryzowanych protokołów bezpieczeństwa i powszechnie uznawanych norm regulujących stosowanie probiotyków. Stanowi to również ograniczenie wyników metaanaliz oceniających bezpieczeństwo stosowania probiotyków i wskazuje na konieczność przeprowadzenia kolejnych badań [40].

Celem pracy była ocena bezpieczeństwa stosowania probiotyków w grupie ludzi zdrowych i o podwyższonym ryzyku wystąpienia działań niepożądanych.

Kategorie niepożądanych działań probiotyków w organizmie człowieka

Miejszem działania probiotyków jest przede wszystkim przewód pokarmowy. Jednym z podstawowych elementów układu pokarmowego, warunkującym utrzymanie zdrowia, jest bariera jelitowa utworzona z nabłonka jelitowego i warstwy śluzu. Składnikami bariery jelitowej są także: symbiotyczna mikroflora, komórki układu krwionośnego, chłonnego, immunologicznego i nerwowego. Bariera jelitowa spełnia funkcję zapory, która ochrania przed wnikaniem z przewodu pokarmowego do krwiobiegu patogenów, substancji toksycznych i czynników prozapalnych. U zdrowych ludzi bariera jelitowa pozostaje w równowadze. W przypadku np. ciężkich chorób, u podatnych pacjentów dochodzi do dysfunkcji i uszkodzenia bariery jelitowej. Efektem są stany zapalne i infekcje, które w skrajnych przypadkach mogą prowadzić do sepsy [56].

Zastosowanie probiotyków w większości powoduje dostarczenie do organizmu dużej liczby drobnoustrojów. Poza tym podawane są także martwe drobnoustroje i ich fragmenty, które również oddziałują na organizm, np. wywierają efekty immunologiczne, alergiczne. W obowiązującej definicji liczba mikroorganizmów określona jest jako adekwatna do osiągnięcia oczekiwanych korzyści prozdrowotnych, nie ma jednak regulacji dotyczących maksymalnej dawki. Używane preparaty można podzielić na zawierające jeden szczep i mieszaninę szczepów. Wobec powyższego profil bezpieczeństwa powinien uwzględniać każdy zastosowany szczep, liczbę żywych i ewentualnie martwych drobnoustrojów oraz produkt, do którego wprowadzono probiotyki [15].

Liczba żywych mikroorganizmów powinna wynosić co najmniej 10^6 jtk/g produktu [26].

Działania niepożądane związane ze stosowaniem probiotyków to najczęściej objawy z przewodu pokarmowego: biegunka, nudności, wzdęcia, bóle brzucha. Wyżej wymienione powikłania nie zawsze są wynikiem użycia probiotyków, mogą one być wywołane spożywaniem produktów żywnościowych zawierających je, np. w przypadku produktów mlecznych – nietolerancją laktozy [30, 47]. Z analizy Sniffena i wsp. [61] wynika, że w 80 % badań z probiotykami nie było doniesień o występowaniu poważnych zdarzeń niepożądanych. W niektórych badaniach łagodne i umiarkowane objawy ze strony przewodu pokarmowego, takie jak gazy czy wzdęcia związane ze stosowaniem probiotyków były raportowane, podczas gdy w innych badaniach nie było żadnych informacji dotyczących zdarzeń niepożądanych.

W dokumencie FAO/WHO z 2002 roku wyróżniono cztery kategorie działań niepożądanych związanych ze stosowaniem probiotyków: infekcje systemowe, niekorzystne efekty metaboliczne, nadmierną stymulację immunologiczną u wrażliwych oraz transmisję genów [26].

Poważne zdarzenia niepożądane, takie jak sepsa, zapalenie wsierdza (endocarditis) czy ropnie mogą być wywołane różnymi mikroorganizmami probiotycznymi, np. *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. jensenii*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Saccharomyces cerevisiae*. Występują one rzadko, głównie w grupach zwiększonego ryzyka, np. u ludzi z obniżoną odpornością (po przeszczepach narządów, otrzymujących leczenie immunosupresyjne, w chorobach z obniżeniem odporności, np. AIDS, białaczka, inne nowotwory, chemioterapia), ciężko i przewlekłe chorych, w tym wymagających centralnych cewników dożylnych i żywienia pozajelitowego, w przypadkach niedożywienia (kacheksji) z różnych przyczyn, u wcześniaków, noworodków i niemowląt w czasie rozwoju układu odpornościowego, u ludzi w wieku podeszłym i kobiet w ciąży [42]. U chorych o zleceniu i wyborze szczepu probiotycznego lub mieszaniny szczepów probiotycznych, dawce i czasie stosowania decyduje najczęściej lekarz. Lekarz powinien wnikliwie rozważyć zagrożenia i korzyści i ściśle monitorować stan chorego. Próbę usystematyzowania poważnych zdarzeń niepożądanych podjęli Kothari i wsp. [35].

Na podstawie przeglądu literatury, opublikowanych opisów przypadków (ang. *case reports*) i wyników badań sklasyfikowano działania niepożądane i wyszczególniono: infekcje systemowe, infekcje miejscowe, reakcje alergiczne, niekorzystne efekty metaboliczne, niedokrwienie jelit, transmisję oporności na antybiotyki (tab. 1).

Tabela 1. Wybrane poważne działania niepożądane mikroorganizmów probiotycznych

Table 1. Selected serious undesired effects of probiotics

Kategoria Category	Populacja – przypadki Population – cases	Mikroorganizm – powikłanie Microorganism – complications	Literatura Literature
Infekcje systemowe u dzieci Systemic infections in children	Dzieci – biegunka po antybiotykoterapii Children – antibiotic-associated diarrhoea	<i>Lactobacillus</i> GG – sepsa / sepsis	[38]
	Wcześnieńki / Premature infants	<i>Bifidobacterium</i> – bakteremia / bacteraemia	[10]
	6-dniowy noworodek – hipotrofia 6-day old newborn – hypertrophy	<i>E. coli</i> Nissle 1917 – sepsa / sepsis	[28]
	Niemowlęta – niska masa urodzeniowa Infants – low birth weight	<i>L. rhamnosus</i> GG – uogólniona infekcja / generalised infection	[54]
	10 lat – transplantacja szpiku 10 years old – hematopoietic stem cell transplantation	<i>B. longum</i> – bakteremia / bacteraemia	[71]
		<i>L. rhamnosus</i> Lcr35, <i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103 – bakteremia / bacteraemia	[59]
Infekcje systemowe u dorosłych Systemic infections in adults	24 lata – leczenie kardiochirurgiczne 24 years old – cardiac surgery treatment	<i>L. rhamnosus</i> – sepsa / sepsis	[34]
	30 lat – gorączka reumatyczna 30 years old – rheumatic fever	<i>L. plantarum</i> – infekcyjne zapalenie wsierdza / endocarditis	[60]
	47 lat – obniżona odporność 47 years old – decreased immunity	<i>L. jensenii</i> – infekcyjne zapalenie wsierdza / endocarditis	[27]
	48 lat – choroby serca, leczenie stomatologiczne / 48 years old – cardiac diseases, stomatological treatment	<i>L. acidophilus</i> – infekcyjne zapalenie wsierdza / endocarditis	[22]
	48 lat – cukrzyca i wielochorobowość 48 years old – diabetes and multiple morbidities	<i>S. cerevisiae</i> – fungemia, niewydolność wielonarządowa, wstrząs / fungemia, multiple organ disfunction syndrome, shock	[41]
	67 lat – zdrowy 67 years old – healthy	<i>L. rhamnosus</i> – infekcyjne zapalenie wsierdza / endocarditis	[42]
	69 lat – chłoniak 69 years old – lymphoma	<i>L. acidophilus</i> – sepsa / sepsis	[18]
	73 lata – chemioterapia 73 years old – chemotherapy	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> – fungemia / fungemia	[5]
	74 lata – rak prostaty z przerzutami 74 years old – prostate cancer with metastases	<i>Bifidobacterium</i> – bakteremia / bacteraemia	[67]
	Pacjenci w ciężkim stanie Severe medical state of patients	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> – fungemia / fungemia	[70]
	Hospitalizowani w ciężkim stanie Hospitalised in serious medical state	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. lactis</i> i <i>L. paracasei</i> – bakteremia / bacteraemia	[18]
	Wrzodziejące zapalenie jelita – leczenie sterydami / Ulcerative enteritis – steroid treatment	<i>L. rhamnosus</i> – bakteremia / bacteraemia	[44]

Infekcje miejscowe Localised infections	60 lat – po przeszczepie nerki 60 years old – kidney transplant patient	<i>L. casei</i> – ropień jamy brzusznej abscess in abdominal cavity	[69]
	65 lat – cukrzyca 65 years old – diabetes	<i>L. paracasei</i> – bakteremia, ropień wątroby / bacteraemia, liver abscess	[48]
Reakcje alergiczne Allergic reactions	Dzieci do 4 roku życia Children up to 4 years	<i>L. rhamnosus</i> GG – alergiczny nieżyt nosa, astma / allergic rhinitis, asthma	[33]
	6 - 12 miesięcy – 178 dzieci 6 - 12 months old – 178 children	<i>L. acidophilus</i> LAVRI-A1 – reakcje atopowe / atopic reactions	[65]
	Ciężarne i karmiące (do 2 lat) Pregnant women and breastfeeding mothers (up to 2 years)	<i>L. rhamnosus</i> GG – zapalenia oskrzeli, alergie / bronchitis, allergies	[36]

W związku z powszechnym i czasem niewłaściwym stosowaniem antybiotyków w medycynie, weterynarii oraz w produkcji roślin wzrasta istotne zagrożenie transmisją oporności na antybiotyki. Szczepy *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc* sp. wykazują oporność na wankomycynę, która może być przekazana przez bakterie chorobotwórcze: *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* [4, 17, 62]. W przypadku szczepów *Lactobacillus paracasei* wykazano oporność na wankomycynę i erytromycynę [14].

Innym zagadnieniem są niekorzystne efekty metaboliczne. Szczepy *Lactobacillus* sp. wykazują niepożądane efekty metaboliczne, wywołując zmiany aktywności hydrolazy soli żółciowych, które mogą wpływać na procesy wchłaniania w przewodzie pokarmowym. Ponadto produkcja kwasu mlekowego przez bakterie może u wrażliwych chorych, np. z zespołem krótkiego jelita, wywoływać kwasicę mleczanową. Niezaabsorbowane w jelicie węglowodany są dostępne dla bakterii, które produkują nadmierne ilości kwasu mlekowego. Działanie neurotoksyczne kwasu D-mlekowego powoduje komplikacje neurologiczne, takie jak zaburzenia zachowania, zaburzenia mowy, a w skrajnych przypadkach prowadzi do zaburzeń świadomości i śpiączki encefalopatycznej [9, 37, 45]. W przypadku *L. lactis* wykazano zdolność do produkcji amin biogennych, takich jak kadaweryna, putrescyna, wykazujących szkodliwe działanie na układ nerwowy i krwionośny [36, 49].

Nieliczne przypadki poważnych działań niepożądanych rzutują niestety na ogólną ocenę bezpieczeństwa stosowania probiotyków i stanowią jedną z potencjalnych przyczyn zaostreżenia i zmian uregulowań dotyczących rejestracji np. nowych mikroorganizmów probiotycznych.

Przegląd badań i metaanaliz dotyczących oceny bezpieczeństwa probiotyków

Badania randomizowane, obserwacyjne, metaanalizy oraz przypadki lub doniesienia kliniczne stanowią dostępne narzędzia do oceny bezpieczeństwa stosowania probiotyków. Największe znaczenie mają randomizowane, wielośrodkowe badania z podwójnie ślepą próbą, obejmujące adekwatne do analizy statystycznej liczbowo

grupy badane i odpowiednio długi okres obserwacji (ang. *follow-up*) w celu np. oceny występowania zdarzeń niepożądanych. Niestety przeprowadzenie takich badań wymaga wysokich nakładów finansowych. W ostatnich latach znacząco wzrosła liczba badań i publikacji oceniających zastosowanie probiotyków w populacji ludzi zdrowych i z grup podwyższonego ryzyka. W większości wnioski dotyczące korzyści i bezpieczeństwa probiotyków mają charakter ogólny, niejednoznaczny i czasem są sprzeczne z wynikami poprzednich badań [35]. Dodatkowo, różnice metodologiczne stanowią istotne ograniczenie utrudniające porównywanie wyników i przeprowadzanie metaanaliz. Na podstawie analizy kilku randomizowanych badań z probiotykami (*Lactobacillus rhamnosus* GR-1, *L. fermentum* RC-14, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12) stwierdzono w grupie zdrowych ludzi występowanie następujących zdarzeń niepożądanych: biegunka, nudności, wymioty, wzdęcia, dolegliwości bólowe w jamie brzusznej, zaburzenia w oddawaniu moczu, kandydoza, swędzenie [15, 23, 52, 58]. Są to powikłania niezwiązane z zagrożeniem życia i zdrowia i najczęściej nie wymagają dodatkowych interwencji.

Probiotyki są często stosowane w osłonie prowadzonej antybiotykoterapii. Evans i wsp. [25] ocenili efekty użycia probiotyków przez ludzi bez schorzeń przewlekłych, u których zalecono probiotyki z powodu biegunki związanej z antybiotykoterapią. Stwierdzono 139 przypadków działań niepożądanych, głównie objawów z przewodu pokarmowego. Autorzy ocenili ryzyko wystąpienia powikłań jako bardzo niskie [25].

Ogólne wnioski o korzyściach i bezpieczeństwie wynikają z metaanalizy 15 randomizowanych badań obejmujących 1793 pacjentów z zespołem jelita wrażliwego [19]. W grupie chorych z obniżoną odpornością w przebiegu choroby nowotworowej, zarażonych wirusem HIV czy po przeszczepach narządów metaanalizą badań z probiotykami wykazano takie korzyści, jak: zmniejszona częstość infekcji, skrócenie antybiotykoterapii, zmniejszenie częstości infekcji pooperacyjnych, skrócenie pobytu w szpitalu lub w OIT przy jednoczesnym braku działań niepożądanych. Wyrażono jedynie obawy o bezpieczeństwo stosowania probiotyków [12, 51, 57, 72].

W pracy Dorona i wsp. [20] obejmującej przegląd 24 badań odnoszących się do oceny bezpieczeństwa stosowania probiotyków w różnych zagrożonych populacjach takich, jak: dzieci, kobiety w ciąży, osoby w podeszłym wieku, pacjenci z zespołem jelita wrażliwego, upośledzoną odpornością, opisano tylko dwa przypadki zdarzeń niepożądanych, które były związane z użyciem probiotyków. U niemowląt urodzonych przed 37. tygodniem lub z masą urodzeniową poniżej 2500 g z martwiczym zapaleniem jelit (NEC – necrotizing enterocolitis), u których stosowano probiotyki, metaanaliza 24 randomizowanych badań umożliwiła wykazanie, że probiotyki są efektywne, bezpieczne i dobrze tolerowane [2]. W 2011 roku został wydany przez Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ) niezależny, ekspercki raport Safety of Probiotics to Reduce Risk and Prevent or Treat Disease, sponsorowany przez amerykańs-

kie agencje rządowe. Oceniono 11977 publikacji, z których wyselekcjonowano 622 badania. W 235 badaniach probiotyki uznano za dobrze tolerowane, w 387 badaniach stwierdzono wystąpienie działań niepożądanych. Nie wykazano statystycznie częstszego występowania działań niepożądanych po stosowaniu probiotyków. We wnioskach stwierdzono, że dostępne informacje są niewystarczające, aby odpowiedzieć na pytania dotyczące bezpieczeństwa stosowania probiotyków [30].

Kolejny duży przegląd opublikowali Bafeta i wsp. [8] w 2018 roku. Badacze przeanalizowali 384 randomizowane badania z probiotykami, prebiotykami i synbiotykami, które obejmowały zarówno populację ludzi zdrowych, jak i z różnymi schorzeniami. W 375 badaniach (98 %) nie określono definicji zdarzeń niepożądanych lub poważnych zdarzeń niepożądanych, nie podano również liczby uczestników wycofanych ze względu na wystąpienie powikłań. W 28 % ocenionych badań nie zgłoszono zdarzeń niepożądanych, a w 37 % badań nie było raportów dotyczących zagadnień bezpieczeństwa. Wymienieni autorzy wskazują, że priorytetem dla oceny bezpieczeństwa i korzyści wynikających ze stosowania probiotyków w różnych grupach konsumentów jest odpowiednia, najlepiej ujednolicona metodologia badań. Należy ściśle określić cele badawcze, dokonać precyzyjnego wyboru badanych szczepów mikroorganizmów probiotycznych oraz ujednolicić punkty końcowe, a także zasady raportowania działań niepożądanych i analizy wyników [64].

Obowiązujące przepisy prawne i stosowane rekomendacje

Brakuje jednolitego, akceptowanego powszechnie systemu regulującego bezpieczeństwo stosowania probiotyków. Według FAO/WHO mikroorganizmy stosowane bezpiecznie od lat w żywności uzyskały status organizmów bezpiecznych dla zdrowia ludzkiego (ang. *Generally Recognized as Safe*, GRAS). Wprowadzono zasady stopniowej oceny probiotyków:

1. Identyfikacja szczepu.
2. Badania *in vitro* w ocenie właściwości probiotycznych.
3. Badania *in vivo* z udziałem zwierząt i ludzi w celu określenia bezpieczeństwa stosowania i skuteczności.

Probiotyki są klasyfikowane jako żywność lub suplementy diety (w Stanach Zjednoczonych i w Europie), jako naturalne produkty zdrowotne (w Kanadzie) lub jako żywność do szczególnych zastosowań zdrowotnych (w Japonii). W większości krajów świata suplementy diety muszą spełniać znacznie mniej wymagające kryteria regulacyjne i jako takie nie są poddawane ścisłej kontroli i monitorowaniu, w przeciwieństwie do leków, które w zakresie bezpieczeństwa podlegają rygorystycznym regulacjom i monitorowaniu, zarówno przed dopuszczeniem do użytku, jak i po wprowadzeniu ich na rynek. W USA suplementy diety nie mogą również zawierać składników, które podlegają regulacjom dotyczącym nowych leków (*new drug or biologic*),

chyba, że były dopuszczone do stosowania przed wprowadzeniem wyżej wymienionych regulacji [66].

Celem stosowania probiotyków są szeroko pojęte efekty prozdrowotne, ale unika się określania, że probiotyki wykazują działanie lecznicze, gdyż implikacją takiego podejścia byłoby uznanie probiotyków za preparaty lecznicze lub leki (*Investigational New Drug*). Powoduje to konieczność wdrożenia restrykcyjnych regulacji, w tym przeprowadzenia bardzo drogiego randomizowanych badań klinicznych, co praktycznie wyklucza możliwość zastosowania probiotyków w żywności. Producenci preferują pozostawienie probiotyków w kategorii nie leków (*non-drug*) [70].

W 2006 roku Parlament Europejski opublikował Rozporządzenie dotyczące oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych związanych ze wszystkimi rodzajami żywności [24]. Agencją odpowiedzialną w Unii Europejskiej za regulacje, ocenę i monitorowanie bezpieczeństwa żywności, suplementów żywnościowych, a w związku z tym większości produktów probiotycznych, jest Europejski Urząd Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Obecnie w Europie podstawowym dokumentem dotyczącym bezpieczeństwa probiotyków jest lista Qualified Presumption of Safety (QPS) [21]. Kryteria wpisania mikroorganizmu na listę QPS (QPS-list) to: taksonomiczne określenie szczepu, adekwatna ilość informacji dla ustalenia bezpieczeństwa, brak właściwości patogennych oraz dobrze określony cel zastosowania [1]. Status QPS jest oceniany przez działający w ramach EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Od 2014 roku dwa razy w roku wykonywana jest ocena mikroorganizmów rekomendowanych do wpisania, a co trzy lata ocena mikroorganizmów wcześniej wpisanych na listę, tzn. ustalany jest status QPS. Brak mikroorganizmu na liście QPS nie oznacza, że jest on niebezpieczny dla zdrowia, nie wyklucza również możliwości stosowania produktów na terenie Unii Europejskiej (wystarczy zasada długiej historii stosowania i niewystępowania działań niepożądanych). Oznacza jedynie, że mikroorganizm nie został oceniony przez EFSA [1]. Dotychczas EFSA odrzuciła wszystkie przedłożone oświadczenia zdrowotne dotyczące probiotyków.

W Japonii zagadnienia dotyczące żywności prozdrowotnej są regulowane przez Ministerstwo Zdrowia, Pracy i Opieki Społecznej (Ministry of Health, Labour and Welfare). Zgodnie z wytycznymi ustawy wyróżniono trzy rodzaje żywności:

- żywność pełniąca funkcje odżywcze (ang. *Foods with Nutrient Function Claims* FNFC),
- żywność o zastosowaniach zdrowotnych (ang. *foods for specified health uses*, FOSHU) – wpływająca na fizjologiczne procesy w organizmie, która wymaga zaawizowania przez Ministra Agencji Spraw Konsumenckich,
- żywność do specjalnych zastosowań dietetycznych (ang. *foods for specified health uses*, FOSDU) – obejmuje żywność dla niemowląt, kobiet w ciąży, kobiet karmiących, starszych ludzi i żywność dla chorych.

Żywność do szczególnych zastosowań zdrowotnych (FOSHU) zawiera składniki funkcjonalne, które wpływają na procesy fizjologiczne i biologiczną aktywność organizmu. Celem jest osiągnięcie efektu prozdrowotnego. Jeżeli żywność ma być sprzedawana jako żywność do określonych zastosowań zdrowotnych, wymagane jest uzyskanie pozwolenia, a po wprowadzeniu na rynek instytucje rządowe sprawują kontrolę dotyczącą efektów prozdrowotnych i bezpieczeństwa. Proces zatwierdzania żywności FOSHU wymaga przeprowadzenia szczegółowych badań naukowych [29].

Doniesienia o zdarzeniach niepożądanych z udziałem probiotyków skłoniły rządy niektórych krajów do wprowadzenia szczegółowych regulacji. Na przykład w 2009 roku w Norwegii wprowadzono zalecenie niestosowania probiotyków u ciężko chorych pacjentów, w tym u osób z biegunką związaną z antybiotykami oraz w infekcji *Clostridium difficile* [46]. W 2013 roku grupa ekspertów belgijskich po szczegółowej analizie zagadnień związanych ze stosowaniem probiotyków wydała raport „8651 Probiotics”. Zalecono dokładną identyfikację szczepu probiotycznego, przeprowadzenie oceny bezpieczeństwa szczepów probiotycznych w żywności, jak również wprowadzono wymóg znakowania produktu zawierającego probiotyki [32].

Oprócz regulacji międzynarodowych i krajowych dotyczących probiotyków formułowane są opinie i wytyczne organizacji eksperckich, które stanowią cenne uzupełnienie praktycznych aspektów stosowania probiotyków. W 2006 roku eksperci Product Safety Forum of Europe (PROSAFE) opracowali rekomendacje w zakresie bezpieczeństwa stosowania probiotyków. Wytyczne zawierają m.in. zakaz stosowania szczepów potencjalnie probiotycznych, które nie występują naturalnie (*wild-type*) jako dodatki do żywności dla ludzi i zwierząt oraz zakaz stosowania szczepów zawierających geny o znanej i/lub potwierdzonej wirulencji. Jako wiarygodne narzędzie badania probiotyków do oceny bezpieczeństwa i wykrycia występowania cech patogennych rekomendowane są badania probiotyków *in vivo* na modelach zwierzęcych oraz randomizowane badania kolonizacji u ludzi, z użyciem placebo w podwójnie ślepej próbie [50]. W 2013 roku Międzynarodowe Naukowe Stowarzyszenie Probiotyków i Prebiotyków (The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP) zorganizowało spotkanie ekspertów klinicznych i naukowców z różnych dziedzin (m.in. gastroenterologów, pediatrów, lekarzy medycyny rodzinnej, mikrobiologów, genetyków, immunologów, ekspertów z zakresu nauk o żywności) w celu ponownego zbadania koncepcji zastosowania probiotyków i prebiotyków. Stwierdzono, że urzędy i agencje do oceny żywności probiotycznej i suplementów diety stosują systemy pierwotnie zaprojektowane do oceny leków. Eksperci ISAPP wyrazili brak akceptacji dla stosowania kryteriów przeznaczonych do rejestracji leków w USA i w Europie w przypadku żywności probiotycznej i większości suplementów diety. W opinii ekspertów te niepotrzebne, biurokratyczne wymagania powodują znaczący wzrost kosztów związa-

nych z koniecznością wprowadzenia do produkcji żywności standardów farmaceutycznych [31].

Ważne opinie i rekomendacje ekspertów medycznych dotyczące bezpieczeństwa i klinicznych zastosowań probiotyków u dzieci są opracowywane i publikowane przez Grupę Roboczą do Spraw Pro- i Prebiotyków (Working Group for Pro- and Prebiotics) Europejskiego Towarzystwa Pediatrycznego Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN)) [11]. W związku ze stwierdzanymi rozbieżnościami i niepełnymi informacjami producenta o deklarowanych w produkcie szczepach probiotycznych, takimi jak: zła identyfikacja i klasyfikacja szczepów, zanieczyszczenia innymi szczepami, brak oceny liczby kolonii i żywotności szczepów, oczekiwane efekty prozdrowotne mogą być znacznie ograniczone lub nieobecne. Ponadto, zanieczyszczenie produktu probiotycznego innymi mikroorganizmami stanowi potencjalne zagrożenie wystąpieniem nieoczekiwanych powikłań. W 2017 roku Grupa Robocza wyraziła opinię o konieczności opracowania i wdrożenia mechanizmów kontroli w zakresie dostępnych na rynku produktów zawierających probiotyki. Zalecono również, aby zdarzenia niepożądane spowodowane probiotykami były raportowane i rejestrowane przez odpowiednie instytucje [13].

Gdy uświadomiono sobie, że efekty prozdrowotne probiotyków utrudniają kwalifikowanie ich jako składników żywności i podlegają one regulacjom dotyczącym leków, pojawiła się nowa koncepcja podziału probiotyków: na nutribiotyki i farmakobiotyki. Nutribiotyki są definiowane jako składniki żywności lub żywność, która odgrywa korzystną rolę w modyfikowaniu i utrzymaniu fizjologicznych funkcji organizmu, zapewniając tym samym utrzymanie zdrowia [6]. Zgodnie z zaproponowaną kategoryzacją nutribiotyki obejmują mikroorganizmy probiotyczne lub produkty zawierające probiotyki i podlegają regulacjom i wymogom dotyczącym bezpieczeństwa żywności. Stosowanie nutribiotyków może być traktowane jako naturalna metoda terapeutyczna, która poprzez oddziaływanie na mikroflorę jelitową może korzystnie wpływać na zdrowie [39]. W roku 2002 Colin Hill po raz pierwszy użył terminu farmakobiotyk. Potwierdzeniem koncepcji farmakobiotyków są wyniki badań myszy zakażonych bakteriami *Listeria*, opublikowane przez Hilla i wsp. w 2011 roku. W badaniach zastosowano szczep komensalnych bakterii *L. salivarius* UCC118, które wytwarzały bakteriocynę zabójczą dla *Listerii* [31]. Zgodnie z proponowanym założeniem farmakobiotyk jest stosowany jako lek w celu zapobiegania chorobom lub leczenia ich. Zarówno nutribiotyki, jak i farmakobiotyki mogą korzystnie wpływać na procesy fizjologiczne i być przydatne w zapobieganiu i leczeniu chorób [39, 63].

Podsumowanie

Wybór właściwego probiotyku, tj. bezpiecznego i skutecznego jest trudnym wyzwaniem, które wymaga rozważenia wielu czynników. Należy określić szczep lub mieszaninę szczepów probiotycznych o odpowiedniej jakości i stabilności, precyzyjnie określić cel zastosowania. Na podstawie dostępnej wiedzy i oczekiwanych korzyści trzeba wybrać grupę zdrowych konsumentów lub ludzi chorych z uwzględnieniem rodzaju schorzenia i stopnia zagrożenia zdarzeniami niepożądanymi. Zgodnie z definicją dawka mikroorganizmów probiotycznych powinna być adekwatna, co jednak nie jest sprecyzowane, gdyż żadna dawka nie została podana w wytycznych i rekomendacjach. Nie określono również czasu ich stosowania [7]. Probiotyki są dostępne w szerokiej gamie żywności i preparatów, jak: jogurty, napoje fermentowane, proszki, saszetki lub liofilizowane kapsułki i tabletki. Z uwagi na brak odpowiednich i spójnych regulacji, jakość oferowanych na rynku produktów może być różna. W kilku badaniach wykazano rozbieżności dotyczące informacji na etykiecie produktu w porównaniu do niezależnej analizy składników. Stwierdzono niższą od deklarowanych przez producenta liczbę drobnoustrojów. W niektórych przypadkach nie wykryto szczepu opisanego w informacji o produkcie lub znaleziono zanieczyszczenia innymi szczepami [61].

Stosowanie probiotyków nie niesie zwiększonego ryzyka wystąpienia działań niepożądanych u ludzi zdrowych. W grupie konsumentów o zwiększonym ryzyku wystąpienia działań niepożądanych decyzja o podawaniu probiotyków powinna uwzględniać ocenę korzyści i zagrożeń. Ocena bezpieczeństwa stosowania probiotyków powinna odnosić się do konkretnego szczepu. Przegląd dostępnych badań wskazuje na korzystny wpływ probiotyków na zdrowie, jednak niezbędne są dalsze badania i uregulowania prawne w celu rozszerzenia możliwości wprowadzania nowych produktów probiotycznych, przeznaczonych dla największej grupy – zdrowych konsumentów.

Literatura

- [1] Allende A., Bolton D., Chemaly M., Davies R., Escámez P.S.F., Girones R., Herman L., Koutsoumanis K., Lindqvist R., Nørrung B., Ricci A., Robertson L., Ru G., Sanaa M., Simmons M., Skandamis P., Snary E., Speybroeck N., Ter Kuile B., Threlfall J., Wahlström H.: Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016. *EFSA J.*, 2017, 15(3), #4663. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4663.
- [2] Alfaleh K., Anabrees J.: Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evid. Based Child Heal.*, 2014, 9 (3), 584-671.
- [3] Allen S.J., Jordan S., Storey M., Thornton C.A., Gravenor M., Garaiova I., Plummer S.F., Wang D., Morgan G.: Dietary supplementation with lactobacilli and bifidobacteria is well tolerated and not associated with adverse events during pregnancy and early infancy. *J. Nutr.*, 2010, 140 (3), 483-488.
- [4] Ammor M.S., Flórez A.B., Mayo B.: Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.*, 2007, 24 (6), 559-570.

- [5] Appel-da-Silva M.C., Narvaez G.A., Perez L.R.R., Drehmer L., Lewgoy J.: *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fungemia following probiotic treatment. *Med. Mycol. Case Rep.*, 2017, 18, 15-17.
- [6] Arora M., Baldi A.: Regulatory categories of probiotics across the globe: A review representing existing and recommended categorization. *Indian J. Med. Microbiol.*, 2015, 33 (5), 2-10.
- [7] Aureli P., Capurso L., Castellazzi A.M., Clerici M., Giovannini M., Morelli L., Poli A., Pregliasco F., Salvini F., Zuccotti G.V.: Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacol. Res.*, 2011, 63 (5), 366-376.
- [8] Bafeta A., Koh M., Riveros C., Ravaud P.: Harms reporting in randomized controlled trials of interventions aimed at modifying micro biota. *Ann. Int. Med.*, 2018, 169 (4), 240-247.
- [9] Begley M., Hill C., Gahan C.G.M.: Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72 (3), 1729-1738.
- [10] Bertelli C., Pillonel T., Torregrossa A., Prod'hom G., Fischer C., Greub G., Giannoni E.: *Bifidobacterium longum* bacteremia in preterm infants receiving probiotics. *Clin. Infect. Dis.*, 2015, 60 (6), 924-927.
- [11] Braegger C., Chmielewska A., Decsi T., Kolacek S., Mihatsch W., Moreno L., Pieścik M., Puntis J., Shamir R., Szajewska H., Turck D., van Goudoever J.: Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: A systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2011, 52 (2), 238-250.
- [12] Carter G.M., Esmaeili A., Shah H., Indyk D., Johnson M., Andrae M., Sacks H.S.: Probiotics in human immunodeficiency virus infection: A systematic review and evidence synthesis of benefits and risks. *Open Forum Infect. Dis.*, 2016, 3(4), #ofw164. DOI: 10.1093/ofid/ofw164.
- [13] Kolacek S., Hojsak I., Canani R.B., Guarino A., Indrio F., Orel R., Pot B., Shamir R., Szajewska H., Vandenplas Y., van Goudoever J., Weizman Z., ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics: Commercial probiotic products: A call for improved quality control. A position paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2017, 65(1), 117-124.
- [14] Comunian R., Daga E., Dupré I., Paba A., Devirgiliis C., Piccioni V., Perozzi G., Zonenschain D., Rebecchi A., Morelli L., de Lorentiis A., Giraffa G.: Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, 138 (1-2), 151-156.
- [15] Czaja C.A., Stapleton A.E., Yarova-Yarovaya Y., Stamm W.E.: Phase I trial of a *Lactobacillus crispatus* vaginal suppository for prevention of recurrent urinary tract infection in women. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 2007, #35387. DOI: 10.1155/2007/35387.
- [16] De Simone C.: Unregulated probiotic market. *Clin. Gastroenterol. H.*, 2019, 17 (5), 809-817.
- [17] Devirgiliis C., Zinno P., Perozzi G.: Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus species*. *Front. Microbiol.*, 2013, 4, #301. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00301.
- [18] Di Cerbo A., Palmieri B., Aponte M., Morales-Medina J.C., Iannitti T.: Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *J. Clin. Pathol.*, 2016, 69 (3), 187-203.
- [19] Didari T., Solki S., Mozaffari S., Nikfar S., Abdollahi M.: A systematic review of the safety of probiotics. *Expert. Opin. Drug. Saf.*, 2014, 13 (2), 227-239.
- [20] Doron S., Snyderman D.R.: Risk and safety of probiotics. *Clin. Inf. Dis.*, 2015, 60, 129-134.
- [21] EFSA. [online]. Dostęp w Internecie [02.05.2019]: <http://www.EFSA.europa.eu/en/>.
- [22] Encarnacion C.O., Loranger A.M., Bhartkumar A.G., Almassi G.H.: Bacterial endocarditis caused by *Lactobacillus acidophilus* leading to rupture of sinus of valsalva aneurysm. *Tex. Heart Inst. J.*, 2016, 43 (2), 161-164.
- [23] Eskesen D., Jespersen L., Michelsen B., Whorwell P.J., Müller-Lissner S., Morberg C.M.: Effect of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, on defecation frequency in healthy

- subjects with low defecation frequency and abdominal discomfort: A randomised, double-blind, placebo-controlled, parallelgroup trial. *Br. J. Nutr.*, 2015, 114 (10), 1638-1646.
- [24] Rozporządzenie (WE) nr 1924/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 r. w sprawie oświadczeń żywieniowych i zdrowotnych dotyczących żywności. *Dz. U. L* 404, ss. 9-25, z 30.12.2006.
- [25] Evans M., Salewski R.P., Christman M.C., Girard S.-A., Tompkins T.A.: Effectiveness of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus rhamnosus* for the management of antibiotic-associated diarrhoea in healthy adults: A randomised, doubleblind, placebo-controlled trial. *Br. J. Nutr.*, 2016, 116 (1), 94-103.
- [26] FAO/WHO: Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. FAO/WHO, London, Canada, 2002.
- [27] Fradiani P.A., Petrucca A., Ascenzioni F., Di Nucci G., Teggi A., Bilancini S., Cipriani P.: Endocarditis caused by *Lactobacillus jensenii* in an immunocompetent patient. *J. Med. Microbiol.*, 2010, 59 (5), 607-609.
- [28] Guenther K., Straube E., Pfister W., Guenther A., Huebler A.: Sever sepsis after probiotic treatment with *Escherichia coli* NISSLE 1917. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2010, 29 (2), 188-189.
- [29] Shen R: Health food regulatory system in Japan. [online]. Dostęp w Internecie [03.05.2019]: <https://food.chemlinked.com/chempedia/health-food-regulatory-system-japan>
- [30] Hempel S., Newberry S., Ruelaz A., Wang Z., Miles J.N., Suttorp M.J., Johnsen B., Shanman R., Slusser W., Fu N., Smith A., Roth B., Polak J., Motala A., Perry T., Shekelle P.G.: Safety of Probiotics to Reduce Risk and Prevent or Treat Disease. [online]. Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ), 2011. Dostęp w Internecie: [02.05.2019] <https://www.ahrq.gov/downloads/pub/evidence/pdf/probiotics/probiotics.pdf>
- [31] Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C., Sanders M.E.: Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11 (8), 506-514.
- [32] Huys G., Botteldoorn N., Delvigne F., de Vuyst L., Heindrickx Pot B., Dubois J.J., Daube G.: Microbial characterization of probiotics – advisory report of the Working Group “8651 Probiotics” of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Mol. Nutr. Food Res.*, 2013, 57 (8), 1479-1504.
- [33] Kalliomäki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E.: Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2001, 357 (9262), 1076-1079.
- [34] Kochan P., Chmielarczyk A., Szymaniak L., Brykczynski M., Galant K., Zych A., Pakosz K., Giedrys-Kalamba S., Lenouvel E., Heczko P.B.: *Lactobacillus rhamnosus* administration causes sepsis in a cardiosurgical patient-is the time right to revise probiotic safety guidelines? *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011, 17 (10), 1589-1592.
- [35] Kothari D., Patel S., Kim S.K.: Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: a review. *Biomed. Pharmacother.*, 2019, 111, 537-547.
- [36] Kopp M.: Clinical potential for the use of probiotics in the management of respiratory conditions and cold- and influenza-like symptoms. *Nutr. Diet. Suppl.*, 2011, 3, 51-58.
- [37] Ku W.H., Lau D.C.I., Huen K.F.: Probiotics provoked D-lactic acidosis in short bowel syndrome: Case report and literature review. *HK J. Paediatr.*, 2006, 11, 246-254.
- [38] Land M.H., Rouster-Stevens K., Woods C.R., Cannon M.L., Cnota J., Shetty A.K.: *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*, 2005, 115 (1), 178-181.
- [39] Lee E.-S., Song E.-J., Nam Y.-D., Lee S.-Y.: Probiotics in human health and disease: From nutraceuticals to pharmabiotics. *J. Microbiol.*, 2018, 56 (11), 773-782.

- [40] Lerner A., Shoenfeld Y., Matthias T.: Probiotics: If it does not help it does not do any harm. Really? *Microorganisms*, 2019, 7 (4), #104. DOI: 10.3390/microorganisms7040104.
- [41] Lestin F., Pertschy A., Rimek D.: Fungemia after oral treatment with *Saccharomyces boulardii* in a patient with multiple comorbidities. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 2003, 128 (48), 2531-2533.
- [42] Mackay A.D., Taylor M.B., Kibbler C.C., Hamilton-Miller J.M.: *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin. Microbiol. Infect.*, 1999, 5 (5), 290-292.
- [43] Marteau P.: Safety aspects of probiotic products. *Scand. J. Nutr./Naringsforskning.*, 2001, 45 (1), 22-24.
- [44] Meini S., Laureano R., Fani L., Tascini C., Galano A., Antonelli A., Rossolini G.M.: Breakthrough *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in an adult patient with severe active ulcerative colitis: Case report and review of the literature. *Infection*, 2015, 43 (6), 777-781.
- [45] Munakata S., Arakawa C., Kohira R., Fujita Y., Fuchigami T., Mugishima H.: A case of D-lactic acid encephalopathy associated with use of probiotics. *Brain Dev.*, 2010, 32 (8), 691-694.
- [46] Halvorsen R., Berstad A., Lassen J., Midtvedt T., Narvhus J.: The Use of Probiotics for Patients in Hospitals. A benefit and risk assessment. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo 2009.
- [47] Nowak A., Śliżewska K., Libudzisz Z., Socha J.: Probiotyki – efekty zdrowotne. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 4 (71), 20-36.
- [48] Pararajasingam A., Uwagwu J.: *Lactobacillus*: The not so friendly bacteria. *BMJ Case Rep.*, 2017. DOI: 10.1136/bcr-2016-218423.
- [49] Pessione E., Mazzoli R., Giuffrida M.G., Lamberti C., Garcia-Moruno E., Barello C., Conti A., Giunta C.: A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. *Proteomics*, 2005, 5 (3), 687-980.
- [50] Prosafe. Biosafety evaluation of probiotic lactic acid bacteria used for human consumption. [online]. Dostęp w Internecie [08.05.2019]: http://cordis.europa.eu/project/rcn/64500_en.html
- [51] Redman M.G., Ward E.J., Phillips R.S.: The efficacy and safety of probiotics in people with cancer: A systematic review. *Ann. Oncol.* 2014, 25 (10), 1919-1929.
- [52] Reid G., Charbonneau D., Erb J., Kochanowski B., Beuerman D., Poehner R., Bruce A.W.: Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: Randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003, 35, 131-134.
- [53] Zielińska D., Sionek B., Kołożyn-Krajewska D.: Safety of probiotics. In: *Diet, Microbiome and Health*. Eds. A. Grumezescu, A.-M. Holban. Academic Press, London 2018, pp.131-161.
- [54] Sadowska-Krawczenko I., Paprzycka M., Korbal P., Wietrzyk A., Krysztopa-Grzybowska K., Polak M., Czajka U., Lutyńska A.: *Lactobacillus rhamnosus* GG suspected infection in a newborn with intrauterine growth restriction. *Benef Microbes.*, 2014, 5(4), 397-402.
- [55] Salminen S., von Wright A., Morelli L., Brassard D., de Vos W.M., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensten G., Birkeland S.E., Mattila-Sandholm T.: Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, 44 (1-2), 93-106.
- [56] Sanders M.E., Akkermans M.L., Haller D.: Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, 2010, 1 (3), 164-185.
- [57] Sawas T., Halabi S.A., Hernaez R., Carey W.D., Cho W.K.: Patients receiving prebiotics and probiotics before liver transplantation develop fewer infections than controls: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2015, 13, 1567-1574.
- [58] Schwenger E.M., Tejani A.M., Loewen P.S.: Probiotics for preventing urinary tract infections in adults and children. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2015, 12, #CD008772. DOI: 10.1002/14651858.CD008772.pub2

- [59] Sherid M., Samo S., Sulaiman S., Husein H., Sifuentes H., Sridhar S.: Liver abscess and bacteremia caused by lactobacillus: Role of probiotics? Case report and review of the literature. BMC Gastroenterol., 2016, 16 (1), #138. DOI: 10.1186/s12876-016-0552-y.
- [60] Shinar E., Leitersdorf E., Yevin R.: *Lactobacillus plantarum* endocarditis. Klin. Wochenschr., 1984, 62 (24), 1173-1174.
- [61] Sniffen J.C., Mc Farland L.V., Evans C.T., Goldstein E.J.C.: Choosing an appropriate probiotic product for your patient: An evidencebased practical guide. PLoS One, 2018, 13 (12), # e0209205. DOI: 10.1371/journal.pone.0209205.
- [62] Zheng M., Zhang R., Tian X., Zhou X., Pan X., Wong A.: Assessing the risk of probiotic dietary supplements in the context of antibiotic resistance. Front. Microbiol., 2017, 19 (8), #908. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00908.
- [63] Sreeja V., Jashbhai B., Prajapati I.B.: Probiotic formulations: Application and status as pharmaceuticals – a review. Probiotics Antimicrob. Prot., 2013, 5 (2), 81-91.
- [64] Suez J., Zmora N., Segal E., Elinav E.: The pros, cons, and many unknowns of probiotics. Nature Medicine, 2019, 25 (5), 716-729.
- [65] Taylor A.L., Dunstan J.A., Prescott S.L.: Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: A randomized controlled trial. J. Allergy Clin. Immunol., 2007, 119 (1), 184-191.
- [66] U.S. Food and Drug Administration: New Dietary Ingredients in Dietary Supplements - Background for Industry. [online]. US FDA. Dostęp w Internecie [08.05.2019]: <https://www.fda.gov/food/new-dietary-ingredients-ndi-notification-process/new-dietary-ingredients-dietary-supplements-background-industry>
- [67] Weber E., Reynaud Q., Suy F., Gagneux-Brunon A., Carricajo A., Guillot A., Botelho-Nevers E.: *Bifidobacterium* species bacteremia: Risk factors in adults and infants. Clin. Infect. Dis., 2015, 61 (3), 482-484.
- [68] Wischmeyer P.E., McDonald D., Knight R.: Role of the microbiome, probiotics, and “dysbiosis therapy” in critical illness. Curr. Opin. Crit. Care, 2016, 22 (4), 347-353.
- [69] Vanichanan J., Chávez V., Wanger A., de Golovine A.M., Vigil K.J.: Carbapenem-resistant *Lactobacillus* intra-abdominal infection in a renal transplant recipient with a history of probiotic consumption. Infection, 2016, 44 (6), 793-796.
- [70] Venugopalan V., Shriner K.A., Wong-Beringer A.: Regulatory oversight and safety of probiotic use. Emerg. Infect. Dis., 2010, 16 (11), 1661-1665.
- [71] Zbinden A., Zbinden R., Berger C., Arlettaz R.: Case series of *Bifidobacterium longum* bacteremia in three preterm infants, on probiotic therapy. Neonatology, 2015, 107 (1), 56-59.
- [72] Zhang Y., Chen J., Wu J., Chalson H., Merigan L., Mitchell A.: Probiotic use in preventing postoperative infection in liver transplant patients. Hepatobiliary Surg. Nutr., 2013, 2 (3), 142-147.

SAFETY IN USE OF PROBIOTICS BY HUMANS

S u m m a r y

Consumers perceive probiotics as natural food ingredients, the use of which brings health benefits. There are numerous research studies conducted in a healthy people population and they indicate a good tolerability of probiotics. Adverse events occur rarely, they often are mild and do not require additional interventions. The possibility of serious adverse events should be considered in the case of groups with an increased risk of adverse reactions. In the group of the most seriously ill, probiotics can bring the greatest benefits, but the decision to use them should take into account the potential risk of complications. Despite

numerous research studies and meta-analyses, it was not possible to define precise indications and contraindications on the use of probiotics. The current rules and regulations on the use of probiotics are not uniform. In North America, of key importance is a principle of long-time and safe for health use of microorganism, which is called a GRAS status (Generally Recognized as Safe). In the European Union, European Food Safety Authority (EFSA) is responsible for regulation and monitoring of the safety of probiotics. There is a list of microorganisms that have been considered safe and are approved for use (QPS – Qualified Presumption of Safety). In North America as well as in Europe the regulations are restrictive and the claims for approval for use of the new microorganism require numerous and expensive scientific research. In the paper the safety-in-use of probiotics was assessed in a group of healthy people and of those with increased risk of adverse reactions. Also the documents were reviewed that regulate the safe use of microorganisms.

Key words: probiotics, health benefits, safety, undesired effects, randomised controlled tests, QPS ☒

WIOLETA CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, ANNA ZADERNOWSKA

**BAKTERIE FERMENTACJI MLEKOWEJ W TYM SZCZEPY
PROBIOTYCZNE JAKO REZERWUAR GENÓW OPORNOŚCI
NA ANTYBIOTYKI**

Streszczenie

Antybiotykooporność stała się jednym z głównych problemów dotyczących bezpieczeństwa zdrowia publicznego. Przez długi czas zjawisko oporności bakterii na antybiotyki wiązano jedynie z presją selekcyjną w środowisku szpitalnym. Dopiero wzrastająca wiedza na temat genetycznych podstaw oporności oraz mechanizmów, jakie towarzyszą jej przekazywaniu, ukierunkowała badaczy na kompleksowe spojrzenie w jej epidemiologię. Bakterie fermentacji mlekowej (LAB) zostały uznane za bezpieczne ze statusem GRAS (*Generally Recognized as Safe*) i QPS (*Qualified Presumption of Safety*), nadanym przez władze FDA i EFSA. Jednakże badania ostatnich lat wskazują, że zarówno wśród szczepów wchodzących w skład kultur starterowych, jak i probiotycznych, występują także odporne na antybiotyki, które mogą przekazać tę oporność innym drobnoustrojom. Jeśli oporność ta jest cechą wrodzoną, związaną z informacją zakodowaną w chromosomie, nie ma powodu do niepokoju. Niestety coraz częściej obserwowane są szczepy z opornością tzw. nabytą na skutek mutacji punktowych lub transferu genów. Oba te zjawiska prowadzą w konsekwencji do trwałego dziedziczenia oporności, a także do jej rozprzestrzeniania drogą transferu horyzontalnego (HGT). Wskutek transferu w komórkach pojawiają się nowe geny oporności, przenoszone na ruchomych elementach genetycznych, takich jak plazmidy, transpozony, sekwencje insercyjne. Coraz częściej pojawiają się niepokojące doniesienia wskazujące, że LAB, w tym szczepy probiotyczne, wykazują oporność nabytą na coraz więcej grup antybiotyków, zwłaszcza na tetracykliny, makrolidy, glikopeptydy czy amfenikole. U wielu z tych szczepów stwierdza się obecność determinant oporności na ruchomych elementach genetycznych, a także potwierdza się ich zdolność do przekazywania genów na drodze HGT do innych bakterii, w tym patogennych.

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, LAB, probiotyki, horyzontalny transfer genów

Wprowadzenie

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) podkreśliła, że problem wzrastającej antybiotykooporności drobnoustrojów jest na tyle poważny, że zagraża osiągnięciom

Dr inż. W. Chajęcka-Wierzchowska, dr hab. inż. A. Zadernowska, prof. nadzw., Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-719 Olsztyn. Kontakt: wioleta.chajacka@uwm.edu.pl

współczesnej medycyny, a infekcje spowodowane bakteriami opornymi na działanie antybiotyków są obecnie jednym z najważniejszych problemów zdrowotnych na świecie. Doniesienia ostatnich lat wskazują, że problem występowania szczepów opornych na antybiotyki dotyczy nie tylko środowiska szpitalnego, ale także izolatów z innych źródeł, w tym coraz częściej obserwowany jest u szczepów izolowanych z żywności. Niemniej jednak badacze skupiają się na antybiotykooporności bakterii chorobotwórczych i oportunistycznych występujących w żywności niż bakterii fermentacji mlekowej (LAB – ang. *Lactic Acid Bacteria*), które mają długą historię stosowania w przemyśle spożywczym. Używane są jako kultury starterowe, kultury ochronne oraz probiotyczne. Jest to duża, heterogenna grupa drobnoustrojów, do której należą pałeczki z rodzajów *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium* oraz ziarniaki *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Enterococcus*.

Dla kilku rodzajów bakterii fermentacji mlekowej Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) zaproponował wartości graniczne (ang. *breakpoint*) określające wartość MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) lub wielkość strefy zahamowania wokół krążka z antybiotykiem, które kwalifikują szczep do kategorii: wrażliwy, średnio wrażliwy lub oporny. W związku z tym należałoby zwracać szczególną uwagę na oporność na antybiotyki wskazane przez EFSA, aby ocenić bezpieczeństwo i skuteczność nie tylko nowych gatunków i szczepów przed wprowadzeniem ich do produktów spożywczych, ale i zweryfikować od lat stosowane w przemyśle kultury starterowe i probiotyczne. Najważniejszym czynnikiem decydującym o kwestii bezpieczeństwa danego szczepu jest możliwość przeniesienia oporności, a nie samo jej występowanie. Konieczne jest zatem określenie, czy geny oporności znajdują się na mobilnych elementach genetycznych, czy też jest to cecha wrodzona. Naturalna oporność LAB i probiotyków na antybiotyki sama w sobie nie jest niebezpieczna, a wręcz pożądana. Zagrożeniem może stać się tylko wtedy, gdy jest możliwa do przeniesienia.

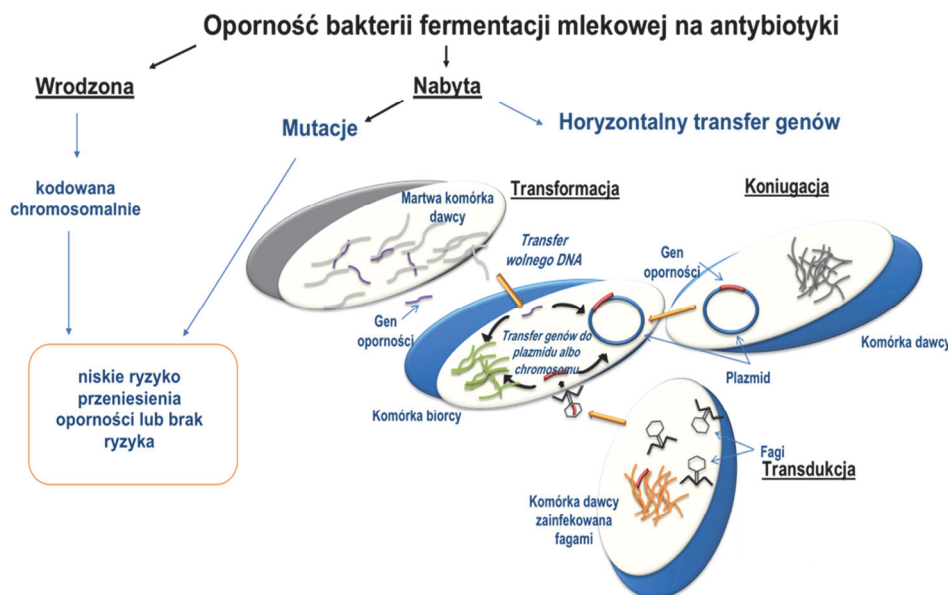
Większość probiotyków jest wprowadzana do organizmu konsumenta w dużych ilościach, zatem obecność determinant oporności na antybiotyki w ich genomie musi być systematycznie badana [33]. Aby zapobiec niepożądanemu przenoszeniu oporności do mikroflory endogennej, probiotyki nie powinny charakteryzować się opornością nabytą. Oporność nabyta związana jest najczęściej ze zmianami w genomie jako skutek mutacji punktowych (losowych), które są następstwem błędów w sekwencji nukleotydowej materiału genetycznego lub mogą być wynikiem nabywania genu albo zespołów genów determinujących oporność na antybiotyki od innych bakterii opornych. To drugie zjawisko zachodzi znacznie częściej, natomiast oba prowadzą w konsekwencji do trwałego dziedziczenia oporności, a także do jej rozprzestrzeniania drogą transferu horyzontalnego [45]. Na skutek horyzontalnego transferu genów w komórkach pojawiają się nowe geny oporności przenoszone na ruchomych elementach genetycznych, jak plazmidy, transpozony lub sekwencje insercyjne. Niejednokrotnie prowadzi to do

powstania tzw. szczepów wieloopornych (MDR – ang. *Multi Drug Resistance*), czyli wykazujących niewrażliwość na co najmniej jeden antybiotyk z trzech lub więcej klas, aktywnych wobec danego gatunku drobnoustrojów. Pojawianiu się szczepów wieloopornych sprzyja jednocześnie kodowanie kilku różnych genów oporności na tym samym elemencie genetycznym.

Mechanizm horyzontalnego transferu genów

Narastająca oporność LAB na antybiotyki wiązana jest m.in. z wykształceniem przez nie efektywnych mechanizmów transferu genów. LAB wykazują niezwykle potencjał w wymianie materiału genetycznego pomiędzy sobą, jak i z innymi gatunkami [28]. Stanowią one mikroflorę żywności i równocześnie wykazują zdolność do przeżywania w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego, co powoduje, że mają kontakt z wieloma rodzajami bakterii, zatem mają warunki, aby przekazywać im własny materiał genetyczny. W przekazywaniu genów biorą udział ruchome elementy genetyczne, które mogą być transferowane pomiędzy różnymi gatunkami, a nawet rodzajami bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [11]. Horyzontalny transfer genów (HGT) pozwala bakteriom na szybkie nabywanie kompleksu nowych cech i jest kluczowym elementem ich ewolucji. Transfer genów LAB najczęściej odbywa się w wyniku koniugacji oraz transdukcji (rys. 1).

Koniugacja jest procesem, podczas którego element koniugacyjny (transpozon lub plazmid) jest przenoszony pomiędzy bakteriami podczas bezpośredniego kontaktu w procesie semikonserwatywnej replikacji. Najbardziej powszechnym mechanizmem horyzontalnego transferu genów jest koniugacja z udziałem plazmidów. Plazmidy to najczęściej koliste, samoreplikujące się cząsteczki DNA. W LAB wyodrębniono plazmidy koniugacyjne, które kodują wszystkie niezbędne do mobilizacji białka oraz plazmidy niekoniugacyjne. Wśród koniugacyjnych wyodrębniono trzy klasy plazmidów zdolnych do replikacji: koliste, Inc18 oraz zależne od feromonów [21]. W LAB najczęściej stwierdzanymi są plazmidy o szerokim zakresie gospodarzy: pAM β 1, pIP501 i pVA797:Tn917, których horyzontalne przenoszenie między drobnoustrojami przyczynia się do rozprzestrzeniania się oporności [23]. Można tu wymienić m.in. plazmid pMD5057 niosący geny oporności na tetracykliny, plazmid pLME300 *L. plantarum* związany w opornością na erytromycynę i streptograminę A, którego obecność stwierdzono w *L. fermentum* oraz plazmid pRE25 naturalnie występujący w *Enterococcus faecalis*, ale występujący też wśród szczepów *Lactococcus lactis*, kodujący oporność na erytromycynę i chloramfenikol [15, 34]. Wśród LAB szczepy należące do rodzaju *Lactobacillus* częściej wymieniane są jako donory, a szczepy *Lactococcus* jako akceptory plazmidów niosących oporność na antybiotyki.



Objaśnienia / Explanatory notes:

Oporność bakterii fermentacji mlekowej na antybiotyki / antibiotic resistance of lactic acid bacteria; wrodzona / intrinsic; nabyta / acquired; kodowana chromosomalnie / chromosomally coded; niskie ryzyko przeniesienia oporności lub brak ryzyka / low risk of resistance transfer or no risk; mutacje / mutations; horyzontalny transfer genów / horizontal gene transfer; transformacja / transformation; koniugacja / conjugation; martwa komórka dawcy / dead donor cell; transfer wolnego DNA / free DNA transfer; gen oporności / resistance gene; transfer genów do plazmidu albo chromosomu / gene transfer to a plasmid or chromosome; komórka biorcy / recipient cell; komórka dawcy / donor cell; plazmid / plasmid; fagi / phages; transdukcja / transduction; komórka dawcy zainfekowana fagami / donor cell infected with phages.

Rys. 1. Mechanizmy oporności LAB na antybiotyki i horyzontalny transfer genów (HGT)

Fig. 1. Mechanisms of LAB antibiotic resistance and horizontal gene transfer (HGT)

Źródło / Source: opracowanie własne / the author's own study

Koniugacja może także zachodzić z udziałem transpozonów. Potocznie zwane są one „skaczącymi genami”. Największą rolę odgrywają transpozony koniugacyjne, które mogą być przekazywane pomiędzy komórkami. Występują w formie zintegrowanej z chromosomem bakteryjnym lub plazmidem. Przekazywanie transpozonów zachodzi podobnie jak plazmidów koniugacyjnych. Transpozon włącza się do genomu w komórce biorcy. Występują one najczęściej w szczepach *Lactococcus* (Tn5276 i Tn5301), *Lactobacillus* (Tn916/Tn1545) i *Streptococcus* (Tn3701) [34]. Najczęściej przenoszone są na nich geny determinujące oporność na tetracykliny, głównie *tet*(M), chloramfenikol (*cat*) i kanamycynę (*aphA3*) [41].

Warunkiem niezbędnym do procesu koniugacji z udziałem plazmidów lub transpozonów jest obecność czynników powodujących agregację komórek przy wysokiej koncentracji mieszaniny dawcy i biorcy. Wytworzenie agregacji, czyli specyficznego

środowiska, w którym koniugacyjne przekazywanie plazmidów jest ułatwione, jest istotnym warunkiem w środowisku płynnym. Transfer między komórkami przylegającymi do powierzchni wspomagany jest przez białka powierzchniowe [11].

Transfer genów oporności w LAB może także zachodzić na drodze transdukcji i transformacji. Transdukcja jest procesem polegającym na przenoszeniu materiału genetycznego z komórki do komórki za pośrednictwem bakteriofaga, a więc nie wymaga bezpośredniego kontaktu pomiędzy dawcą i biorcą. Niemniej jednak zarówno transformacja, jak i transdukcja są mechanizmami zdecydowanie rzadziej występującym w LAB niż koniugacja. Jednym z powodów jest udział w koniugacji całego wachlarza mobilnych elementów genetycznych. Istnieje także hipoteza, że koniugacja pozwala na wymianę materiału genetycznego między gatunkami i rodzajami, podczas gdy transformacja i transdukcja ograniczona jest do wymiany materiału genetycznego w obrębie tego samego gatunku [23].

Antybiotykooporność wybranych gatunków bakterii fermentacji mlekowej

Największą grupą wśród bakterii kwasu mlekowego i prawdopodobnie najpowszechniej stosowaną jako probiotyki w różnych produktach spożywczych są szczepy należące do rodzaju *Lactobacillus*. Najlepiej scharakteryzowany jest ich fenotyp wynikający z naturalnej (wrodzonej) oporności na wankomycynę należącą do glikopeptydów. Antybiotyk ten wchodzi w kontakt z prekursorami peptydoglikanu po stronie ściany komórkowej błony cytoplazmatycznej i wiąże się z końcem D-alanilo/D-alaniny pentapeptydu, zapobiegając polimeryzacji prekursorów peptydoglikanu. W kilku gatunkach LAB końcowa reszta D-alaniny jest zastąpiona przez D-mleczan lub D-serynę w muramylopentapeptydzie, zapobiegając wiązaniu wankomycyny [13]. Potwierdzono wrodzoną oporność na wankomycynę takich gatunków, jak *Lb. paracasei*, *Lb. salivarius* i *Lb. plantarum*.

Wśród LAB odnotowano także naturalną oporność na inhibitory syntezy kwasów nukleinowych, takie jak: trimetoprim, a także bacytracynę, ciprofloksacynę, czy kwas fusydowy [3]. Gatunki należące do tego rodzaju wykazują wrażliwość na antybiotyki, których mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy ściany komórkowej, m.in. penicylinę i ampicylinę [16]. Są one podatne także na chloramfenikol, erytromycynę i klindamycynę, czyli antybiotyki hamujące syntezę białek [12]. W badaniach prowadzonych na izolatach z produktów mleczarskich wykazano oporność na erytromycynę, tetracyklinę, chloramfenikol i wankomycynę [30, 43, 44]. Ponadto większość badanych szczepów wykazuje oporność na metronidazol, co wynika z ich naturalnej oporności na sulfonamidy i trimetoprim, podczas gdy zazwyczaj są wrażliwe na piperacylinę oraz piperacylinę z tazobaktamem. Często obserwowana jest też oporność na aminoglikozydy, jak: neomycyna, kanamycyna, streptomycyna i gentamycyna [12, 15].

Tabela 1. Genetyczne determinanty oporności LAB na antybiotyki

Table 1. Genetic determinants of antibiotic resistance identified in LAB

Geny Genes	Oporność Resistance	Mechanizm Mechanism	Lokalizacja Localisation	Literatura Literature
<i>aac(6)-aph(2)</i> <i>ant(6)</i> <i>aph(3)-IIIa</i>	Aminoglikozydy Aminoglycosides	modyfikacja enzymatyczna enzymatic modification	-	[38]
<i>blaZ</i>	β-laktamy β-lactams	hydroliza antybiotyku antibiotic hydrolysis	chromosom chromosome	[5]
<i>cat</i>	Amfenikole Amphenicols	hamowanie biosyntezy białka / inhibition of protein biosynthesis	plazmid plasmid	[26]
<i>erm(A)</i> <i>erm(B)</i> <i>erm(C)</i> <i>erm(T)</i>	MLS	metylacja rybosomowa ribosomal methylation	plazmid, transpozon chromosom plazmid, transpozon chromosome	[26, 42]
<i>lnuA</i> <i>lnuG</i>	Linkozamidy Lincosamide	modyfikacja enzymatyczna enzymatic modification	plazmid / plazmid transpozon / transposon	[39, 47]
<i>mef A</i>	Makrolidy Macrolides	efflux	-	[10]
<i>mrs C</i>	Makrolidy, linkozaminy, streptograminy Macrolides, lincosamides, streptogramines	efflux	-	[42]
<i>tet(K)</i> <i>tet(L)</i>	Tetracykliny Tetracyclines	efflux	plazmid / plazmid	[42]
<i>tet(W)</i> <i>tet(M)</i> <i>tet(S)</i> <i>tet(O)</i> <i>tet(Q)</i> <i>tet(36)</i> <i>tet(Z)</i>	Tetracykliny Tetracyclines	ochrona rybosomu ribosom protection	plazmid, transpozon chromosom plazmid transpozon chromosome	[4, 5]
<i>vat(E)</i>	Chinuprystyna- dalfoprystyna Quinupristin-dalfopristin	acetylacja antybiotyku antibiotic acetylation	-	[37]

Z kolei oporność nabytą szczepy *Lactobacillus* najczęściej wykazują na tetracyklinę [31]. Stwierdzono u nich co najmniej 11 różnych genów odpowiedzialnych za oporność na ten antybiotyk, w tym: *tet(W)*, *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(36)*, *tet(Z)*, *tet(W/O)* oraz pompy efflux kodujące geny *tet(K)* oraz *tet(L)* [33]. Geny kodujące oporność na chloramfenikol – *cat* stwierdzano u *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*

subsp. *bulgaricus* [26], *Lb. johnsonii* [37], *Lb. reuteri* oraz *Lb. plantarum* [1]. Wśród genów kodujących oporność na erytromycynę najczęściej stwierdzanym u *Lactobacillus* jest gen *erm(B)*, rzadziej pozostałe, takie jak *erm(A)*, *erm(C)*, *erm(T)* kodujące oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy (MLS) [37, 44]. Gen *erm(B)* był stwierdzany m.in. u takich gatunków jak *Lb. fermentum*, *Lb. vaginalis*, *Lb. plantarum*, *Lb. salivarius*, *Lb. acidophilus*, *Lb. animalis* i *S. thermophilus*. Wśród genów kodujących oporność na antybiotyki aminoglikozydowe dominują *aac(6)-aph(2)*, *ant(6)* i *aph(3)-IIIa* [38]. Często stwierdza się także geny kodujące oporność na linkozamidy *lnu(A)* i *lnu(G)* [26, 29, 39, 47]. Z kolei za oporność na streptograminy odpowiada najczęściej gen *vat(E)* [37] (tab. 1).

W szczepach bakterii probiotycznych stwierdzano m.in. obecność genów *erm(B)* i/lub *tet(W)*, *tet(M)* [30]. Geny oporności *tet(W)* i *lnu(A)* stwierdzono m.in. w komercyjnym szczepie probiotycznym *Lb. reuteri* ATCC 55730 [29]. Ponadto Hummel i wsp. [26] w szczepie probiotycznym *Lb. salivarius* BFE 7441 stwierdzili obecność genu *erm(B)* na chromosomie. W innych badaniach dowiedziono, że probiotyczny szczep *Lb. plantarum* CCUG 43738 wykazywał fenotypową oporność na tetracyklinę i minocyklinę, stwierdzono także obecność *tet(S)* na plazmidzie [27].

Pałeczki należące do rodzaju *Bifidobacterium* sp. charakteryzują się wrażliwością na ampicylinę, cefotaksym i erytromycynę. Natomiast oporność przy wysokich wartościach MIC stwierdzono wobec streptomycyny i gentamycyny [35]. Szczepy izolowane z żywności wykazywały oporność na aminoglikozydy, cykloserynę, kwas nalidyksowy i oporność na kanamycynę, polimiksyne B oraz aztreonam [14]. Bifidobakterie są też naturalnie odporne na mupirocynę oraz duże stężenia aminoglikozydów [36, 40].

W szczepach *Bifidobacterium* (*B. animalis* subsp. *lactis* i *B. thermophilum*) zidentyfikowano m.in. gen kodujący białko zabezpieczające rybosom oraz transpozon Tn5454 [43]. Często obserwowana oporność rodzaju *Bifidobacterium* na tetracyklinę kodowana jest zazwyczaj przez geny *tet(W)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W/32/O)* i *tet(O/W)*, co stwierdzono u kilku gatunków *Bifidobacterium*, w tym *B. longum* (subsp. *infantis* i subsp. *longum*), *B. breve*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. pseudocatenulatum* i *B. thermophilum* [2, 3, 19, 24, 43]. Gen *tet(W)* oznaczono w szczepach *B. longum* i we wszystkich szczepach *B. animalis* subsp. *lactis* [2, 3, 24] izolowanych z fermentowanych produktów mlecznych. Wiele z wyżej wymienionych determinant genetycznych występuje na ruchomych elementach, takich jak transpozony i plazmidy, które mogą rozprzestrzeniać geny oporności na antybiotyki głównie za pomocą mechanizmów koniugacyjnych.

W porównaniu z liczbą doniesień dotyczących antybiotykooporności bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, informacji na temat *Lactococcus* jest stosunkowo niewiele. Może to wynikać z faktu, że spośród wszystkich gatunków należących do rodzaju *Lactococcus* jedynie *L. lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris* mają zastosowanie

w przemyśle spożywczym. Dane literaturowe wskazują, że bakterie z rodzaju *Lactococcus* wykazują naturalną oporność na metronidazol, trimetoprim, gentamycynę i kanamycynę [20]. Wrażliwe są z kolei na rifampicynę, chloramfenikol, antybiotyki β -laktamowe oraz erytromycynę, wankomycynę, linkomycynę i teikoplaninę [17]. Najczęściej wskazywana jest oporność na tetracykliny, kodowana głównie przez gen *tet*(M). Stwierdza się także obecność szczepów opornych na erytromycynę, za co odpowiedzialny jest gen *erm*(B) [18]. W literaturze znajdują się także pojedyncze doniesienia dotyczące oporności *Lactococcus* na inne antybiotyki, na przykład trimetoprim, za co odpowiedzialny jest gen *dfrA*, rifampicynę, czy kloksacylinę. Na podstawie analizy danych literaturowych można stwierdzić, że antybiotykooporność szczepów *Lactococcus* nie jest powszechnie występującym problemem.

Biorąc pod uwagę, że niektóre szczepy należące do rodzaju *Enterococcus* są zaliczane do patogenów oportunistycznych, nadal dyskusyjne jest ich stosowanie jako probiotyków u ludzi. Dotychczas jedynie gatunek *E. faecium* znalazł zastosowanie jako probiotyk i to głównie dla zwierząt. Paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* charakteryzują się opornością wrodzoną na: cefalosporyny (wszystkich generacji), trimetoprim/sulfametoksazol, linkozamidy (klindamycynę), małe stężenia aminoglikozydów [25]. Za szczególnie niebezpieczną uważa się oporność enterokoków na wankomycynę, która jest lekiem ostatniej szansy w zakażeniach enterokokowych. U enterokoków, w odróżnieniu od szczepów należących do rodzaju *Lactobacillus*, oporność na wankomycynę jest cechą nabytą, kodowaną na mobilnych elementach genetycznych. Pod względem oporności na wankomycynę enterokoki charakteryzują się dużą niejednorodnością zarówno fenotypową, jak i genotypową. Szczepy wytwarzające prekursor peptydoglikanu kończące się dipeptydem D-Ala-D-Lac wykazują oporność na duże stężenia wankomycyny i teikoplaniny, natomiast zakończone D-Ala-D-Ser – jedynie na małe stężenia wankomycyny [13]. Ze względu na szybkość oraz częstość rozprzestrzeniania się największe znaczenie mają fenotypy VanA i VanB, których geny zlokalizowane są na ruchomych elementach genetycznych. Fenotyp VanA indukowany przez wankomycynę i teikoplaninę charakteryzuje enterokoki odporne na duże stężenia tych antybiotyków. Przenoszenie genów *vanA* odbywa się przez transpozon Tn1546 znajdujący się na plazmidzie lub fragmencie chromosomu. Paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* o fenotypie VanB wykazują oporność na różne stężenia wankomycyny oraz wrażliwość na teikoplaninę. Induktorem tego fenotypu jest wyłącznie wankomycyna. Geny *vanB* przekazywane są między komórkami drobnoustrojów za pomocą dużych koniugacyjnych elementów genetycznych, takich jak transpozon: Tn1549, Tn1547, Tn5382, które mogą być przenoszone między chromosomami [22].

Mobilne elementy genetyczne mogą być przenoszone między szczepami bakterii fermentacji mlekowej do komórek innych bakterii Gram-dodatnich, a także Gram-ujemnych. Oprócz transferu wewnątrzgatunkowego stwierdza się także możliwość

przekazywania genów szczepom *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, a nawet *Listeria monocytogenes* [34]. Z drugiej strony, pałeczki kwasu mlekowego są w stanie pozyskać determinanty oporności od innych bakterii Gram-dodatnich [23]. Poza badaniami *in vitro*, potencjalne ryzyko związane z możliwością transferu genów od LAB wykazano również na eksperymentalnych modelach zwierzęcych [33]. Wszystkie te badania potwierdzają hipotezę, że wprowadzanie do przewodu pokarmowego LAB, będących rezerwuarami genów kodujących oporność na antybiotyki, stwarza ryzyko przeniesienia tych genów do mikroflory jelitowej.

Oporność bakterii fermentacji mlekowej na antybiotyki może być związana także z mutacjami chromosomalnymi. W bakteriach szczepu *L. rhamnosus* zidentyfikowano m.in. mutację genu 23S rRNA zmniejszającą powinowactwo erytromycyny do rybosomu [18]. Mutacje są jednak bardzo rzadko związane z możliwością przeniesienia oporności pomiędzy szczepami [9].

Analizy molekularne, sekwencjonowanie genów i analiza bioinformatyczna w badaniach antybiotykooporności LAB

Zastosowanie metod molekularnych, takich jak analiza mikromacierzy czy inne techniki molekularne jest niezwykle pomocne w określaniu podstaw genetycznych nabytych fenotypów oporności. Co więcej, rosnąca dostępność sekwencji genomowych i redukcja kosztów urządzeń do sekwencjonowania genomu stwarzają nowe możliwości badań przesiewowych genów oporności na antybiotyki [7].

W ostatnim roku pojawiła się praca zespołu badaczy z Włoch i Irlandii, w której autorzy – Campedelli i wsp. [8] ustalili wzorce wrażliwości na antybiotyki 182 szczepów z rodzaju *Lactobacillus* i porównali ich fenotypy z genotypami na podstawie sekwencjonowania całego genomu. Zaskakujące było to, że wiele gatunków wykazywało poziom oporności na antybiotyki przekraczający poziom zalecany przez EFSA. Autorzy zasugerowali, że wartości definiujące MIC powinny zostać ponownie zweryfikowane. Dostarczyli tym samym dowodów na konieczność zmian wytycznych regulacyjnych dotyczących oceny bezpieczeństwa szczepów probiotycznych.

Wartości MIC dla szczepów LAB definiuje EFSA. Gdy MIC obserwowany u szczepu probiotycznego jest wyższy niż zdefiniowana wartość graniczna, wówczas należy przeprowadzić badania genetyczne celem oznaczenia obecności genów antybiotykooporności. Powinna to być praktyka bezwzględna, zanim probiotyk będzie można bezpiecznie stosować w żywności. Nie ma jednak standardów dotyczących wykrywania i identyfikacji genów oporności na antybiotyki ani standardów badania możliwości ich transferu między różnymi izolatami i gatunkami. Dzieje się tak dlatego, że geny oporności są liczne, co utrudnia standaryzację metod, a ich wykrywanie wymaga izolatów referencyjnych i sekwencji genów, które nadal są nieliczne lub niekompletne.

Postępy w technologiach sekwencjonowania nowej generacji umożliwiają sekwencjonowanie całego genomu oraz śledzenie powstawania zmian w populacji i analizowanie różnic genomicznych między osobnikami w obrębie populacji pod różnymi presjami selekcyjnymi lub środowiskami [6, 32]. Zsekwencjonowanie genomu szczepu referencyjnego pozwala na wykrycie mutacji poprzez porównanie sekwencji badanych izolatów poddanych stresom środowiskowym z sekwencją szczepów referencyjnych. Zhang i wsp. [46] zbadali mechanizmy oporności na streptomycynę probiotycznego szczepu *L. plantarum* ATCC 14917. Autorzy pasażowali szczep w podłożach ze zwiększającym się stężeniem streptomycyny. Po 25 dniach osiągnięto minimalne stężenie hamujące (MIC) o 8,192 razy wyższe niż MIC pierwotnego izolatu macierzystego *L. plantarum* ATCC 14917. Następnie z zastosowaniem sekwencjonowania zbadano mechanizmy adaptacji i odporności tego szczepu. U opornego mutantu stwierdzono mutacje w 5 genach związanych z białkiem rybosomalnym S12, białkiem LPXTG, białkiem rodziny LrgA, białkiem rodziny fosfatazy Ser/Thr i hipotetycznym białkiem, które może korelować z opornością na streptomycynę. Po pasażu w pożywce wolnej od streptomycyny pozostał tylko zmutowany gen kodujący rybosomalne białko S12. Chociaż wartość MIC *L. plantarum* ATCC 14917 była zmniejszona przy braku presji selekcyjnej pozostawała 128-krotnie wyższa niż wartość MIC macierzystego izolatu, wskazując, że białko rybosomalne S12 może odgrywać ważną rolę w oporności na streptomycynę. Badania te wskazują, że zamiast badać transfer genów za pomocą metod *in vivo* lub *in vitro*, skutecznym sposobem kompleksowej oceny potencjalnych genów oporności na antybiotyki i ich mobilności szczepów probiotycznych może być sekwencjonowanie całego genomu i analiza bioinformatyczna.

Podsumowanie

Bakterie fermentacji mlekowej, w tym szczepy probiotyczne, mogą stanowić rezerwuar genów oporności na antybiotyki. W związku z niebywałą zdolnością tej grupy drobnoustrojów do wymiany materiału genetycznego niezbędne jest ciągłe monitorowanie nie tylko fenotypu, ale także genotypu oporności oraz określanie lokalizacji determinant oporności i możliwości ich przekazywania w warunkach *in vivo*.

Publikacja została napisana w wyniku odbywania przez autorki stażu w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój), zrealizowanego w projekcie Program Rozwojowy Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (POWR.03.05.00-00-Z310/17).

Literatura

- [1] Ahn C., Collins-Thompson D., Duncan C., Stiles M.E.: Mobilization and location of the genetic determinant of chloramphenicol resistance from *Lactobacillus plantarum* caTC2R. *Plasmid*, 1992, 27, 169-176.
- [2] Aires J., Doucet-Populaire F., Butel M.J.: Tetracycline resistance mediated by tet(W), tet(M), and tet(O) genes of *Bifidobacterium* isolates from humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73, 2751-2754.
- [3] Ammor M.S., Flórez A.B., Alvarez-Martin P., Margolles A., Mayo B.: Analysis of tetracycline resistance tet(W) genes and their flanking sequences in intestinal *Bifidobacterium* species. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2008, 62, 688-693.
- [4] Ammor M.S., Gueimonde M., Danielsen M., Zagorec M., van Hoek A.H., de los Reyes-Gavilán C.G.: Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried tet(L) and chromosomally located transposon-associated tet(M), coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74, 1394-1401.
- [5] Aquilanti L., Garofalo C., Osimani A., Silvestri G., Vignaroli C., Clementi F.: Isolation and molecular characterization of antibiotic-resistant lactic acid bacteria from poultry and swine meat products. *J. Food Prot.*, 2007, 70, 557-565.
- [6] Barrick J.E., Lenski R.E.: Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Rev. Genet.*, 2013, 14, 827-839.
- [7] Bennedsen M., Stuer-Lauridsen B., Danielsen M., Johansen, E.: Screening for antimicrobial resistance genes and virulence factors via genome sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 2785-2787.
- [8] Campedelli I., Mathur H., Salvetti E., Clarke S., Rea M.C., Torriani S., Ross R.P., Hill C., O'Toole P.W.: Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2018, 85(1), #e01738-18. DOI: 10.1128/AEM.01738-18.
- [9] Cannon J.P., Lee T.A., Bolanos J.T., Danziger L.H.: Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: A retrospective review of over 200 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2005, 24, 31-40.
- [10] Cauwerts K., Pasmans F., Devriese L.A., Martel A., Haesebrouck F., Decostere A.: Cloacal *Lactobacillus* isolates from broilers show high prevalence of resistance towards macrolide and lincosamide antibiotics. *Avian Pathol.*, 2006, 35, 160-164.
- [11] Clewell D.B., Francia M.V., Flannagan S.E., An F.Y.: Enterococcal plasmid transfer: Sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid*, 2002, 48, 193-201.
- [12] Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salzano G., Sorrentino E.: Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Le Lait*, 2005, 85, 193-204.
- [13] Courvalin P.: Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2005, 294, 479-486.
- [14] D'Aimmo M.R., Modesto M., Biavati B.: Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, 115, 35-42.
- [15] Danielsen M.: Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. *Plasmid*, 2002, 48, 98-103.
- [16] Danielsen M., Wind A.A.: Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, 82, 1-11.
- [17] Devirgiliis C., Barile S., Caravelli A., Coppola D., Perozzi G.: Identification of tetracycline- and erythromycin-resistant Gram-positive cocci within the fermenting microflora of an Italian dairy food product. *J. Appl. Microbiol.*, 2010, 109, 313-323.

- [18] Flórez A.B., Ladero V., Alvarez-Martín P., Ammor M.S., Alvarez M.A., Mayo B.: Acquired macro-lide resistance in the human intestinal strain *Lactobacillus rhamnosus* E41 associated with a transition mutation in 23S rRNA genes. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2007, 30, (4), 341-344.
- [19] Flórez A.B., Ammor M.S., Alvarez-Martín P., Margolles A., Mayo B.: Molecular analysis of tet(W)gene-mediated tetracycline resistance in dominant intestinal *Bifidobacterium* species from healthy humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 7377-7379.
- [20] Florez A.B., Delgado S., Mayo B.: Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canadian J. Microbiol.*, 2005, 51, 51-58.
- [21] Franz C., Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H.: Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, 88 (2-3), 105-122.
- [22] Gholizadeh Y., Courvalin P.: Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, 16 (Supl. 1), S11-S17.
- [23] Gueimonde M., Sanchez B.G., de Los Reyes-Gavilán C., Margolles A.: Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol.*, 2013, 4, 202.
- [24] Gueimonde M., Flórez A.B., van Hoek A.H., Stuer-Lauridsen B., Strøman P., de los Reyes-Gavilán C.G.: Genetic basis of tetracycline resistance in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76, 3364-3369.
- [25] Hollenbeck B.L., Rice L.B.: Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 2012, 3 (5), 421-569.
- [26] Hummel A.S., Hertel C., Holzapfel W.H., Franz C.M.: Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73, 730-739.
- [27] Huys G., Vancanneyt M., D'Haene K., Vankerckhoven V., Goossens H., Swings J.: Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Research in Microbiology*, 2006, 157, 803-810.
- [28] Jensen L.B., Garcia-Migura L., Valenzuela A.J.S., Løhr M., Hasman H., Aarestrup F.M.: A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 2010, 80, 25-43.
- [29] Kastner S., Perreten V., Bleuler H., Hugenschmidt G., Lacroix C., Meile L.: Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *System. Appl. Microbiol.*, 2006, 29, 145-155.
- [30] Klare I., Konstabel C., Werner G., Huys G., Vankerckhoven V., Kahlmeter G.: Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 2007, 59, 900-912.
- [31] Korhonen J.M., Danielsen M., Mayo B., Egervarn H., Axelsson L., Huys G., von Wright A.: Antimicrobial susceptibility and proposed microbiological cut-off values of lactobacilli by phenotypic determination. *Int. J. Probiot. Prebiot.*, 2008, 3, 257-268.
- [32] Lenski R.E.: Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations. *ISME*, 2017, 11 (10), 2181-2194.
- [33] Mater D.D., Langella P., Corthier G., Flores M.J.: A probiotic *Lactobacillus* strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 14, 123-127.
- [34] Mathur S., Singh R.: Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, 105, 281-295.
- [35] Mättö J., Alakomi H.L., Vaari A., Virkajärvi I., Saarela M.: Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *Int. Dairy J.*, 2006, 16, 1029-1037.
- [36] Mayrhofer S., Mair C., Kneifel W., Domig K.J.: Susceptibility of bifidobacteria of animal origin to selected antimicrobial agents. *Chemoth. Res. Practice*, 2011, #989520. DOI: 10.1155/2011/989520.

- [37] Mayrhofer S., van Hoek A.H.A.M., Mair C., Huys G., Aarts H.J.M., Kneifel W., Domig K.J.: Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, 144, 81-87.
- [38] Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Poeta P., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C.: Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, 111, 234-240.
- [39] Rosander A., Connolly E., Roos S.: Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74(19), 6032-6040.
- [40] Serafini F., Bottacini F., Viappiani A., Baruffini E., Turrone F., Foroni E., Lodi T., van Sinderen D., Ventura M.: Insights into physiological and genetic mupirocin susceptibility in bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 3141-3146.
- [41] Teuber M., Meile L., Schwarz F.: Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, 76, 115-137.
- [42] Thumu S.C., Halami P.M.: Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2012, 102, 541-551.
- [43] Van Hoek A.H., Mayrhofer S., Domig K.J., Aarts H.J.: Resistance determinant erm(X) is borne by transposon Tn5432 in *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2008, 31, 544-548.
- [44] Van Hoek A.H., Mayrhofer S., Domig K.J., Flórez A.B., Ammor M.S., Mayo B., Aarts H.J.M.: Mosaic tetracycline resistance genes and their flanking regions in *Bifidobacterium thermophilum* and *Lactobacillus johnsonii*. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, 2008, 52, 248-252.
- [45] Werner G., Coque T.M., Franz C.M., Grohmann E., Hegstad K., Jensen L., van Schaik W., Weaver K.: Antibiotic resistant enterococci-tales of a drug resistance gene trafficker. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2013, 303 (6-7), 360-379.
- [46] Zhang J., Gao B., Wang D., Huo Z., Wang J., Zhang J., Shao Y.: Whole-genome sequencing reveals the mechanisms for evolution of streptomycin resistance in *Lactobacillus plantarum*. *J. Dairy Sci.*, 2018, 101, 2867-2874.
- [47] Zhu X.Q., Wang X.M., Li H., Shang Y.H., Pan Y.S., Wu C.M., Wang Y., Du X.D., Shen J.Z.: Novel *lnu(G)* gene conferring resistance to lincomycin by nucleotidylation, located on Tn6260 from *Enterococcus faecalis* E531. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 2017, 72, 4, 993-997.

LACTIC ACID BACTERIA INCLUDING PROBIOTIC STRAINS AS A RESERVOIR OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES

S u m m a r y

Antibiotic resistance has become one of the major issues pertaining to public health safety. For a long time the phenomenon of bacterial resistance to antibiotics has been associated exclusively with selective pressure in the hospital environment. It was only the increasing knowledge of the genetic basis of resistance and the mechanisms accompanying its transmission that shifted the focus of researchers to comprehensively approach its epidemiology. Lactic acid bacteria (LAB) have been recognised as safe with the GRAS (Generally Recognized as Safe) and QPS (Qualified Presumption of Safety) status granted by FDA and EFSA. However, the recently conducted studies have shown that among the strains of the starter cultures and probiotic strains, there are also those resistant to antibiotics, which can transmit their antibiotic resistance to other microorganisms. If the resistance is innate, associated with information encoded in

the chromosome, it is not a cause for concern. Unfortunately, increasingly often, there are reported strains with the so-called acquired resistance resulting from the spot mutations or gene transfer. As a consequence those two phenomena lead to permanent resistance inheritance and to its propagation by horizontal gene transfer (HGT). Owing to that gene transfer, in cells appear new resistance genes, which are transferred on mobile genetic elements, such as plasmids, transposons and insertion sequences. More and more worrying reports appear, which indicate that LAB including probiotic strains exhibit the acquired resistance to a growing number of antibiotic groups, especially to tetracyclines, macrolides, glycopeptides and amphenicols. A number of those strains have been found to contain determinants of resistance on mobile genetic elements and their ability has been confirmed to transfer genes by HGT to other bacteria including pathogens.

Key words: antibiotic resistance, LAB, probiotics, horizontal gene transfer ☒

ELŻBIETA ROSIAK, DANUTA JAWORSKA

WŁAŚCIWOŚCI PROBIOTYCZNE I PREBIOTYCZNE MIODÓW PSZCZELICH W ASPEKTCIE ICH JAKOŚCI I BEZPIECZEŃSTWA ZDROWOTNEGO

Streszczenie

Celem pracy był przegląd dostępnej literatury w zakresie właściwości zdrowotnych w tym probiotycznych i prebiotycznych miodów pszczelich. Miód jest jednym z najbardziej zróżnicowanych produktów pod względem składu chemicznego, obejmującym naturalne substancje bioaktywne a także substancje bakteriostatyczne lub antybiotykowe. Odmiany miodu różną się między sobą aktywnością i właściwościami przeciwbakteryjnymi, a miód manuka cechuje się najsilniejszymi właściwościami w tym zakresie. Obecność bakterii kwasu mlekowego w miodzie ma również działanie przeciwbakteryjne. Produktami ich metabolizmu są bakteriocyny i kwasy organiczne w wyniku homo- i heterofermentacji. Mikroflora miodu różni się w zależności od stadium dojrzałości miodu. Miody dojrzewające cechują się głównie obecnością bakterii tlenowych, a grzyby pleśniowe występują w mniejszych ilościach. W dojrzałych miodach najczęściej występują grzyby pleśniowe. Na podstawie obecnego stanu wiedzy można powiedzieć także, że związki fenolowe zawarte w miodzie mają właściwości przeciwutleniające. Oprócz niewątpliwych zalet miodu, należy pamiętać o możliwości zanieczyszczenia miodu zarodnikami *Clostridium botulinum*.

Słowa kluczowe: miody, cechy sensoryczne, właściwości probiotyczne, właściwości prebiotyczne, bezpieczeństwo

Wprowadzenie

Do produktów pszczelich dostępnych na rynku zalicza się mleczko pszczele, pyłek, pierzgę, wosk pszczeli, jednak najpopularniejszym produktem jest miód. Wyróżnia się miody rodzajowe: kwiatowe, nektarowe powstałe z nektaru roślinnego oraz miody spadziowe uzyskane głównie z wydalin owadów wysysających żywe części roślin lub wydzielin żywych części roślin (*Hemiptera*) [19]. Podział na miody odmianowe uwzględnia przewagę pyłku dominującego w miodzie, dlatego miody należą do pro-

Dr inż. E. Rosiak, dr hab. D. Jaworska, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-767 Warszawa. Kontakt: elzbieta_rosiak@sggw.pl

duktów niezwykle zróżnicowanych pod względem składu i właściwości. Warunkowane są one przede wszystkim dobrostanem pszczoł, rodzajem surowca, z którego powstał produkt oraz przebiegiem procesu dojrzewania. Najczęściej wymieniane właściwości miodów wynikają z ich działania przeciwdrobnoustrojowego, enzymatycznego i dietetycznego, cech sensorycznych, jak również oddziaływania prebiotycznego oraz obecności bakterii wykazujących działanie probiotyczne. Niektóre szczepy bakterii kwasu mlekowego wykazują korzystne działanie na organizm człowieka polegające na normalizacji mikrobioty przewodu pokarmowego i odpowiedź antyalergiczną organizmu.

Skład miodu a jego właściwości prebiotyczne

Najliczniejszą grupą związków występujących w miodzie są węglowodany stanowiące ok. 65 ÷ 87 % (miody nektarowe – ok. 80 %, miody spadziowe – ok. 77 %) wszystkich związków. Spośród monosacharydów wyróżnia się glukozę (ok. 31 %) oraz fruktozę (ok. 38 %). Disacharydy stanowią 3,29 ÷ 18,60 %, w tym sacharoza – średnio 1 % (z reguły jej zawartość nie przekracza 3 %, a największą zawartość sacharozy wykazują miody, które nie są w pełni dojrzałe), maltoza – 2,8 ÷ 7,5 % oraz w znikomych ilościach występują: izomaltoza, maltuloza, melibioza, turanoza, nigeroza, kojibioza, gencjobioza, laminoryboza. Trisacharydy obecne w miodzie to przede wszystkim melecytoza (stanowi 0,33 ÷ 3,91 % w zależności od gatunku) oraz w niewielkich ilościach: rafinoza, maltotrioza, fruktomaltoza. Oligosacharydy stanowią ok. 10 % wszystkich cukrów w miodzie i pochodzą głównie z nektaru lub spadzi, zależnie od pochodzenia geograficznego. Dekstryny to wielocukry obecne w miodzie, które stanowią 1 ÷ 3 % zawartości wszystkich węglowodanów w miodach nektarowych i 5 ÷ 25 % w miodach spadziowych [17].

Znaczna część znanych oligosacharydów miodu wykazuje właściwości prebiotyczne. Ich pozytywne oddziaływanie na organizm polega na selektywnej stymulacji wzrostu pałeczek mlekowych, głównie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, bytujących w przewodzie pokarmowym człowieka. Prebiotyczne właściwości miodu związane z obecnością fruktooligosacharydów (FOS) z najbardziej znaną panozą związane są z aktywnością α -D-glukozydazy pszczoł. Enzym ten katalizuje transfer grup α -D glukopyranozyliowych z sacharozy do innych sacharydów. W wyniku tej reakcji powstają fruktooligosacharydy i inne oligosacharydy [6].

Kolejną grupą substancji chemicznych występujących w miodzie pszczelim są kwasy organiczne mające wpływ na smak produktu. Ich przeciętna zawartość wynosi ok. 1,5 % suchej masy, z czego najwięcej, bo aż 70 ÷ 90 % ogólnej ilości tych związków stanowi kwas glukonowy. Ponadto w miodzie wykryto takie kwasy, jak: mrówkowy, winowy, octowy, szczawiowy, malonowy, kapronowy, kaprylowy, jabłkowy, bursztynowy, mlekowy, cytrynowy, walerianowy [11]. Kwasy organiczne zawarte

w miodzie pochodzą głównie z organizmów pszczoł, przemian zachodzących podczas wytwarzania miodów, a ich ilość wzrasta wraz z postępującym procesem dojrzewania miodu. Ponadto w miodach wykryto niewielkie ilości kwasów nieorganicznych – solnego i fosforowego [11].

Enzymy należą do substancji białkowych obecnych w miodach i pochodzącą głównie z gruczołów pszczoł, a w mniejszym stopniu z pyłku kwiatowego oraz spadzi [17]. W miodach występuje głównie diastaza – inaczej zwaną amylazą. Wyróżnia się dwie jej formy: α -amylazę, która rozkłada skrobię do dekstryn oraz β -amylazę, rozkładającą dekstryny do maltozy. Enzym, który katalizuje hydrolizę sacharozy do glukozy i fruktozy oraz uczestniczy w tworzeniu oligosacharydów to inwertaza – inaczej zwana β -fruktofuranosydazą lub sacharazą. W miodach występuje naturalnie również katalaza – enzym rozkładający nadtlenek wodoru, a tym samym zmniejszający wartość inhibicjonową miodu oraz oksydaza glukozowa – enzym utleniający glukozę oraz wpływający na zawartość kwasu glukonowego w miodzie. W miodach występuje także peroksydaza, która katalizuje reakcje utleniania różnych związków nadtlaniem wodoru [17].

Niewielka zawartość witamin w miodzie sprawia, że nie stanowi on istotnego źródła tych składników w diecie człowieka. Wśród witamin wykrytych w omawianym produkcie wymieniane są: B₁ (tiamina), B₂ (ryboflawina), PP (kwas nikotynowy), B₆ (pirydoksyna), B₅ (kwas pantotenowy), H (biotyna), B₉ (kwas foliowy), witamina C oraz filochinon (witamina K), a także śladowe ilości witamin A i D [1].

Przeciętna zawartość związków mineralnych w miodach wynosi $0,02 \div 1,03$ %. Do pierwiastków wykrytych w miodach należą: potas, krzem, sód, żelazo, miedź, mangan, mangan, siarka, nikiel, fosfor, chlor, kobalt, jod, cynk, pallad, arsen, stront, glin, wolfram, ołów, chrom, tytan, bar, molibden, wanad, cyna, srebro. Ilość składników mineralnych w miodzie zależy przede wszystkim od jego rodzaju i odmiany: miody nektarowe zawierają $0,05 \div 0,50$ % składników mineralnych, miody nektarowo-spadziowe – $0,32 \div 0,52$ %, a miody spadziowe najwięcej – ok. 1 % składników mineralnych [1].

Miody zawierają również niewielkie ilości substancji wykazujących działanie hormonalne. Mogą one pochodzić z organizmów pszczoł, a są nimi acetylocholina, cholina lub z roślin – hormon wzrostu. Zawartość acetylocholiny w miodzie wynosi ok. 5 $\mu\text{g/g}$ miodu [17].

Jakość sensoryczna miodów

Na smak i aromat miodu wpływa ok. 50 związków aromatycznych (olejków eterycznych), które pochodzą przede wszystkim z nektaru. Są to lotne substancje, dlatego też ich zawartość maleje podczas ogrzewania i długiego przechowywania. Do związków tych zaliczane są: aldehydy i ketony (aldehydy: mrówkowy, octowy i izomasłowy oraz aceton, diacetyl), związki polifenolowe, estry, wyższe alkohole alifatyczne. Wy-

kazano jednak, że wpływ na smak i aromat słodkiego produktu mają także: kwasy organiczne, aminokwasy, cukry, garbniki, woski, 5-hydroksymetylofurfural – w sumie 100 ÷ 120 substancji [11, 30].

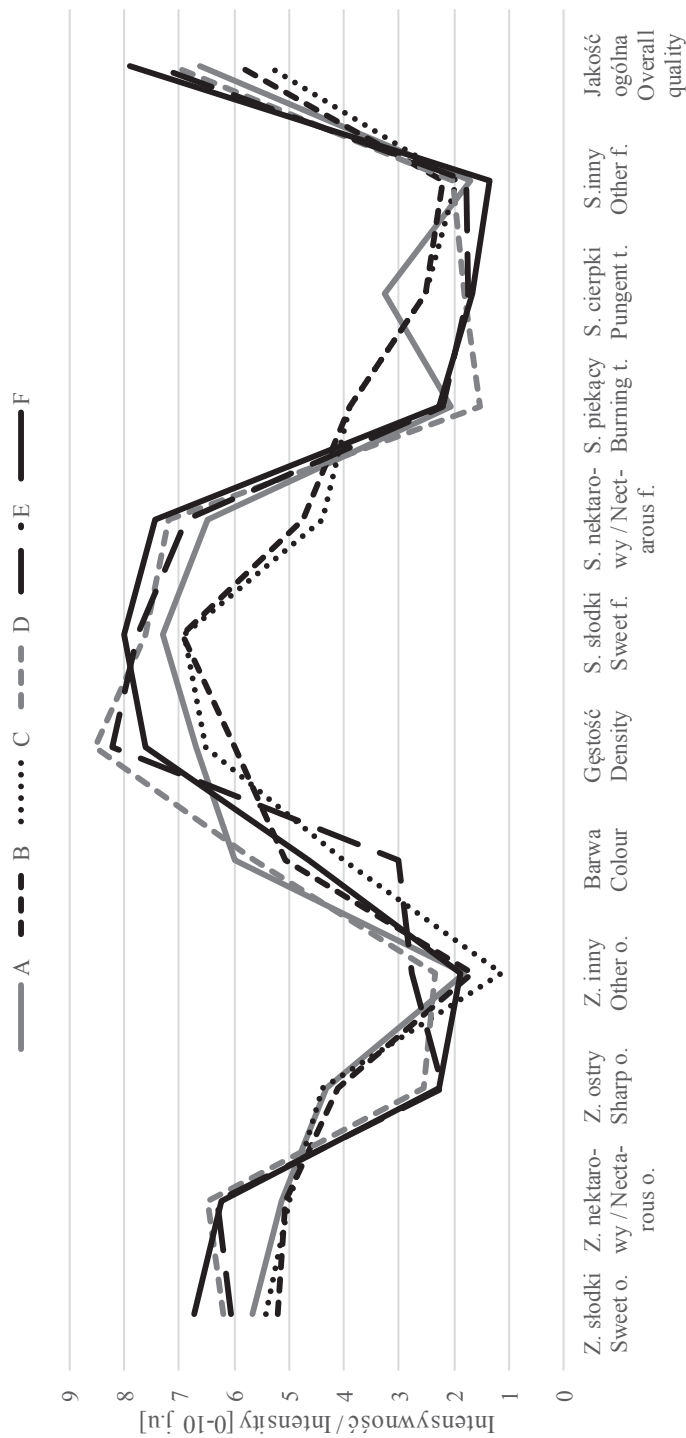
Barwa miodów zależy od zawartości w nich różnych grup barwników. Dotychczas przeprowadzono mało badań nad zawartością tych substancji w miodach. Wykazano jednak obecność karotenoidów (karotenu i ksantofilu), flawonoidów (także związków powstałych przez ich połączenie), chlorofilu oraz antocyjanów. Ponadto na barwę miodu mają wpływ również miodowe koloidy, związki powstałe w wyniku połączenia polifenoli i tanin oraz melanoidy (produkty reakcji cukrów z aminokwasami) [11, 17, 30].

W składzie chemicznym miodu pszczelego wyróżnia się również niewielkie ilości związków azotowych. Zawartość białek w miodach waha się w przedziale 0,25 ÷ 3 % [19]. Wśród obecnych białek występują albuminy, globuliny, peptony oraz nukleoproteidy. Większą zawartością związków azotowych w porównaniu z innymi odmianami miodów charakteryzuje się miód wrzosowy [17].

Pozostałe substancje obecne w miodzie nazywane są domieszkami. Ich zawartość wynosi nie więcej niż 1 %. Wśród nich wyróżnia się: pyłek kwiatowy (ok. 3000 ziaren pyłku w 1 g miodu), mleczko pszczele (0,0001 %), kwasy tłuszczowe (np. kwas arachidonowy), sterole i fosfolipidy [11, 17].

Przedstawiona gama związków powoduje, że miody cechują się unikatową jakością sensoryczną w zakresie zapachu, konsystencji oraz cech smakowych. Wyniki badań własnych dotyczące porównania jakości sensorycznej rynkowych miodów lipowych wskazują, że miody jednogatunkowe mogą różnić się indywidualnie między sobą w zakresie intensywności cech opisujących ich profil sensoryczny (rys. 1).

Jak wynika z badań własnych, próbki wykazywały istotne zróżnicowanie w odniesieniu do ocenianych cech jakościowych, takich jak: jakość ogólna, barwa, gęstość, zapach słodki, miodowy, smak cierpki, miodowy i wyróżnik określany jako „inny”. Przeprowadzona ocena wykazała znaczne różnice w obrębie tej samej odmiany. Brak różnic stwierdzono jedynie w przypadku intensywności smaku słodkiego. Najwyższy niekorzystny wpływ na jakość ogólną miodów stwierdzono w przypadku odczucia cierpkości miodów ($r = -0,948$).



Objaśnienia / Explanatory notes:

z – zapach / o – odour; s – smak / f – flavour, t – taste ; A, B, C – próbki miodów lipowych importowanych / samples of imported linden honey; D, E, F – próbki miodów lipowych krajowych / samples of domestic linden honey.

Rys 1. Porównanie jakości sensorycznej wybranych rynkowych miodów lipowych

Fig. 1. Comparison of the sensory quality of selected market linden honey

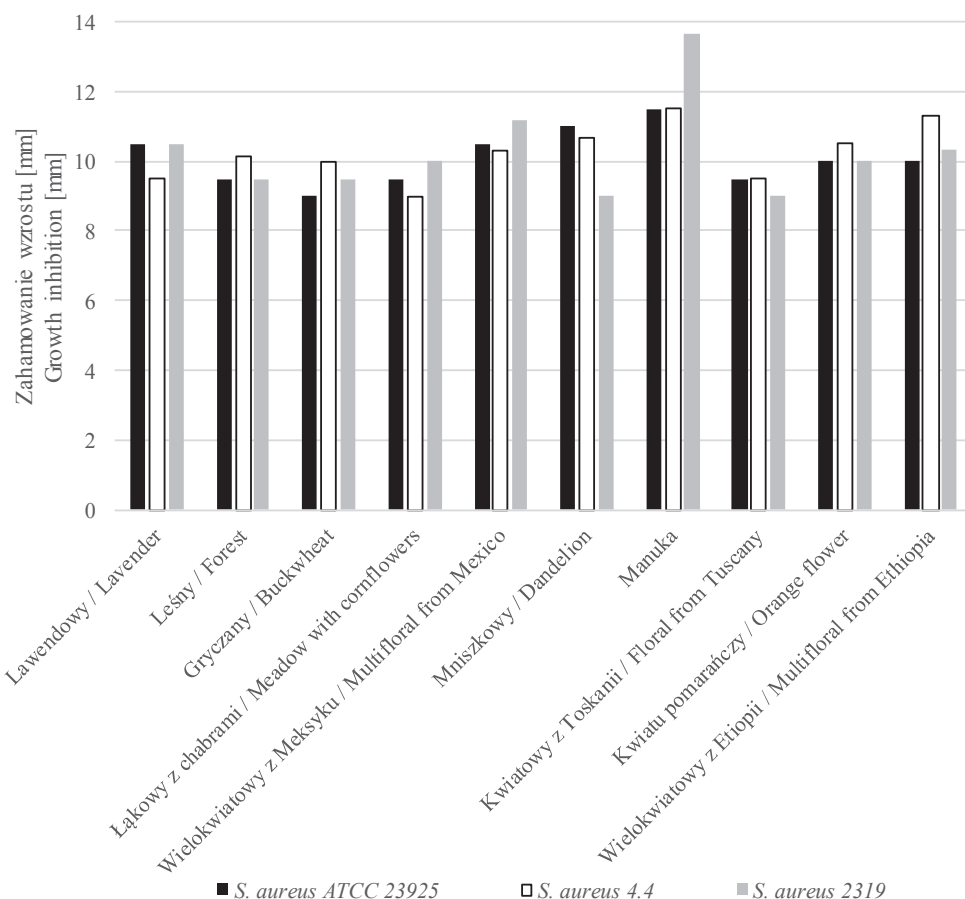
Właściwości prozdrowotne miodu

Najważniejszą cechą miodu jest jego właściwość antybakteryjna wykazywana wobec różnych mikroorganizmów, w tym również patogennych. Poszczególne odmiany miodu charakteryzują się różną aktywnością w tym zakresie. Zawartość związków o charakterze antybiotycznym zależy od wielu czynników: pochodzenia botanicznego miodu, czynników środowiskowych i klimatycznych, a także przebiegu procesu pozyskiwania miodów [8, 28, 30]. Działanie hamujące rozwój drobnoustrojów przez miód jest uwarunkowane obecnością również inhibiny – nadtlenu wodoru, będącego produktem reakcji utleniania glukozy. Innymi związkami zaliczanymi do tej grupy są: tymol, α -bisfenol, garbniki katechinowe, lizozym, cyneol, kanifen, kwas benzoesowy, związki flawonoidowe [17].

Według danych literaturowych najsilniejsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe wykazuje nowozelandzki miód Manuka [4, 24]. Przeciwbakteryjne właściwości miodu związane są z: wysokim ciśnieniem osmotycznym (wynikającym z dużego stężenia cukrów), występowaniem w jego składzie kwasów organicznych, które wpływają między innymi na obniżenie pH produktu, obecnością enzymu oksydazy glukozy, która sama nie ma właściwości antybakteryjnych, ale przez utlenianie glukozy powoduje powstawanie nadtlenu wodoru (inhibiny) oraz z obecnością wielu substancji antybiotycznych, pochodzących z wydzielin pszczoł (np. lizozymu) oraz ze spadzi i nektaru. Znacznie większą aktywnością antybiotyczną charakteryzują się wyciągi z miodu (np. alkoholowe) i jego wodne roztwory, gdyż rozcieńczenie przyspiesza reakcję powstawania bakteriobójczego nadtlenu wodoru [9].

Na rys. 2. przedstawiono wpływ wybranych miodów na trzy szczepy *Staphylococcus aureus* (ATCC 23925, 4.4, 2319). Analizy wykonano metodą dyfuzyjno-krażkową. Zahamowanie wzrostu bakterii przez miód mierzono jako strefę zahamowania wzrostu wokół krążka [mm]. Największą strefę zahamowania wzrostu trzech badanych szczepów *S. aureus* stwierdzono w przypadku miodu Manuka, który najsilniej oddziaływał na szczep *S. aureus* 2319. Miody krajowe wykazywały równie silne oddziaływanie jak miody importowane. Silne działanie antybakteryjne stwierdzono w przypadku miodu mniskowego, wielokwiatowego z Meksyku i lawendowego.

Innym wymienianym mechanizmem działania antybakteryjnego miodu jest obecność w nim bakterii kwasu mlekowego (Lactic Acid Bacteria, LAB). Produktami ich metabolizmu są bakteriocyny oraz kwasy organiczne jako wynik homo- i heterofermentacji. Bakteriocyny są białkami lub kompleksami białkowymi wykazującymi aktywność inhibitującą w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [3]. Inne produkowane przez LAB związki wykazujące działanie bioaktywne to wolne kwasy tłuszczowe, etanol, benzoesan, enzymy, peptydy, antybiotyki [3, 14, 15].



Rys 2. Zahamowanie wzrostu trzech szczepów *Staphylococcus aureus* przez wybrane miody
 Fig. 2. Inhibition of growth of three *Staphylococcus aureus* strains by selected honeys

W badaniach nad wpływem miodu wielokwiatowego na wzrost *Escherichia coli*, w doświadczeniu *in vivo* na szczurach, Shamala i wsp. [23] wykazali, że po 120 h od doustnego podania bakterii ich rozwój został skutecznie zahamowany. Wybrane miody dzięki swoim właściwościom antybakteryjnym przyczyniają się zatem do ochrony przed zakażeniami [11]. Wykazano ponadto, że miód hamuje rozwój bakterii *Helicobacter pylori* [18], które są głównym czynnikiem odpowiedzialnym za powstawanie wrzodów żołądka.

Miody cechują się również silnymi właściwościami przeciwutleniającymi. Jedną z ważniejszych funkcji żywności jest zapewnienie odpowiedniej podaży związków o charakterze przeciwutleniającym, które neutralizując wolne rodniki, wspomagają zachowanie przeciwutleniającej bariery ochronnej ustroju człowieka. Do związków tych

należy zaliczyć przede wszystkim karotenoidy, polifenole, tokoferole i kwas askorbinowy [8, 32]. Powszechność występowania związków fenolowych w świecie roślinnym oraz ich rola i znaczenie w ochronie przeciwutleniającej organizmu człowieka skłoniła naukowców do podjęcia szczegółowych badań na ten temat [13].

Ze względu na właściwości przeciwutleniające związki fenolowe wykazują zdolność regulowania stężenia glukozy i cholesterolu we krwi, dlatego ich spożywanie jest zalecane osobom chorym na cukrzycę. Fenolokwasy mają także inne działania farmakologiczne: żółciopędne (np. kwasy: kawowy, ferulowy i chlorogenowy), przeciwbakteryjne (kwasy: kawowy, wanilinowy, p-kumarowy), hemostatyczne (kwas elagowy) oraz antyseptyczne, ściągające i przeciwpotne (kwas galusowy). Kwasy fenolowe, dzięki właściwościom przeciwutleniającym, zapobiegają również degradacji kolagenu, przez co przeciwdziałają fotooksydatywnym uszkodzeniom skóry [22].

Wilczyńska [30] podaje, że ogólna zawartość polifenoli w krajowych miodach świeżych wahała się w granicach od ok. 35 mg GAE/100 g w miodach rzepakowych do prawie 150 mg GAE/100 g w miodach wrzosowych. Podczas przechowywania ogólna zawartość polifenoli znacznie wzrosła we wszystkich analizowanych próbkach i wynosiła średnio $57 \div 200$ mg GAE/100 g. Autorka wykazała, że pod względem aktywności przeciwutleniającej największą skutecznością neutralizowania wolnych rodników charakteryzowały się miody wrzosowe, których skuteczność sięgała 84 %. Aktywnością przeciwutleniającą przekraczającą 60 % cechowały się próbki miodów lipowych i spadziowych.

W badaniach miodów konwencjonalnych Świetlikowska i wsp. [26] wykazali, że charakteryzowały się one istotnie większą zawartością sumy kwasów fenolowych, a ponadto były także istotnie zasobniejsze w rutynę i D-glikozyd kemferolu (z grupy flawonoidów) w porównaniu z miodami uznanymi za ekologiczne. Natomiast miody określone jako ekologiczne odznaczały się istotnie większą zawartością sumy flawonoidów (w tym luteoliny) w porównaniu z miodami konwencjonalnymi. Wykazano ponadto, że większą zawartością polifenoli oraz aktywnością przeciwutleniającą charakteryzują się miody ciemne – gryczane, wrzosowe oraz spadziowe [30]. Na podstawie istniejącego stanu wiedzy można więc stwierdzić, że związki fenolowe zawarte w miodach mogą wzmacniać naturalne mechanizmy obrony przed szokiem tlenowym i chemicznym. Do flawonoidów wykrytych w miodzie, wspomagających działanie antybiotyczne, należą m.in.: apigenina, kemferol, kwercetyna, hesperydyna, pinocembryna, galangina [9].

Jakość mikrobiologiczna miodu a właściwości probiotyczne

Mikroflora miodu dojrzewającego różni się od mikroflory miodu dojrzałego. Wynika to przede wszystkim z malejącej ilości wody w czasie dojrzewania miodu. W miodach dojrzewających w przewodzie znajdują się bakterie tlenowe pochodzące

w 70 ÷ 75 % z przewodu pokarmowego pszczół, natomiast grzyby pleśniowe i drożdżoidalne (*Saccharomyces* i *Torulopsis*) znajdują się w mniejszości [11]. W dojrzałych miodach najczęściej występują grzyby oraz w niewielkich ilościach przetrwalniki bakterii tlenowych i beztlenowych. W miodach spadziowych dominują grzyby pleśniowe, natomiast w nektarowych – grzyby drożdżoidalne.

Do Gram-dodatniej, fakultatywnie beztlenowej mikroflory komensalnej występującej powszechnie na kwiatach i w przewodzie pokarmowym wielu zwierząt i ludzi zalicza się bakterie kwasu mlekowego wykazujące działanie probiotyczne, polegające na ochronie przed patogenami bakteryjnymi [7, 16, 28].

W 2008 roku Olofsson i Vasquez [15] dokonali identyfikacji mikrobiomu żołądka pszczół *Apis mellifera* na podstawie genu 16S rRNA rodzaju *Lactobacillus*. W analizie filofenetycznej mikrobiomu żołądka pszczół wykazali, że mikroflora składa się z 10 różnych filotypów. Pięć z nich jest blisko spokrewnionych z pierwotnie opisanymi *Lactobacillus kunkeei*, *Bifidobacterium asteroides* i *Bifidobacterium coryneforme*. Kolejne pięć filotypów określono jako najbardziej zbliżone do rodzaju *Lactobacillus*. Trzy z wymienionych 10 filotypów znaleziono w świeżym miodzie. *Lactobacillus kunkeei* występował w największej liczbie 5×10^5 jtk/g miodu podczas zbioru przez pszczoły nektaru z kwiatów malin. Żadnego z tych 3 filotypów wymienieni autorzy nie wykazali w miodzie z kwiatów malin przechowywanym przez 2 miesiące ani jako żywy izolat, ani pozostałość DNA. Pozostałość DNA z jednego szczepu stwierdzono w miodzie lipowym przechowywanym przez 12 miesięcy. Z kolei Asama i wsp. [2] w 2015 r. stwierdzili, że flora bakteryjna żołądka pszczół jest zdominowana przez rodzaj *Gluconobacter* (średnio 64,7 %). Bakterie kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* stanowiły średnio 22,0 %, z czego ponad połowa to *Lactobacillus kunkeei* (57 %), a 28,3 % mikroflory należy do *Lactobacillus insectis*. Wśród mikroflory przewodu pokarmowego pszczół rodzaj *Lactobacillus* stanowił 34,6 %, a *Bifidobacterium* – 21 %. Dominującym gatunkiem LAB przewodu pokarmowego pszczół jest *Lactobacillus insectis* (60,1 %), drugim najliczniej reprezentowanym gatunkiem jest *Lactobacillus kefiranofaciens*, natomiast *Lactobacillus kunkeei* występował w bardzo małej liczbie (0,6 %). Analiza obecności sekwencji genu 16S rRNA bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w produktach pszczelich umożliwiła określenie obecności tych bakterii na poziomie odpowiednio: w miodzie – 90,9 %; w pyłku – 70,6 % i w pierdze – 83,9 %. W produktach pszczelich *Lactobacillus kunkeei* był dominującym gatunkiem – powyżej 98 % [2]. Dowiedziano także, że izolat *Lactobacillus kunkeei* YB38 wspomagał produkcję przeciwciał IgA u ludzi. W badaniach *in vitro* wykazano, że szczepy YB83 oraz YB38 występujące w pyłku pszczelim zwiększały produkcję przeciwciał IgA w komórkach pęczyków Peyera u myszy i przejawiały niewielką aktywność mitogenną. W zależności od gatunku i szczepu *Lactobacillus* działanie immunomodulacyjne może być różne

i szczepy te mogą bezpiecznie poprawić reakcję immunologiczną organizmu człowieka [2].

Zauważono wzajemną zależność pomiędzy obecnością bakterii kwasu mlekowego w przewodzie pokarmowym pszczoł i produktami pszczelimi, które mogą być uznane za żywność fermentowaną [15, 28]. Bakterie LAB znalazły niszę w żołądku pszczoł z dostatkami składników, a w zamian zapewniły owadom ochronę przed szkodliwymi mikroorganizmami. Te odkrycia pozwalają lepiej zrozumieć zagadnienia związane z dobrostanem pszczoł, produkcją i przechowywaniem miodu oraz aspektami wpływu bakterii probiotycznych na zdrowie człowieka [7]. Bakterie kwasu mlekowego wykazują działanie probiotyczne u ludzi i owadów polegające na ochronie przed patogenami bakteryjnymi [7, 28]. Planowano wprowadzenie na polski rynek w 2018 roku preparatów probiotycznych (Nr zgłoszenia P.423363) dla pszczoł, zawierających 12 wyselekcjonowanych szczepów *Lactobacillus kunkeei* i 2 szczepy *Fructobacillus fructosus*. Opracowane preparaty probiotyczne wykazują dużą skuteczność w zapobieganiu i zwalczaniu zakażeń grzybami (*Nosema apis*, *Nosema ceranae*) i bakteriami patogennymi (*Paenibacillus larvae*, *Escherichia coli*, *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella pneumoniae*), powodując zwiększenie odporności i kondycji pszczoł oraz wydłużenie ich życia [16, 18].

Jakość mikrobiologiczna miodu a zagrożenia zdrowotne

Należy zauważyć, że miody mogą stanowić również poważne zagrożenie zdrowotne wynikające z obecności przetrwalników *Clostridium botulinum*. Według Wojtackiej i wsp. [31] miód zanieczyszczony przetrwalnikami *C. botulinum* jest jedną z przyczyn botulizmu dzieci do 1. roku życia. W Europie opisano zakażenia niemowląt miodem zanieczyszczonym przetrwalnikami *C. botulinum*, m.in. w Portugalii, Hiszpanii i we Francji [10, 12, 20]. Niepublikowanie takich doniesień w Polsce może wynikać z braku danych lub nieprawidłowej diagnostyki, ponieważ botulizm niemowląt może być mylony z syndromem nagłej śmierci niemowląt [5].

Częstotliwość występowania przetrwalników laseczek beztlenowych *C. botulinum* w miodzie w dużym stopniu zależy od kraju, z którego pochodzi, a także od regionu geograficznego tego kraju. Wykazano, że najbardziej zanieczyszczony przetrwalnikami *C. botulinum* jest miód z Chin i Argentyny (odpowiednio: 12 i 20 % prób pozytywnych). Obecność przetrwalników stwierdzono w 23 % próbek ze sprzedaży bezpośredniej i w 5 % próbek ze sprzedaży detalicznej, a próby pozytywne wskazywały na obecność 4 ÷ 60 przetrwalników/g miodu. Ze względu na właściwości fizykochemiczne miodu, tzn. niskie pH oraz wysokie stężenie cukrów, nie jest on produktem, w którym mogą kiełkować przetrwalniki *C. botulinum*. Wprowadzone wraz z miodem do przewodu pokarmowego człowieka dorosłego nie kiełkują, nie wytwarzają toksyn i opuszczają jego organizm wraz z kałem, nie wywołując intoksykacji ani innej szkody

dla organizmu, jednak w przypadku niedojrzałego przewodu pokarmowego niemowląt i małych dzieci przetrwalniki znajdują sprzyjające warunki do kiełkowania i wytwarzania neurotoksyny [25].

Podsumowanie

Z przedstawionego przeglądu literatury wynika, że pod względem chemicznym miód stanowi jedną z najbardziej zróżnicowanych substancji. Występują w nim naturalne substancje bioaktywne, bakteriostatyczne czy antybiotyczne. Poszczególne odmiany miodu charakteryzują się różną aktywnością antybakteryjną. Duże znaczenie dla właściwości przeciwdrobnoustrojowych miodu ma obecność w nim bakterii kwasu mlekowego (LAB) *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, głównie ze względu na produkcję bakteriocyn, kwasu mlekowego i octowego a także etanolu, benzoesanu, enzymów. *Lactobacillus kunkeei* jest dominującym gatunkiem w produktach pszczelich, a niektóre jego szczepy wykazują probiotyczne działanie na organizm człowieka. Należy zauważyć, że oligosacharydy pełniące rolę prebiotyczną stanowią ok. 10 % wszystkich cukrów w miodzie. Poza niekwestionowanymi zaletami miodów należy pamiętać o możliwości ich zanieczyszczenia przetrwalnikami *Clostridium botulinum*.

Literatura

- [1] Alvarez-Suarez J., Tulipani S., Romandini S., Bertoli E., Battino M.: Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean J. Nutr. Metabol.*, 2010, 3, 15-23.
- [2] Asama T., Arima T.-H., Gomi T., Keishi T., Tani H., Kimura Y., Tatefuji T., Hashimoto K.: *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *J. Appl. Microbiol.*, 2015, 119, 818-826.
- [3] Aween M.M., Hassan Z., Muhialdin B.J., Noor H.M., Eljamel Y.A.: Evaluation of antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from honey. *Am. J. Appl. Sci.*, 2012, 9 (6), 807-817.
- [4] Bogdanow S.: Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebens.-Wiss. U.-Technol.*, 1997, 30, 748-753.
- [5] Böhnelt H., Behrens S., Loch P., Lube K., Gessler F.: Is there a link between infant botulism and sudden infant death? Bacteriological results obtained in Central Germany. *Eur. J. Pediatr.*, 2001, 160, 623-628.
- [6] Borawska J., Bednarski W., Gołębiewska J.: Charakterystyka sacharydów miodu oraz możliwości zastosowania *Bifidobacterium* do modyfikacji ich składu i właściwości. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, 3 (76), 29-39.
- [7] Forsgren E., Olofsson T.C., Vásquez A., Fries I.: Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*, 2010, 41, 99-108.
- [8] Gheldof N., Wang X.H., Engeseth N.J.: Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 5870-5877.
- [9] Hegazi A., El-Moez S., Abdou A., Allah F.: Antibacterial activity of some types of monofloral honey against *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium perfringens*. *Int. J. Current Microb. Appl. Sci.*, 2014, 3 (9), 552-565.

- [10] Hoarau G., Pelloux I., Gayot A., Wroblewski I., Popoff M.R., Mazuet C., Maurin M., Croizé J.: Two cases of type a infant botulism in Grenoble, France: No honey for infants. *Eur. J. Pediatr.*, 2012, 171, 589-591.
- [11] Kędzia B., Holderna-Kędzia E.: Miód. Skład i właściwości biologiczne. Przeds. Wyd. Rzeczpospolita, Warszawa 2008.
- [12] López-Laso E., Roncero-Sánchez-Cano I., Arce-Portillo E., Ley-Martos M., Aguirre-Rodríguez J., García-Ron A., Mora-Navarro D., Méndez-García M., Camino-León R.: Infant botulism in Andalusia (Southern Spain). *Eur. J. Pediatr. Neurol.*, 2014, 18 (3), 321-326.
- [13] Miranda C.L., Stevens J.F., Ivanow V., McCall M., Frei B., Deinzer M.L., Buhler D.R.: Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48(9), 3876-3884.
- [14] Olofsson T.C., Butler E., Markowicz P., Lindholm Ch., Larsson L., Vasquez A.: Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *Int. Wound J.*, 2014, 13(5), 668-679.
- [15] Olofsson T.C., Vásquez A.: Detection and identification of novel lactic acid bacterial flora within honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr. Microbiol.*, 2008, 57, 356-363.
- [16] Pachla A., Wicha M., Ptaszyńska A.A., Borsuk G., Łaniewska-Trokenheim L., Małek W.: The molecular and phenotypic characterization of fructophilic lactic acid bacteria isolated from the guts of *Apis mellifera* L. derived from a Polish apiary. *J. Appl. Genet.*, 2018, 59(4), 503-514.
- [17] Popek S.: Studium identyfikacji miodów odmianowych i metodologii oceny właściwości fizykochemicznych determinujących ich jakość. Wyd. AE. w Krakowie, Kraków 2001.
- [18] Ptaszyńska A.A., Małek W., Borsuk G., Grzęda M., Wicha M., Pachla A.: Szczepki bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Fructobacillus* wyizolowane z przewodu pokarmowego pszczoł miodnych do zastosowania w zwalczaniu i zapobieganiu chorób pszczoł oraz preparaty probiotyczne na bazie takich szczepów bakterii. Nr zgłoszenia P.423363. 06.11.2017.
- [19] Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 maja 2015 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu. Dz. U. 2015 r., poz. 850.
- [20] Saraiva M., Campos Cunha I., Costa Bonito C., Pena C., Toscano M., Teixeira Lopes T., Sousa I., Calhau A.: First case of infant botulism in Portugal. *Food Control*, 2012, 26, 79-80.
- [21] Sato T.: The nutraceutical benefit: Honey. *Nutrition*, 2000, 16, 468-469.
- [22] Schramm D.D., Karim M., Schrader H.R., Holt R.R., Cardetti M., Keen C.L.: Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 1732-1735.
- [23] Shamala T.R., Shri Jyothi Y.P., Saibaba P.: Antibacterial effect of honey on the *in vitro* and *in vivo* growth of *Escherichia coli*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 18 (9), 863-865.
- [24] Snow M.J., Manley-Harris M.: On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand Manuka honey. *Food Chem.*, 2004, 84, 145-147.
- [25] Sobel J.: Botulism. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, 41, 1167-1173.
- [26] Świątkowska K., Hallmann E., Dłogołęcka K., Rembiałkowska E.: Ocena wartości odżywczej i sensorycznej wybranych miodów pochodzących z produkcji ekologicznej i konwencjonalnej. *J. Res. Appl. Agric. Eng.*, 2011, 56 (4), 161-164.
- [27] Turkmen N., Sari F., Poyrazoglu E.S., Velioglu S.: Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chem.*, 2006, 95, 653-657.
- [28] Vásquez A., Forsgren E., Fries I., Paxton R.J., Flaberg E., Szekely L., Olofsson T.C.: Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *Plos One*, 2012, 7(7), #e33188. DOI: 10.1371/journal.pone.0033188.

- [29] Vela L., de Lorenzo C., Perez R.A.: Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *J. Sci. Food Agric*, 2007, 87, 1069-1075.
- [30] Wilczyńska A.: Jakość miodów w aspekcie czynników wpływających na ich właściwości przeciwutleniające. Rozprawa habilitacyjna. Akademia Morska w Gdyni, Gdynia 2012.
- [31] Wojtacka J., Gomółka-Pawlicka M., Liedtke K., Uradziński J.: Jakość i higiena miodu. *Med. Weter.*, 2014, 70 (12), 719-724.
- [32] Zujko M., Witkowska A., Łapińska A.: Właściwości antyoksydacyjne miodów pszczelich. *Brom. Chem. Toksyk.*, 2005, 38 (1), 7-11.

PROBIOTIC AND PREBIOTIC PROPERTIES OF BEE HONEYS IN TERMS OF THEIR QUALITY AND HEALTH SAFETY

S u m m a r y

The objective of the research study was to review the available reference literature for health benefits of bee honeys including their probiotic and prebiotic properties. Honey is one of the most diverse products in terms of its chemical composition, which includes natural bioactive substances as well as bacteriostatic or antibiotic substances. Honey varieties differ in their activity and antibacterial properties, and Manuka honey is characterized by the strongest properties in this respect. The presence of lactic acid bacteria in honey has also an antibacterial effect. The products of their metabolism are bacteriocins and organic acids as a result of homo- and hetero-fermentation. The honey microflora varies depending on the stage of honey maturity. Honeys during maturation are mainly characterized by the presence of aerobic bacteria, and moulds occur in smaller amounts. In the ripe honeys moulds most often occur. On the basis of the current state of knowledge it can also be said that the phenolic compounds contained in honey have antioxidant properties. In addition to the unquestionable advantages of honey it should be remembered that honey might be contaminated with *Clostridium botulinum* spores.

Key words: honey, sensory features, probiotic properties, prebiotic properties, safety ☒

ELŻBIETA ROSIAK, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, ANTONI GORYL,
MAŁGORZATA JAŁOSIŃSKA, KATARZYNA KAJAK-SIEMASZKO,
MONIKA TRZĄSKOWSKA, DOROTA ZIELIŃSKA, ILONA TWARDOWSKA,
STEFAN RUTKOWSKI, MATEUSZ GEMBA

**SZACOWANIE WZROSTU I PRZEŻYWALNOŚCI BAKTERII
PROBIOTYCZNYCH, PSUJĄCYCH I PATOGENNYCH W ŻYWNOSCI
Z WYKORZYSTANIEM PROGNOSTYCZNEJ BAZY DANYCH
(ProgBaz SGGW)**

Streszczenie

Prognozowanie mikrobiologiczne polega na założeniu powtarzalności odpowiedzi populacji drobnoustrojów na zadane czynniki środowiska produktu żywnościowego. Na podstawie danych empirycznych pochodzących z doświadczeń mikrobiologicznych opracowywane są modele prognostyczne jako programy komputerowe bądź bazy danych dostępne on-line.

Celem pracy było utworzenie bazy danych modeli prognostycznych bakterii potencjalnie probiotycznych, saprofitycznych i patogennych w formie użytecznego dla odbiorcy końcowego narzędzia zainstalowanego na serwerze SGGW pod nazwą ProgBaz SGGW. Materiał do badań stanowiły matematyczne modele wzrostu i przeżywalności bakterii saprofitycznych (psychrotrofów, *Pseudomonas* spp., drożdży i pleśni) i patogennych: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (mikroflory niekorzystnej) oraz potencjalnie probiotycznych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* (mikroflory korzystnej). Modele opracowano w Zakładzie Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie, w latach 1997 - 2008.

ProgBaz jest dostępny na stronie głównej SGGW w Warszawie w zakładce Gospodarka oraz na stronie Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w zakładce Nauka i Usługi. Użytkownik może dokonać oszacowania wzrostu lub przeżywalności drobnoustrojów w czasie pod wpływem czynników środowiskowych (temperatury, poziomu NaCl, poziomu NaNO₂, dodatku inuliny) w następujących produktach: modelowym produkcie z mięsa rozdrobnionego, produktach rynkowych mlecznych, mięsnych i warzywnych. Oprócz prognozy wzrostu możliwe jest uzyskanie informacji na temat cech populacji (λ , μ ,

*Dr inż. E. Rosiak, prof. dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, dr M. Jałosińska, dr inż. K. Kajak-Siemaszko, dr hab. inż. M. Trząskowska, dr inż. D. Zielińska, mgr inż. M. Gemba, 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, dr A. Goryl, Katedra Ekonometrii i Badań Operacyjnych, Wydz. Zarządzania, Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie, ul. Rakowicka 27, 31-510 Kraków, I. Twardowska, S. Rutkowski, Usługi Informatyczne, Warszawa.
Kontakt: elzbieta_rosiak@sggw.pl*

GT, N) oraz w przypadku modelu walidowanego – jakości prognoz. Są to informacje pozwalające oszacować bezpieczeństwo produktu oraz jego termin przydatności do spożycia. ProgBaz może być stosowany do oceny ryzyka mikrobiologicznego żywności, opracowywania planów bezpieczeństwa żywności, ograniczania marnotrawstwa żywności, projektowania nowych produktów oraz stanowić narzędzie edukacyjne i szkoleniowe.

Słowa kluczowe: żywność, prognozowanie mikrobiologiczne, modele prognostyczne, prognostyczne bazy danych, ProgBaz

Wprowadzenie

Mikrobiologia prognostyczna żywności to subdysciplina mikrobiologii pozwalająca na matematyczny opis zachowania populacji mikroorganizmów występujących w żywności [15]. Umożliwia przewidywanie wzrostu, przeżywalności lub inaktywacji mikroorganizmów. Podstawowym założeniem mikrobiologii prognostycznej jest powtarzalność zachowań mikroorganizmów obecnych w żywności oraz możliwość opisanie ich za pomocą zależności matematycznych nazywanych modelami matematycznymi [8, 18].

Właściwości i użyteczność modeli znalazły odzwierciedlenie w prawie żywnościowym Unii Europejskiej. W Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. z późniejszymi zmianami w *sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych* zaleca się, aby w czasie ustalania terminu przydatności do spożycia wykorzystywać modele prognostyczne dotyczące bakterii wskaźnikowych, uwzględniając krytyczne czynniki wzrostu lub przeżywalności drobnoustrojów [15, 16]. Matematyczne modele prognostyczne dostarczają wyników wielokrotnie szybciej niż challenge tests, które polegają na szacowaniu okresu trwałości produktu spożywczego w tych samych warunkach, jakie panują podczas procesu dystrybucji czy przechowywania żywności, na podstawie liczby drobnoustrojów wyznaczających poziom akceptowalny lub poziom zepsucia [1].

Pionierskim programem dostępnym od lat 90. XX wieku, umożliwiającym prognozowanie wzrostu i inaktywacji termicznej/nietermicznej bakterii patogennych jest Pathogen Modeling Program (PMP). PMP opracowany został przez dwa Departamenty Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (USDA): Agricultural Research Service (ARS) i Eastern Regional Research Center (ERRC) [2, 3, 6, 7]. Innymi programami wykorzystywanymi w mikrobiologii prognostycznej są: GroPIN, FISHMAP, FSSP, Sym'Previus, Listeria Meat Model, Dairy Product Safety Predictor. Programy te opracowano dla wybranych szczepów bakterii w konkretnych matrycach żywnościowych. Programy FDA-iRISK i TRiMiCri wykorzystywane są w ocenie ryzyka, natomiast program Microbiol Responses Viewer oszacowuje typ wzrostu drobnoustrojów lub jego brak w różnych matrycach żywnościowych [14, 17]. Programy GlnaFiT, FILTREX, PMM-Lab opracowano w celu generowania mikrobiologicznych modeli

prognostycznych [15]. Programy te stanowią samodzielne narzędzia prognozowania mikrobiologicznego.

W sieci Internet dostępne są: baza ComBase zbierająca publikowane i niepublikowane modele prognostyczne [13] oraz Basaline i MicroHibro opracowane w latach 2011 - 2012, które umożliwiają tworzenie modeli zdefiniowanych przez użytkownika do szacowania wzrostu/inaktywacji drobnoustrojów w żywności [5, 15].

Celem pracy było utworzenie bazy danych modeli prognostycznych bakterii potencjalnie probiotycznych, saprofitycznych i patogennych w formie użytecznego dla odbiorcy końcowego narzędzia zainstalowanego na serwerze SGGW pod nazwą ProgBaz SGGW.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły matematyczne modele wzrostu i przeżywalności bakterii saprofitycznych i patogennych oraz potencjalnie probiotycznych. Modele opracowane zostały w wyniku badań własnych, prowadzonych w Zakładzie Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie, w latach 1997 - 2008, we współpracy z Uniwersytetem Ekonomicznym w Krakowie. Modele zostały opracowane jako element prac doktorskich Małgorzaty Jałosińskiej [9], Elżbiety Kopeć [12], Katarzyny Kajak [10], Moniki Trzaskowskiej [19], Doroty Zielińskiej [20] pod kierunkiem promotorskim prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej we współpracy z dr. Antonim Gorylem. Modele opracowane w przypadku produktów zakażonych bakteriami patogennymi opracowano w wyniku projektu rozwojowego NR12009706/2009. Modele matematyczne weryfikujące skonstruowane wcześniej modele opracowane w przypadku modelowego produktu z mięsa rozdrobnionego opracowano jako wynik dwóch prac magisterskich [4, 11], natomiast modele weryfikujące modele opracowane w przypadku produktów zakażonych bakteriami patogennymi opracowano w wyniku realizacji projektu Inkubator Przedsiębiorczości 11/II+/2017.

W opracowaniu ProgBaz SGGW wykorzystano trzy- lub czteroparametrowe funkcje Gompertza i logistyczną, inne funkcje nieliniowe oraz funkcje wielomianowe (drugiego i trzeciego stopnia). Do weryfikacji modeli zastosowano następujące parametry matematyczno-statystyczne:

- R^2 – współczynnik determinacji (współczynnik regresji - R^2) używany jako ogólna miara dopasowania oszacowanego modelu do danych empirycznych. Współczynnik determinacji jest miarą siły liniowego związku między danymi:
- $R^2 = 1$ – dane leżą dokładnie na "płaszczyźnie" regresji (zmienna jest wyjaśniona w 100 %);
- $R^2 = 0$ – regresja niczego nie wyjaśnia, dane są nieskorelowane;

- $0 < R^2 < 1$ – dopasowanie modelu jest tym lepsze, im wartość współczynnika determinacji jest bliższa jedności;
- MSE – (ang. *Mean Squared Error*) błąd średniokwadratowy jest wartością kwadratu błędu, czyli różnicy pomiędzy estymatorem a wartością estymowaną;
- Af – (ang. *accuracy factor*) czynnik dokładności jest miarą skuteczności prognoz modelu oraz informuje o stopniu dopasowania modelu do krzywej wzrostu/przeżywalności mikroorganizmów, osiąga maksymalną wartość 1;
- Bf – (ang. *bias factor*) czynnik skłonności/nachylenia informuje o ile średnio wartości obserwowane różnią się od przewidywanych:
- Bf < 1 oznacza, że wartości obserwowane są większe od przewidywanych;
- Bf > 1 oznacza, że wartości obserwowane są mniejsze od przewidywanych.

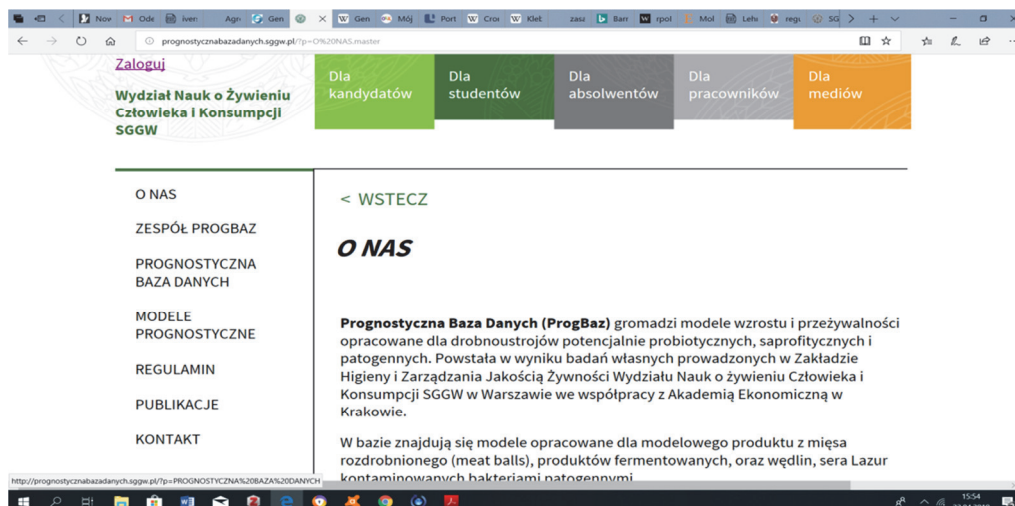
W ramach zrealizowanego projektu Inkubator Innowacyjności+ wyłoniono, w postępowaniu ofertowym, firmę informatyczną Usługi Informatyczne i poddano wizualizacji opracowania matematyczne znajdujące się w plikach MS Excel. Ponadto wykonano i podpięto interfejs zgodny z interfejsem obecnej strony SGGW, opracowano filtrowanie danych i dodano funkcjonalność zmiany istniejących wybranych parametrów wejściowych funkcji oraz stworzono panel użytkownika i administratora. Ostatecznie opracowano bazę w postaci pliku gotowego do umieszczenia na serwerze SGGW w Warszawie w technologii i zasadach Open Source (PHP, jQuery, JavaScript, CSS). W najbliższym czasie zostanie dodana opcja administratora ProgBaz pozwalająca na rejestrowanie liczby użytkowników.

Wyniki i dyskusja

Korzystanie z opracowań ProgBaz SGGW (v. 1.0) jest możliwe na zasadach bezpłatnego dostępu ze strony głównej SGGW w Warszawie, w zakładce Gospodarka www.prognostycznabazadanych.sggw.pl oraz na stronie Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie w zakładce Usługi – www.wnzck.sggw.pl/uslugi/prognostyczna-baza-danych i Nauka – www.wnzck.sggw.pl/nauka/prognostyczna-baza-danych.

W belce górnej (fot. 1) widoczne są zakładki odzwierciedlające Layout strony głównej SGGW oraz znajdujący się w lewym górnym rogu link do strony Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW. Po wejściu na podane wyżej strony uwidaczniają się, z lewej strony, zakładki Prognostycznej Bazy Danych (fot. 1). W zakładkach O NAS, ZESPÓŁ PROGBAZ, REGULAMIN, PUBLIKACJE i KONTAKT użytkownik znajdzie odpowiednio informacje dotyczące możliwości wykorzystania bazy, informacje o autorach bazy modeli prognostycznych, regulaminie dostępu i korzystania z bazy, 11 linków do publikacji pracowników Zakładu Higieny i Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności, dotyczących matematycznego prognozo-

wania w mikrobiologii żywności oraz dane teleadresowe osoby do kontaktu w sprawach dotyczących ProgBaz.



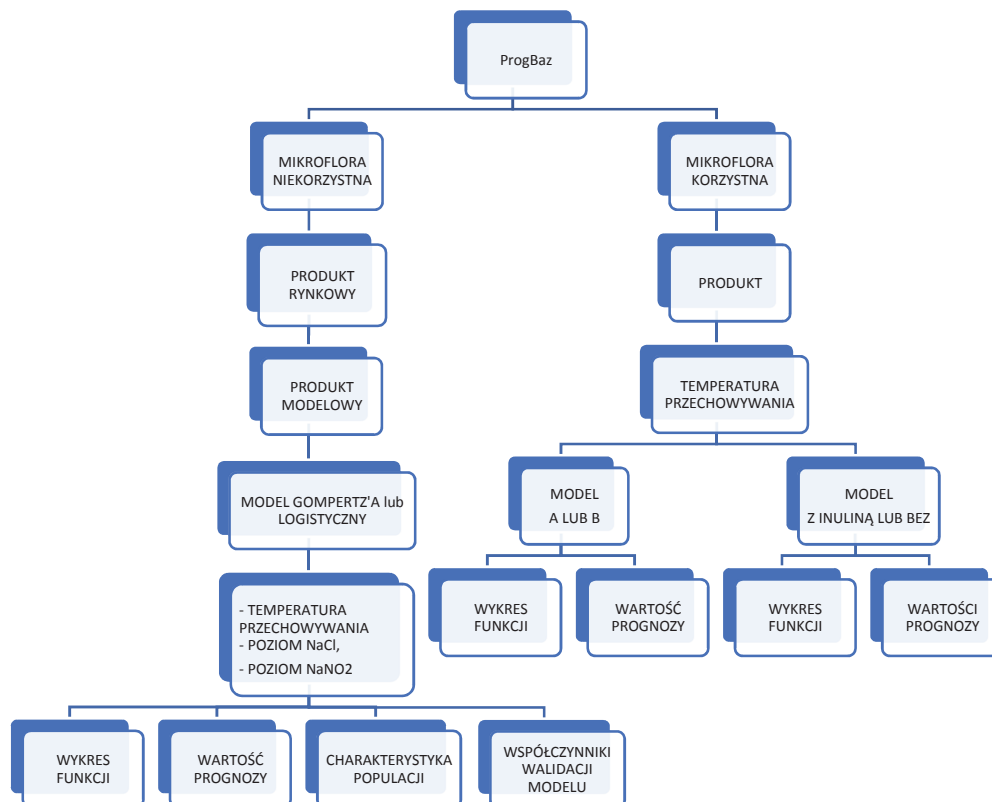
Fot. 1. Print Screen okna z ProgBaz SGGW

Photo 1. Print Screen of the window with ProgBaz SGGW

Wejście do bazy modeli prognostycznych odbywa się na dwa sposoby. Pierwszy polega na wyborze mikroflory: korzystnej lub niekorzystnej, które znajdują się w zakładce PROGNOSTYCZNA BAZA DANYCH (rys. 1). Można też dostać się do bazy modeli prognostycznych poprzez wybór modelu w zakładce MODELE PROGNOSTYCZNE. Do wyboru są modele opracowane w przypadku modelowego produktu z mięsa rozdrobnionego oraz modele opracowane w przypadku konkretnych produktów rynkowych: kielbasy dojrzewającej, kielbasy parzonej drobno rozdrobnionej, pasztetu wieprzowego i sera probiotycznego z przerostem pleśniowym, które kontaminowano znaną koncentracją bakterii patogennych: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis. Ostatnia grupa to modele dotyczące mięsa rozdrobnionego zweryfikowane w żywności na przykładzie befsztyka wołowego, kotleta mielonego, kotleta wieprzowo-wołowego, kotleta wołowego z pieczarką, pulpeta wołowo-wieprzowego, sosu bolognese. Ta grupa modeli będzie w kolejnych wersjach ProgBaz rozwijana i uzupełniana.

W ProgBaz znajdują się modele opisujące wzrost i przeżywalność mikroflory korzystnej, potencjalnie probiotycznej, występującej w fermentowanym napoju sojowym i w fermentowanym soku marchwiowym. W przypadku fermentowanego napoju sojowego po wyborze temperatury przechowywania w zakresie $5 \div 20$ °C można wybrać dwa modele A lub B różniące się rodzajem funkcji matematycznej użytej do opisu

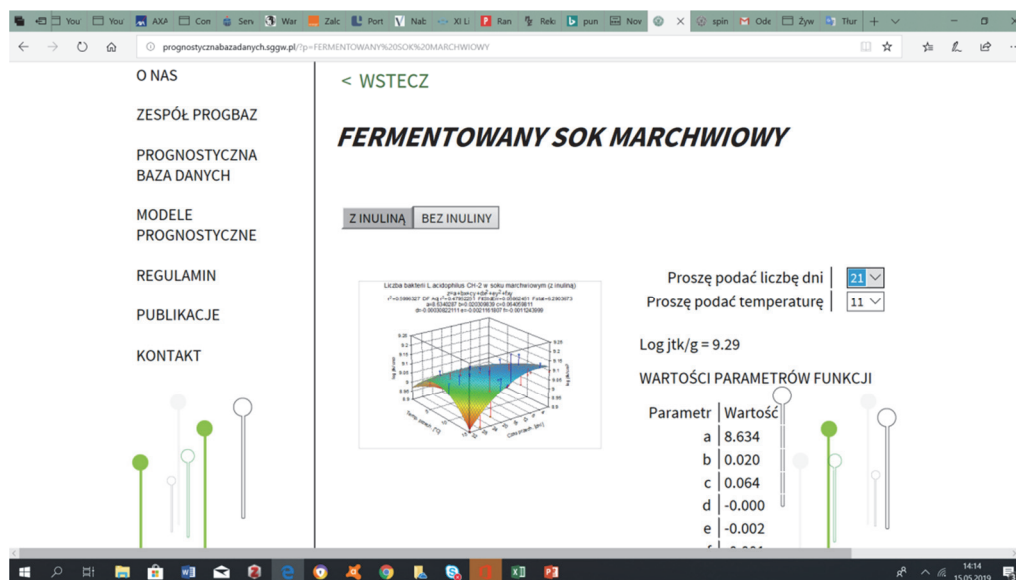
danych otrzymanych z eksperymentu. Eksperyment polegał na ocenie przeżywalności szczepu *Lactobacillus casei* KN291 [log jtk/ml] w napoju sojowym podczas przechowywania w temp.: 5, 10, 15, 20 °C w ciągu 29 dni. Prognoza liczby drobnoustrojów jest możliwa w zakresie 0 ÷ 62 dni i w temp.: 5 ÷ 25 °C.



Rys. 1. Schemat korzystania z modeli prognostycznych w ProgBaz SGGW

Fig. 1. Diagram showing how to use predictive models in ProgBaz SGGW

W przypadku fermentowanego soku marchwiowego eksperyment prowadzono w temp.: 5, 10 i 15 °C, analizy wykonywano co 4 dni w ciągu 0 ÷ 32 dni w każdej z ww. temperatur. Opracowano model wzrostu i przeżywalności *Lactobacillus acidophilus* CH-2 w soku marchwiowym (z dodatkiem i bez dodatku inuliny) w temp.: 0 ÷ 20 °C i w ciągu 0 ÷ 36 dni przechowywania (fot. 2).



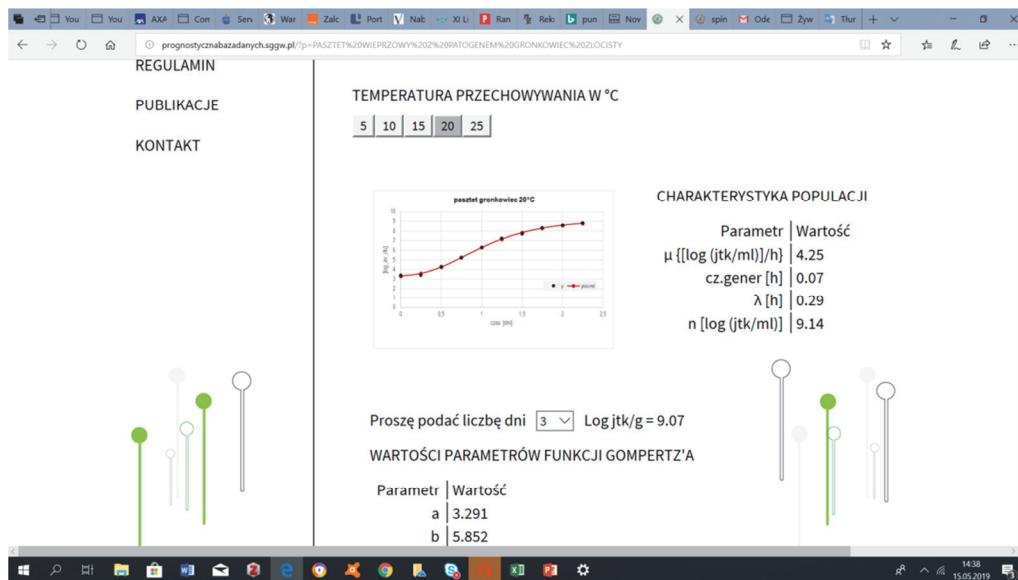
Fot. 2. Prognoza wzrostu *L. acidophilus* CH-2 [log 9,29 jtk/ml] w temp. 11 °C po 21 dniach przechowywania soku marchwiowego z dodatkiem inuliny

Photo 2. Predicting growth of *L. acidophilus* CH-2 [log 9.29 jtk/ml] at 11 °C after 21 day storage of carrot juice with inulin additive

Dostępny model wykorzystuje powierzchnię odpowiedzi opracowaną z zastosowaniem funkcji wielomianowej Gomperta i logistycznej.

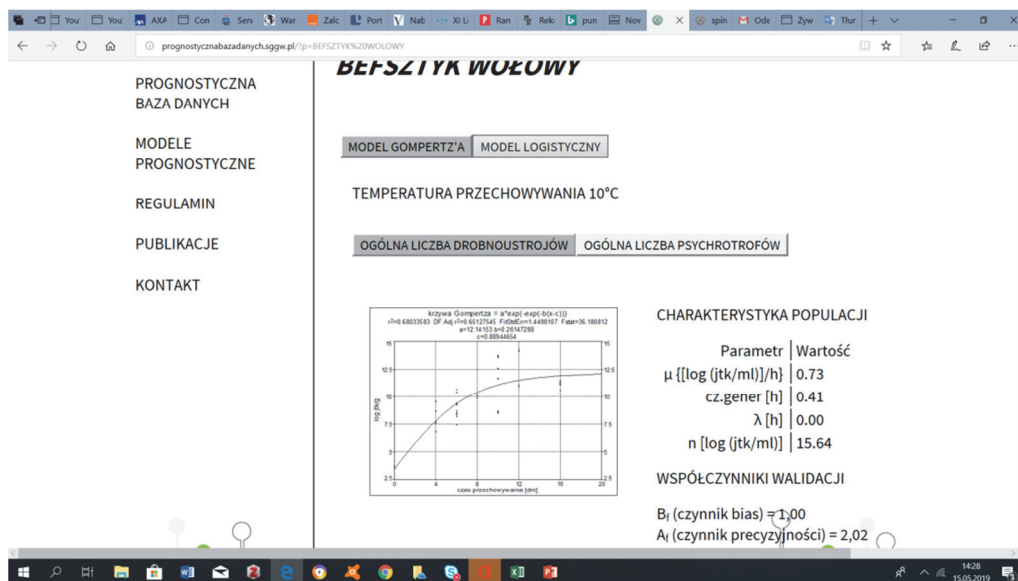
ProgBaz zawiera także modele matematyczne opracowane w przypadku mikroflory saprofitycznej i patogennej: *Pseudomonas* spp., psychrotrofów, drożdży i grzybów pleśniowych oraz *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (produkty kontaminowane). Po wyborze produktu i grupy drobnoustrojów należy wybrać temperaturę przechowywania i/lub inne czynniki determinujące wzrost mikroflory (poziom soli, poziom azotanu sodu). Na podstawie obliczeń matematycznych z zastosowaniem odpowiedniej funkcji matematycznej (widocznej najczęściej na wykresie), zostaną wyświetlone właściwości populacji drobnoustrojów wyrażone jako: długość trwania lag fazy, maksymalne tempo wzrostu w fazie wykładniczej, czas pomiędzy podziałami drobnoustrojów oraz maksymalna gęstość populacji (fot. 3).

Dzięki zastosowaniu powierzchni odpowiedzi możliwe jest uzyskanie ekstrapolowanej liczby drobnoustrojów (poza obszarem danych pochodzących z eksperymentu), natomiast w przypadku modelu opracowanego dla produktu z mięsa rozdrobnionego zweryfikowanego w żywności na przykładzie befsztyka wołowego, kotleta mielonego, kotleta wieprzowo-wołowego, kotleta wołowego z pieczarką, pulpeta wołowo-wieprzowego, sosu bolognese dostępne są parametry matematyczno-statystyczne (R^2 , MSE, Af, Bf) świadczące o jakości prognoz generowanych przez model (fot. 4).



Fot. 3. Prognoza wzrostu gronkowca złocistego (*S. aureus*) w paszcie w temp. 20 °C po trzech dniach przechowywania

Photo 3. Predicting growth of *Staphylococcus aureus* in pâté at 20 °C after 3 day storage



Fot. 4. Walidacja modelu opracowanego w przypadku produktu z mięsa rozdrobnionego na przykładzie befsztyka wołowego przechowywanego w temp. 10 °C

Photo 4. Validation of model developed in the case of minced meat and exemplified by beefsteak stored at 10 °C

Rozwój ProgBaz będzie zależał od nawiązania współpracy z innymi ośrodkami naukowymi, które dysponują opublikowanymi danymi, pozwalającymi na opracowanie modeli matematycznych lub opublikowane modele gotowe do umieszczenia w ProgBaz z odpowiednią afiliacją instytucji i twórców.

Kolejną grupą modeli, która jest opracowywana i zostanie dodana do ProgBaz SGGW są modele produktu z mięsa rozdrobnionego z wykorzystaniem Sieci Neuro-nowych. Niezbędna jest także systematyczna walidacja opracowanych modeli prognostycznych. Walidacja modelu prognostycznego jest ostatnim etapem w procesie tworzenia modelu matematycznego. Modele zwalidowane pozwalają na ocenę zachowania się modeli w nowych warunkach i potwierdzają prawdziwą ich wartość. Walidacja jest także niezbędna do zainteresowania sektora spożywczego korzystaniem z opracowanej bazy danych ProgBaz.

Podsumowanie

Funkcjonalność modeli opracowanych w ProgBaz polega przede wszystkim na dostarczaniu informacji o odpowiedzi wybranych mikroorganizmów na zadane czynniki środowiska. Parametrami opisującymi populację są: lag faza (czas przystosowania się populacji drobnoustrojów do zadanych warunków środowiska, a więc bezpieczeństwa produktu), tempo wzrostu w fazie wykładniczej oraz czas pomiędzy podziałami drobnoustrojów (informujące jak szybko populacja osiągnie wysoki poziom koncentracji). Są to informacje pozwalające oszacować bezpieczeństwo produktu oraz jego termin przydatności do spożycia. W tym kontekście ProgBaz może być wykorzystywana do oceny ryzyka mikrobiologicznego żywności, opracowania planów bezpieczeństwa żywności, do ograniczania marnotrawstwa żywności oraz projektowania nowych produktów. ProgBaz może stanowić także źródło informacji w opracowaniu planu zarządzania ryzykiem oraz stanowić narzędzie edukacyjne i szkoleniowe.

ProgBaz SGGW powstała w wyniku realizacji Programu "Inkubator Innowacyjności +" realizowanego w ramach projektu pozakonkursowego pn. "Wsparcie zarządzania badaniami naukowymi i komercjalizacja wyników prac B+R w jednostkach naukowych i przedsiębiorstwach" w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 (Działanie 4.4).

Umowa Nr MNISW/2017/DIR/36/II+ z dnia 07.03.2017. Decyzja nr 11/II+/2017.

Literatura

- [1] Brucker S., Albrecht A., Petersen B., Kreyenschmidt J.: A predictive shelf life model as a tool for the improvement of quality management in pork and poultry chains. Food Control, 2013, 29, 451-460.

- [2] Butler F., Xu Y.: Prediction of *Staphylococcus aureus* growth in ham during chilling using Pathogen Modeling Program. Biosystem Engineering, 2011, 16, 20-23.
- [3] Devlieghere F., Francois K., Vermeulen A., Debevere J.: Predictive microbiology. In: Predictive Modeling and Risk Assessment. Integrating Safety and Environmental Knowledge into Food Studies towards European Sustainable Development. Ed. R. Costa, K. Kristbergsson. Springer, Boston 2009, pp. 29-53.
- [4] Domańska S.: Weryfikacja modeli prognostycznych opracowanych dla produktów z mięsa wołowego rozdrobnionego. Praca magisterska, SGGW, Warszawa 2007.
- [5] González S.C., Possas A., Carrasco E., Valero A., Bolívar A., Posada Izquierdo G.D., García-Gimeno R.M., Zurera G., Pérez-Rodríguez F.: MicroHibro': A software tool for predictive microbiology and microbial risk assessment in foods. Int. J. Food Microbiol., 2019, 290, 223-226.
- [6] Huang L., Juneja V.K., Yan X.: Thermal inactivation of foodborne pathogens in the USA pathogen modeling program. J. Therm. Anal. Colorim., 2011, 106, 191-198.
- [7] Huang L.: IPMP 2013 – A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. Int. J. Food Microbiol., 2014, 171, 100-107.
- [8] Huang L.: IPMP Global Fit – A one-step direct data analysis tool for predictive microbiology. Int. J. Food Microbiol., 2017, 262, 38-48.
- [9] Jałosińska-Pieńkowska M.: Prognozowanie bezpiecznego okresu trwałości modelowych wyrobów mięsnych gotowych do spożycia. Praca doktorska, SGGW, Warszawa 1999.
- [10] Kajak K.: Prognostyczne modele trwałości mikrobiologicznej solonych i peklowanych produktów mięsnych. Praca doktorska, SGGW, Warszawa 2005.
- [11] Karpińska M.: Weryfikacja modeli prognostycznych opracowanych dla produktów z mięsa rozdrobnionego wołowego. Praca magisterska, SGGW, Warszawa 2007.
- [12] Kopeć E.: Prognostyczne modele zmian mikrobiologicznych w produktach mięsnych. Praca doktorska, SGGW, Warszawa 2003.
- [13] Koseki S.: Microbial responses viewer (MRV): A new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. Int. J. Food Microbiol., 2009, 134, 75-82.
- [14] Plaza-Rodríguez C., Thoens C., Falenski A., Weiser A.A., Appel B., Kaesbohrer A., Filter M.: A strategy to establish Food Safety Model Repositories. Int. J. Food Microbiol., 2015, 204, 81-90.
- [15] Rosiak E., Kajak-Siemaszko K., Trzaskowska M., Kołożyn-Krajewska D.: Prognozowanie w mikrobiologii żywności. Post. Microbiol., 2018, 57 (3), 229-243.
- [16] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz. U. L 338, ss. 1-26, z 22.12.2005.
- [17] Seliwiorstow T., Uyttendaele M., de Zutter L., Nauta M.: Application of TRiMiCri for the evaluation of risk based microbiological criteria for *Campylobacter* on broiler meat. Microb. Risk Anal., 2016, 2 (3), 78-82.
- [18] Szczawiński J.: Mikrobiologia prognostyczna – zastosowanie praktyczne. Med. Weter., 2012, 68 (9), 540-543.
- [19] Trzaskowska M.: Prognostyczne modele wzrostu i przeżywalności bakterii probiotycznych w wybranych produktach żywnościowych. Praca doktorska, SGGW, Warszawa 2006.
- [20] Zielińska D.: Prognostyczne modele przeżywalności bakterii probiotycznych w fermentowanym napoju sojowym. Praca doktorska, SGGW, Warszawa 2008.

ESTIMATION OF GROWTH AND SURVIVAL OF PROBIOTIC, SPOILAGE AND PATHOGENIC BACTERIA IN FOOD USING PROGNOSTIC DATABASE (ProgBaz SGGW)

S u m m a r y

Predictive microbiology is based on the assumption of repeatability of the microbial population response to the given environmental factors of a food product. Based on empirical data from the microbiological experience, predictive models are developed as online available computer software.

The objective of the research study was to develop a database of predictive models of potentially probiotic, saprophytic and pathogenic bacteria in the form of a tool useful for the end customer and installed on the SGGW server under the name of “ProgBaz SGGW”. The study material consisted of mathematical models of growth and survival of saprophytic bacteria (psychrotrophs, *Pseudomonas* spp., yeasts and moulds), pathogenic bacteria: *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes* (disadvantageous micro-flora) and potentially probiotic strains of *Lactobacillus* genus (advantageous micro-flora). The models were developed in the Department of Hygiene and Food Quality Management at the Faculty of Human Nutrition and Consumption Sciences at the Warsaw University of Life Sciences in 1997 - 2008.

ProgBaz is available on the main website of SGGW (Warsaw University of Life Sciences referred to as SGGW) in Warsaw, Economy tab and on the website of the Faculty of Human Nutrition and Consumer Sciences, SGGW, Science and Services tab. The user can estimate the growth or survival of microorganisms over time and affected by environmental factors (temperature, NaCl level, NaNO₂ level, and inulin additive) in the following products: model product made of minced meat, in dairy, meat and vegetable marketable products. In addition, it is possible to acquire information on the characteristics of the population (λ , μ , GT, N) and the quality of predictive value in the case of a validated model. This is the information that makes it possible to estimate the safety of the product and its shelf life. ProgBaz can be used to assess the microbiological risk of food, to develop food safety plans, to reduce food waste, to design new products, and to provide an educational and training tool.

Key words: food, predictive microbiology, predictive models, predictive database, ProgBaz 

ALEKSANDRA OŁDAK, DOROTA ZIELIŃSKA,
DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA

PORÓWNANIE AKTYWNOŚCI ANTAGONISTYCZNEJ WYKAZYWANEJ PRZEZ SZCZEPY BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ WYIZOLOWANE Z RÓŻNYCH RODZAJÓW ŻYWNOSCI TRADYCYJNEJ

Streszczenie

Celem pracy była statystyczna analiza związków pomiędzy źródłem izolacji 66 szczepów bakterii fermentacji mlekowej (LAB), ich przynależnością filogenetyczną do określonego rodzaju i gatunku a wykazywanymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi w stosunku do bakterii *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* i *Escherichia coli*. Analizę przeprowadzono na podstawie danych zebranych w trakcie badań w latach 2014 - 2019, prowadzonych w Zakładzie Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Katedry Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Zebrane dane obejmowały średnice stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów wskaźnikowych obserwowane w metodzie dyfuzyjnej studzienkowej, w której jako czynnik hamujący wykorzystywano pełne hodowle LAB (WBC), bezkomórkowy płyn pohodowlany (CFS) oraz zneutralizowany, traktowany katalazą, płyn pohodowlany (CFN). Spośród analizowanych szczepów LAB najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazywały szczepy gatunku *Lactobacillus plantarum*, a najniższą – *Lb. fermentum*. Szczepy wyizolowane z serów regionalnych (a szczególnie z oscypka) charakteryzowały się największym antagonizmem w stosunku do *L. monocytogenes*, zjawisko to występowało zarówno w WBC, CFS, jak i CFN. Wykazano, że badane szczepy LAB charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, przy czym zróżnicowanie to jest zależne od takich czynników, jak źródło izolacji oraz przynależność filogenetyczna.

Słowa kluczowe: aktywność przeciwdrobnoustrojowa, bakterie fermentacji mlekowej, *Lactobacillus*, żywność tradycyjna, izolowanie

Wprowadzenie

Bakterie fermentacji mlekowej (ang. *Lactic Acid Bacteria*, LAB) to zróżnicowana filogenetycznie grupa mikroorganizmów, których wspólną cechą jest wytwarzanie

Mgr inż. A. Oldak, dr inż. D. Zelińska, 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: aleksandra_oldak@sggw.pl

kwasu mlekowego jako ubocznego produktu beztlenowego procesu oddychania komórkowego. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe LAB są szczepozależne i wynikają przede wszystkim ze zdolności do obniżania wartości pH środowiska [2, 18] poprzez syntezę kwasów organicznych: mlekowego, octowego i propionowego, jak również syntezę nadtlenku wodoru, bakteriocyn oraz związków bakteriocynopodobnych i innych [15].

Hamowanie wzrostu mikroorganizmów niepożądanych w żywności stanowi podstawę technologicznego wykorzystania LAB w procesach zmierzających do wydłużenia trwałości produktów spożywczych [13, 16, 19].

Ze względu na długą tradycję bezpiecznego stosowania wiele rodzajów bakterii należących do LAB zostało wpisanych na listę GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe* – powszechnie uznane za bezpieczne) [5]. Co więcej, w grupie tej znajdują się mikroorganizmy o udowodnionych właściwościach probiotycznych, czyli wykazujące pozytywny wpływ na zdrowie człowieka. Obecnie, gdy konsumenci poszukują żywności minimalnie przetworzonej, ale o możliwie długim terminie przydatności do spożycia, duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem szczepów LAB oraz ich metabolitów w procesie utrwalania żywności. Bogatym źródłem LAB jest żywność fermentowana spontanicznie, która zawiera zróżnicowaną, naturalną mikroflorę. W ostatnich latach, w Polsce i na świecie, prowadzone są liczne badania w zakresie oceny aktywności antagonistycznej LAB w stosunku do drobnoustrojów patogennych. Wciąż trwają poszukiwania kolejnych, naturalnych źródeł izolacji nowych szczepów [1, 7, 13, 16, 19].

Badania prowadzone w latach 2014 - 2019 w Zakładzie Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie potwierdziły, że LAB wyizolowane z różnych rodzajów fermentowanej żywności tradycyjnej wykazują wysoką aktywność antagonistyczną w stosunku do bakterii patogennych, tj. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* i in. [18, 22, 23]. Zaobserwowano, że drobnoustroje z grupy LAB mogą znacznie różnić się między sobą profilem antagonizmu w stosunku do mikroorganizmów wskaźnikowych.

Celem niniejszej pracy była statystyczna analiza związków pomiędzy źródłem izolacji szczepu LAB, jego przynależnością filogenetyczną do określonego rodzaju i gatunku a wykazywanymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi w stosunku do wybranych drobnoustrojów niepożądanych w żywności.

Material i metody badań

Przedmiot badań stanowiły dane zebrane w latach 2014 - 2019 w ramach analiz właściwości przeciwdrobnoustrojowych LAB, wykonanych w Zakładzie Higieny i Zarządzania Jakością Żywności SGGW, opublikowane w recenzowanych czasopiśmie [18, 22, 23]. Dane te obejmowały średnice stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów wskaźnikowych (*L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC

19111, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 10536, *S. enteritidis* ATCC 13076) obserwowane w metodzie dyfuzyjnej studzienkowej, w której jako czynnik hamujący wykorzystywano pełne hodowle LAB (WBC), bezkomórkowy płyn pochowdowlany (CFS) oraz zneutralizowany, traktowany katalazą, płyn pochowdowlany (CFN). Spośród analizowanych 66 szczepów LAB 41 należało do gatunku *Lb. plantarum*, po 9 – do gatunków *Lb. fermentum* i *Pediococcus pentosaceus*, a 7 – do gatunku *Lb. brevis*. Źródłem izolacji szczepów analizowanych w badaniach były sery regionalne – oscypek (17) i ser koryciński (12), fermentowane wyroby mięsne (schab – 6, kielbasa – 8, baleron – 7) oraz serwatka kwasowa (16). Wszystkie oznaczenia były wykonywane w 3 powtórzeniach, co uwzględniono w analizie statystycznej.

Analizy statystyczne prowadzono z użyciem programu Statistica 13.1 (StatSoft, Polska). W celu stwierdzenia statystycznej istotności obserwowanych różnic aktywności antagonistycznej pomiędzy szczepami, gatunkami oraz rodzajami drobnoustrojów a źródłami izolacji, przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Do porównania wartości średnich post hoc zastosowano test HSD Tukeya. Różnicę uznawano za statystycznie istotną przy $p < 0,05$. Na podstawie analizy dyskryminacyjnej wytypowano zmienne, które w najwyższym stopniu determinują różnice pomiędzy przypadkami. Następnie dane poddano wielowymiarowej analizie skupień, a uzyskane zgrupowania oceniono pod względem jednorodności obserwowanego czynnika (gatunek/rodzaj drobnoustroju, źródło izolacji). Badania poszerzono o wielowymiarową analizę czynnikową oraz analizę składowych głównych, aby ocenić wagi i liczbę czynników determinujących zmienność statystyczną w badanej próbie.

Wyniki i dyskusja

W tab. 1. przedstawiono wyniki wielowymiarowego testu istotności (testu Wilksa) dla wszystkich rozpatrywanych czynników determinujących zmienność w grupie.

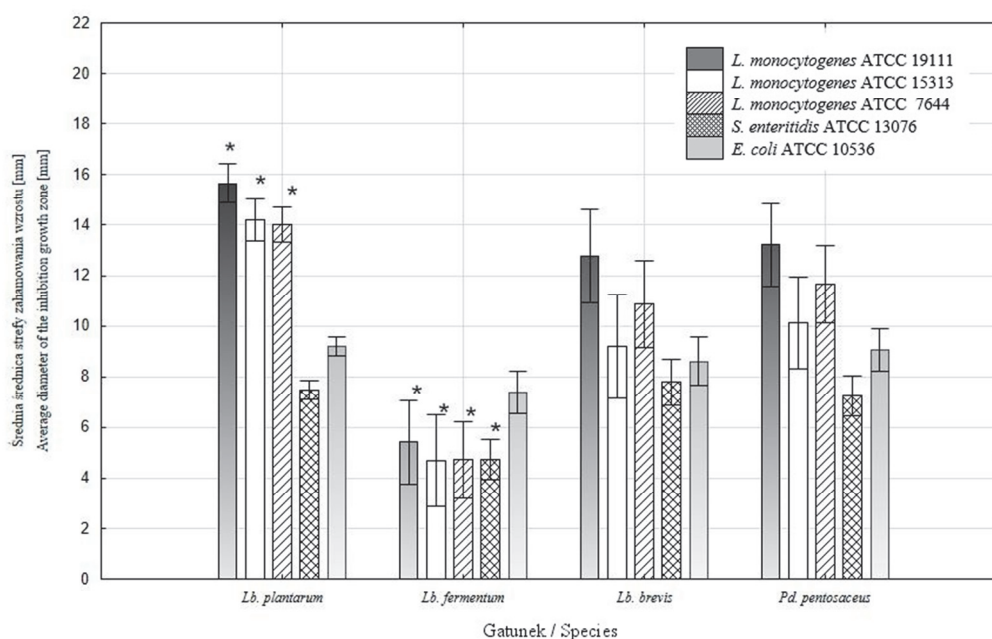
Tabela 1. Wartości charakteryzujące istotność różnic (test Wilksa)

Table 1. Values characterizing the significance of differences (Wilks test)

Czynnik Factor	Wartość Value	F	Efekt df df effect	Błąd df df error	p
Źródło izolacji Source of isolation	0,002	23,05	90	1018,862	0,000000
Rodzaj / Genus	0,817	2,755	15	185	0,000742
Gatunek / Species	0,346	5,194	45	544,427	0,000000
Szczep / Strain	0,000	4,655	990	1832,957	0,000000

Rozpatrywane w analizie czynniki determinowały występowanie różnic statystycznie istotnych pomiędzy obserwowanymi mikroorganizmami. Zmienność w grupie

była w największym stopniu determinowana przez źródło izolacji szczepu. Na rys. 1., 2. i 3. przedstawiono średnice stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów wskaźnikowych, obserwowane dla szczepów w zależności od ich przynależności filogenetycznej i źródła izolacji. Spośród analizowanych szczepów LAB najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazywały *Lb. plantarum*, a najniższą – *Lb. fermentum* (rys. 1).



Objaśnienia / Explanatory notes:

Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments); Znakiem „*” oznaczono różnice statystycznie istotne ($p < 0,01$) pomiędzy gatunkami / Sign „*” indicates statistically significant differences among species ($p < 0.01$).

Rys. 1. Średnice stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów wskaźnikowych [mm] obserwowane dla pełnych hodowli LAB (WBC) w obecności badanych bakterii

Fig. 1. Diameters of the growth inhibition zones of indicator microorganisms [mm], as tracked for whole LAB (WBC) cultures in the presence of tested bacteria

Nie obserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy *Lb. brevis* i *Pd. pentosaceus*. Szczególnie interesująca wydaje się bardzo wysoka aktywność antagonistyczna w stosunku do *L. monocytogenes*, charakteryzująca analizowane szczepy *Lb. plantarum*. Gatunek ten jest jednym z bardziej rozpowszechnionych w środowisku żywności fermentowanej i tradycyjnej. Potencjał przeciwdrobnoustrojowy *Lb. plantarum* wynika z obecności różnych regionów DNA kodujących wytwarzanie bakteriocyn (np. planta-

rycyny), jak również egzopolisacharydów i genów zaangażowanych w metabolizm cukru. Wskazane właściwości sprawiają, że gatunek ten wykazuje duże zdolności adaptacyjne i probiotyczne [8].

Arena i wsp. [4] również obserwowali zdolność istotnego hamowania wzrostu *L. monocytogenes*, a także *E. coli* i *S. aureus*, wykazywaną przez *Lb. plantarum*. Wielu badaczy donosi również o skuteczności antagonistycznej LAB w stosunku do *Listeria* spp., co może być przydatne technologicznie w utrwalaniu żywności gotowej do spożycia czy minimalnie przetworzonej.

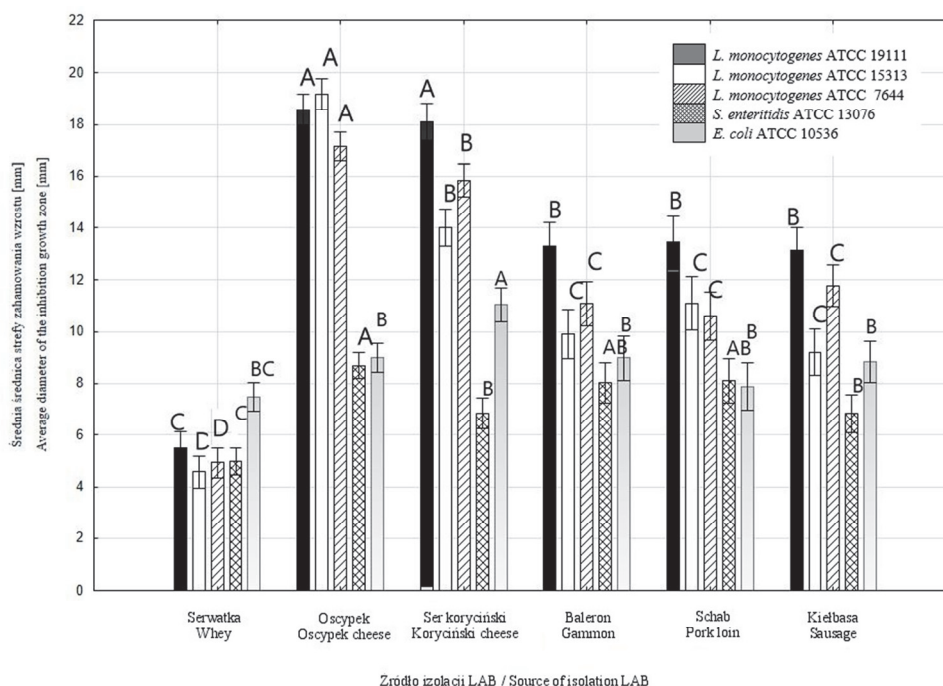
Pomiędzy analizowanymi zgrupowaniami (rodzaje i gatunki badanych bakterii) nie odnotowano różnic w zakresie antagonizmu w stosunku do *E. coli*. Oddziaływanie to można ocenić jako średnie (średnica stref zahamowania wzrostu w zakresie $6,5 \div 10,0$ mm). Aktywność przeciwko *S. enteritidis* również można określić jako średnią (średnice $4,0 \div 8,5$ mm), przy czym była ona istotnie niższa w przypadku *Lb. fermentum* w porównaniu z pozostałymi badanymi rodzajami i gatunkami bakterii. Wielu badaczy donosi o aktywności przeciwdrobnoustrojowej tych gatunków LAB [3, 9, 12, 25].

Po przeanalizowaniu właściwości przeciwdrobnoustrojowych szczepów w zależności od źródła izolacji (rys. 2) wykazano, że szczepy wyizolowane z serów regionalnych (szczególnie z oscypka) charakteryzowały się bardzo wysokim antagonizmem w stosunku do wszystkich badanych szczepów *L. monocytogenes*, szczególnie w przypadku pełnych hodowli LAB. Sip i wsp. [24] stwierdzili, że szczepy wyizolowane z innego sera podhalańskiego – gołki również charakteryzowały się bardzo wysoką aktywnością antagonistyczną w stosunku do *Listeria* sp., a niektóre z nich były zdolne do syntezy bakteriocyn [24]. Szczepy wyizolowane z sera korycińskiego hamowały istotnie najsilniej wzrost *E. coli*. Najniższą aktywność przeciwdrobnoustrojową zaobserwowano w przypadku szczepów wyizolowanych z serwatki kwasowej. Interesujące, że w przypadku tych szczepów ich aktywność antagonistyczna w stosunku do *L. monocytogenes* była niższa niż antagonizm w stosunku do *E. coli*.

Na rys. 3. przedstawiono aktywność przeciwdrobnoustrojową bezkomórkowego płynu pohodowlanego badanych szczepów LAB. Medium to charakteryzowało się słabszymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, w porównaniu z pełnymi hodowlami, ze względu na pozbawienie go żywych komórek bakterii, które mogą wykazywać działanie przeciwdrobnoustrojowe na drodze innych mechanizmów.

Szczególnie zauważalna była niższa aktywność antagonistyczna bezkomórkowego płynu pohodowlanego (CFS) w stosunku do *L. monocytogenes* (zmniejszenie stref zahamowania wzrostu nawet o $4 \div 5$ mm w porównaniu z pełną hodowlą). Zjawisko to może być związane z wyższą zdolnością adaptacyjną *L. monocytogenes* w porównaniu z pozostałymi drobnoustrojami wskaźnikowymi. Ramos i wsp. [20] wykazali po zastosowaniu GC-MS, że supernatant z hodowli *Lb. plantarum* jest wieloskładnikową mie-

szaniną biologicznie aktywną, zawierającą m.in. takie substancje przeciwdrobnoustrojowe, jak kwasy: octowy, bursztynowy, benzoesowy i masłowy, oraz etanol i 5-metylohydantoina [20].



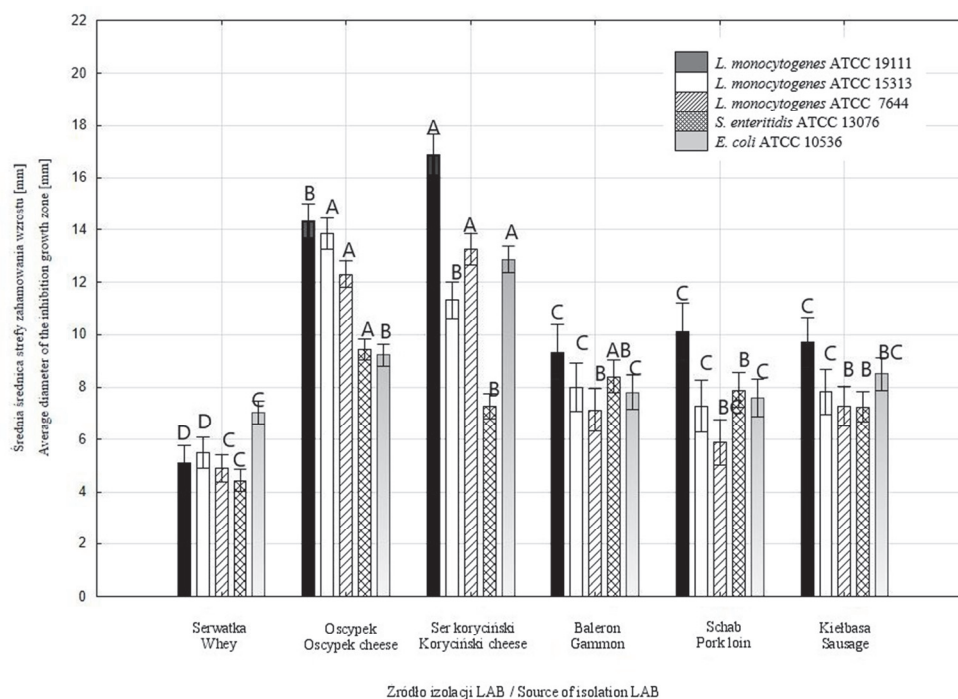
Objaśnienie / Explanatory notes:

A, B, C, D – wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,01$) ze względu na źródła izolacji szczepów / mean values denoted by different letters differ statistically significantly due to strain isolation sources ($p < 0.01$).

Rys. 2. Średnice stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów wskaźnikowych [mm] w zależności od stosowanego źródła izolacji LAB, obserwowane dla pełnych hodowli (WBC) LAB w obecności badanych bakterii

Fig. 2. Diameters of growth inhibition zones of indicator microorganisms [mm] that depend on source of LAB isolation as tracked for whole LAB (WBC) cultures in the presence of tested bacteria

Zastosowanie CFS może być interesującą strategią przedłużania trwałości żywności. Wybrane CFS zawierające substancje chemiczne wytwarzane przez bakterie mogą być skuteczne w hamowaniu patogenów, zwłaszcza tam, gdzie nie ma możliwości dodania żywych drobnoustrojów lub też ich dodatek byłby nieskuteczny, np. w żywności poddanej chłodzeniu, w której *L. monocytogenes* mogłaby się namnażać, a pałeczki kwasu mlekowego – nie [4, 11, 21].



Objaśnienia jak pod rys. 2 / Explanatory notes as in Fig. 2.

Rys. 3. Średnice stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów wskaźnikowych [mm], obserwowane w przypadku bezkomórkowego płynu pochodzącego w obecności badanych bakterii

Fig 3. Diameters of the growth inhibition zones of indicator microorganisms [mm] as tracked for cell-free supernatant in the presence of tested bacteria

W tab. 2. przedstawiono liczbę szczepów w zneutralizowanym i traktowanym katalazą płynie pochodzącym (CFN), pozbawionym żywych komórek bakterii, który wykazywał aktywność antagonistyczną w stosunku do drobnoustrojów wskaźnikowych.

Szczepy, których CFN wykazuje zdolność hamowania wzrostu patogenów, mogą syntetyzować substancje przeciwdrobnoustrojowe aktywne w środowisku o pH neutralnym takie, jak np. bakteriocyny [4]. Zaobserwowano, że w zależności od źródła izolacji zmienny jest udział takich szczepów w całej grupie. Należy dodać, że aktywność antagonistyczna CFN korelowała dodatnio z aktywnością antagonistyczną pełnej hodowli, co potwierdza, że syntetyzowane przez badane szczepy substancje przeciwdrobnoustrojowe zwiększają ich zdolność do konkurencji.

Tabela 2. Liczba szczepów wykazujących aktywność antagonistyczną w zneutralizowanym płynie po-
hodowanym – CFN (średnica strefy zahamowania wzrostu 0,5 ÷ 3,5 mm)Table 2. The number of strains showing antagonistic activity in CFN (diameter of growth inhibition
zone 0.5 ÷ 3.5 mm)

Szczep wskaźni- kowy Indicator strain	Źródło izolacji / Source of isolation					
	Serwatka kwasowa Acid whey	ser regionalny regional cheese		fermentowany produkt mięsny fermented meat product		
		oscypek	koryciński	baleron gammon	schab pork loin	kielbasa sausage
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	2 z 16 2 from 16	17 z 17 17 from 17	0 z 12 0 from 12	1 z 7 1 from 7	2 z 6 2 from 6	0 z 8 0 from 8
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	2 z 16 2 from 16	17 z 17 17 from 17	0 z 12 0 from 12	1 z 7 1 from 7	2 z 6 2 from 6	0 z 8 0 from 8
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	2 z 16 2 from 16	17 z 17 17 from 17	0 z 12 0 from 12	1 z 7 1 from 7	2 z 6 2 from 6	0 z 8 0 from 8
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	2 z 16 2 from 16	17 z 17 17 from 17	0 z 12 0 from 12	1 z 7 1 from 7	0 z 6 0 from 6	1 z 8 1 from 8
<i>E. coli</i> ATCC 10536	2 z 16 2 from 16	17 z 17 17 from 17	8 z 12 8 from 12	2 z 7 2 from 7	0 z 6 0 from 6	1 z 8 1 from 8

Wyniki cząstkowe analizy dyskryminacyjnej danych w zależności od źródła izolacji przedstawiono w tab. 3. Stwierdzono, że niemal wszystkie zmienne determinują zmienność w grupie, co podkreśla znaczenie źródła izolacji LAB dla ich aktywności antagonistycznej.

Zastosowanie analizy dyskryminacyjnej umożliwiło także wykazanie, że największy wpływ na zmienność w grupie ma:

- w zależności od rodzaju LAB – aktywność antagonistyczna wyrażana w stosunku do *L. monocytogenes* ATCC 7644 przez CFS ($p = 0,0089$), *S. enteritidis* ATCC 13076 przez CFS ($p = 0,045$) i CFN ($p = 0,018$), oraz *E. coli* ATCC 10536 przez CFS ($p = 0,011$);
- w zależności od gatunku LAB – aktywność antagonistyczna wyrażana w stosunku do *L. monocytogenes* ATCC 19111 przez WBC ($p = 0,023$), *L. monocytogenes* ATCC 15313 przez WBC ($p = 0,0015$), *L. monocytogenes* ATCC 7644 przez WBC ($p = 0,026$), *S. enteritidis* ATCC 13076 przez CFS ($p = 0,0001$) i CFN ($p = 0,025$).

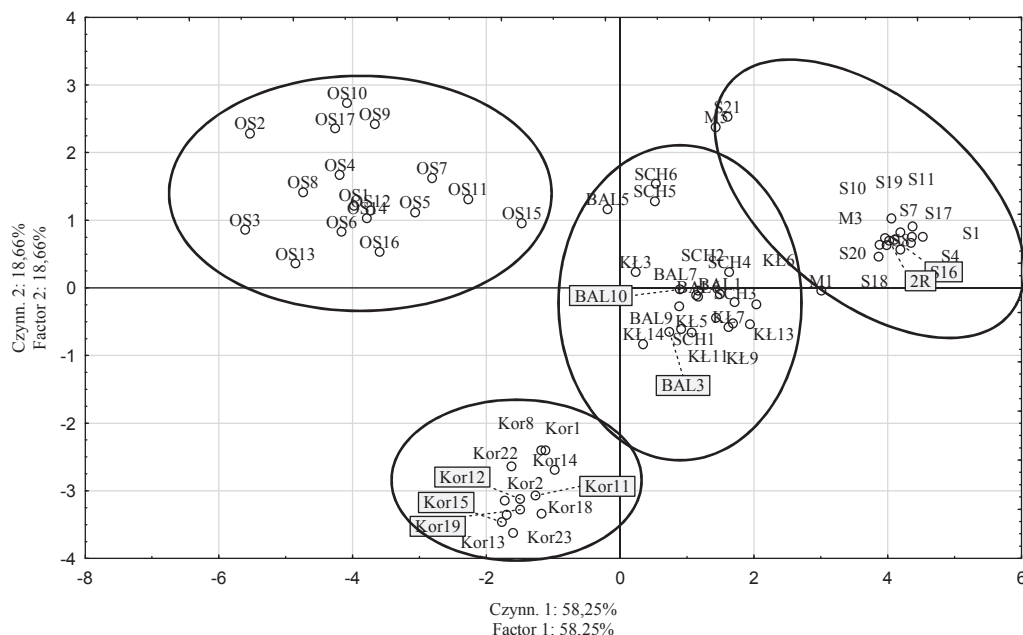
Na podstawie analizy składowych głównych wykazano, że zmienność w grupie w zależności od źródła izolacji determinowana jest przez 15 czynników, przy czym 3 pierwsze określają ją w 84,54 %. Na rys. 4. przedstawiono projekcję przypadków na płaszczyznę 2 czynników. Zaobserwowano utworzenie 4 wyraźnych skupień, grupujących rezultaty otrzymane dla szczepów wyizolowanych z określonych źródeł.

Tabela 3. Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacyjnej w zależności od źródła izolacji szczepu LAB (15 zmiennych, 6 grup)

Table 3. Summary of discriminant function analysis depending on source of isolation of LAB strain (15 variables, 6 groups)

Zmienna / Variable	Lambda Wilksa Wilks' lambda	Częstk. Wilksa Partial. Wilks'	p	Tolerancja Tolerance
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111 (WBC)	0,003664	0,836595	0,000006	0,682182
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111 (CFS)	0,003640	0,842182	0,000010	0,583704
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111 (CFN)	0,003471	0,883035	0,000454	0,529577
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 (WBC)	0,004265	0,718699	0,000000	0,718098
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 (CFS)	0,003183	0,963029	0,238977	0,703903
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 (CFN)	0,003195	0,959499	0,191181	0,552675
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 (WBC)	0,003466	0,884372	0,000511	0,687656
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 (CFS)	0,003519	0,871184	0,000156	0,717403
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 (CFN)	0,003391	0,903851	0,002771	0,498992
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076 (WBC)	0,003281	0,934176	0,031878	0,656707
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076 (CFS)	0,003854	0,795301	0,000000	0,873316
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076 (CFN)	0,003346	0,916187	0,007719	0,791654
<i>E. coli</i> ATCC 10536 (WBC)	0,003488	0,878869	0,000313	0,787461
<i>E. coli</i> ATCC 10536 (CFS)	0,004234	0,723901	0,000000	0,846930
<i>E. coli</i> ATCC 10536 (CFN)	0,003259	0,940461	0,051028	0,820480

Aktywność antagonistyczna wykazywana przez bakterie fermentacji mlekowej zależy od ich zdolności do produkcji takich substancji, jak: kwasy organiczne, nadtlenek wodoru, bakteriocyny, egzopolisacharydy i in. Zależność właściwości przeciwdrobnoustrojowych mikroorganizmów od źródła izolacji jest stosunkowo rzadko przedstawiana w literaturze. Astha i wsp. [17] obserwowali różnice aktywności antagonistycznej szczepów wyizolowanych z różnych źródeł. Synteza pewnych substancji przeciwdrobnoustrojowych (np. bakteriocyn) nie jest prowadzona w sposób ciągły, a może być indukowana przez określone warunki środowiska, w tym przez obecność w środowisku drobnoustroju konkurującego [6, 10, 14]. W związku z tym można przypuszczać, że szczepy wykazujące zdolność syntezy takich substancji mogły mieć kontakt z danym drobnoustrojem wskaźnikowym (lub innym, podatnym na działanie danej substancji przeciwdrobnoustrojowej) w środowisku stanowiącym źródło izolacji LAB. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa szczepów LAB może być także zależna od składu źródła izolacji (zawartość makro- i mikroelementów w produkcie) oraz jego pochodzenia geograficznego. Różne obszary geograficzne charakteryzują się bowiem występowaniem typowej dla siebie puli mikroorganizmów, których cechy funkcjonalne mogą



Objaśnienia / Explanatory notes:

Symbole szczepów przedstawione na rysunku wskazują na źródło izolacji szczepu: / Symbols of strains indicate source of isolation: OS – oscypek / oscypek cheese, Kor – ser koryciński / Koryciński cheese, BAL – baleron / gammon, KL – kiełbasa / sausage, SCH – schab / pork loin, S – serwatka kwasowa / acid whey.

Rys. 4. Projektacja przypadków na płaszczyznę 2 czynników wyjaśniających zmienność w grupie

Fig. 4. Projection of cases on plane of 2 factors to explain variability within group

być warunkowane czynnikami środowiskowymi i technologicznymi. Dalsza analiza produktów fermentowanych, stanowiących bogaty rezerwuar szczepów należących do LAB, może prowadzić do wytypowania źródeł szczególnie obiecujących pod względem otrzymania izolatów o określonych, korzystnych cechach funkcjonalnych, w tym o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Wnioski

1. Spośród analizowanych szczepów LAB najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazywały bakterie gatunku *Lb. plantarum*, a najniższą – *Lb. fermentum*.
2. Szczepy wyizolowane z serów regionalnych (szczególnie z oscypka) charakteryzowały się największym antagonizmem w stosunku do *L. monocytogenes*, a zjawisko to występowało zarówno w WBC, CFS, jak i CFN. Wskazuje to na zdolność badanych szczepów do syntezy substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

- Konieczne są dalsze badania w zakresie oceny i identyfikacji związków chemicznych determinujących właściwości antagonistyczne szczepów, szczególnie w zakresie związków aktywnych w środowisku o pH neutralnym.
3. Na podstawie analizy statystycznej wykazano, że badane szczepy LAB charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, przy czym zróżnicowanie to jest zależne od takich czynników, jak źródło izolacji oraz przynależność filogenetyczna.

Literatura

- [1] Ahmed A.A.: *In vitro* screening of *Lactobacillus* species from homemade yoghurt for antagonistic effects against common bacterial pathogens. *Jordan J. Biol. Sci.* 2013, 6 (3), 211-216.
- [2] Ajao O., Banwo K., Ogunremi O., Sanni A.: Antimicrobial properties and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from raw beef in Ibadan, Nigeria. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2018, 8 (2), 770-773.
- [3] Archer A.C., Prakash M.H.: Probiotic attributes of *Lactobacillus fermentum* isolated from human feces and dairy products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99 (19), 8113-8123.
- [4] Arena M.P., Silvain A., Normanno G., Grieco F., Drider D., Spano G., Fiocco D.: Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Front. Microbiol.*, 2016, 7, #464. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00464.
- [5] Bourdichon F., Casaregola S., Farrokh C., Frisvad J.C., Gerds M.L., Hammes W.P., Harnett J., Huys G., Laulund S., Ouwehand A., Powell I.B., Prajapati J.B., Seto Y., Ter Schure E., Van Boven A., Vankerckhoven V., Zgoda A., Tuijelaars S., Hansen E.B.: Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, 154 (3), 87-97.
- [6] Chanos P., Mygind T.: Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 100 (10), 4297-4308.
- [7] Da Costa W.K.A., de Souza G.T., Brandão L.R., de Lima R.C., Garcia E.F., dos Santos Lima M., de Souza E.L., Saarela M., Magnani M.: Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Res. Int.*, 2018, 108, 172-182.
- [8] Da Silva S.S., Vitolo M., González J.M.D., de Souza Oliveira R.P.: Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res. Int.*, 2014, 64, 527-536.
- [9] Davoodabadi A., Soltan Dallal M.M., Rahimi Foroushani A., Douraghi M., Sharifi Yazdi M.K., Amin Harati F.: Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. *Anaerobe*, 2015, 34, 53-58.
- [10] Gutiérrez-Cortés C., Suarez H., Buitrago G., Nero L.A., Todorov S.D.: Enhanced bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* 147 in co-culture with *Lactobacillus plantarum* LE27 on cheese whey broth. *Front. Microbiol.*, 2018, 9, #2952. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02952.
- [11] Hartmann H.A., Wilke T., Erdmann R.: Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 146 (2), 192-199.
- [12] Klayraung S., Okonogi S.: Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from Miang. *Brazilian J. Microbiol.*, 2009, 40 (4), 757-766.
- [13] Leite A.M.O., Miguel M.A.L., Peixoto R.S.: Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *J. Dairy Sci.*, 2015, 98 (6), 3622-3632.

- [14] Maldonado-Barragán A., Caballero-Guerrero B., Lucena-Adrós H., Ruiz-Barba J.L.: Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* strains with different regulatory operons. *Food Microbiol.*, 2013, 33 (1), 40-47.
- [15] Moračanin-Vesković S.M.V., Dukić D.A., Memiši N.R.: Bacteriocins produced by lactic acid bacteria – a review. *Acta Periodica Technol.*, 2014, 45, 271-283.
- [16] Muruzović M.Ž., Mladenović K.G., Žugić P.T.D., Čomić L.R.: Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditionally made Serbian Cheese and evaluation of their antagonistic potential against *Enterobacteriaceae*. *J. Food Process. Preserv.* 2018, 42 (4), #13577. DOI: 10.1111/jfpp.13577.
- [17] Astha N., Avnish K., Madhusudan H.V., Bhola N.: *In-vitro* screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria against common enteric pathogens. *J. Biom. Sci.*, 2012, 1(4), #2. DOI: 10.3823/1010.
- [18] Oldak A., Zielińska D., Rzepkowska A., Kołożyn-Krajewska D.: Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski cheese. *BioMed Res. Int.*, 2017, #6820369, 1-10. DOI: 10.1155/2017/6820369.
- [19] Perin L.M., Nero L.A.: Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiol.*, 2014, 14 (1), 1-21.
- [20] Ramos A.N., Sesto Cabral M.E., Arena M.E., Arrighi C.F., Arroyo Aguilar A.A., Valdéz J.C.: Compounds from *Lactobacillus plantarum* culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds. *Pharmac. Biology*, 2015, 53 (3), 350-358.
- [21] Rodríguez-Pazo N., Vázquez-Araújo L., Pérez-Rodríguez N., Cortés-Diéguez S., Domínguez J.M.: Cell-free supernatants obtained from fermentation of cheese whey hydrolyzates and phenylpyruvic acid by *Lactobacillus plantarum* as a source of antimicrobial compounds, bacteriocins, and natural aromas. *Appl. Bioch. Biotechnol.*, 2013, 171 (4), 1042-1060.
- [22] Rzepkowska A., Zielińska D., Oldak A., Kołożyn-Krajewska D.: Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2017, 52 (9), 1983-1994.
- [23] Rzepkowska A., Zielińska D., Oldak A., Kołożyn-Krajewska D.: Safety assessment and antimicrobial properties of the lactic acid bacteria strains isolated from polish raw fermented meat products. *Int. J. Food Properties*, 2017, 20 (11), 2736-2747.
- [24] 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.
- [25] Tahlaiti H., Dalache F., Homrani A., Nemmiche S.: Characterization and screening for probiotic potential of Lactic Acid Bacteria isolated from traditionally fermented wheat "Hamoum." *South Asian J. Experiment. Biol.*, 2017, 7 (4), 181-190.

COMPARISON OF ANTAGONISTIC ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM VARIOUS TYPES OF TRADITIONAL FOOD

S u m m a r y

The objective of the research study was a statistical analysis of the correlations between the source of isolation of 66 lactic bacteria (LAB) strains, their phylogenetic affiliation to a specific genus and species, and the verified antimicrobial properties against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*. The analysis was performed based on the data collected during a study project conducted in the Department of Hygiene and Food Quality Management at the 'SGGW' Warsaw University of Life

Sciences in 2014 - 2019. The collected data included the diameters of inhibition zones of the indicator microorganisms as tracked in a well diffusion method, in which the following was used as inhibitory factors: full LAB cultures (WBC), a cell-free supernatant (CFS) and a neutralized, catalase treated cell-free supernatant (CFN). Of the LAB strains analysed, the highest antimicrobial activity was found in the *Lb. plantarum* strains, and the lowest in the *Lb. fermentum* strains. The strains isolated from the regional cheeses (particularly from 'oscypek') were characterised by the greatest antagonism towards *L. monocytogenes*; that phenomenon occurred in WBC, CFS as well as in CFN. It was shown that the LAB strains tested were characterized by diverse antimicrobial properties whereby this diversity depended on the factors such as the source of isolation and phylogenetic affiliation.

Key words: antagonistic activity, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, traditional food, isolation 

LIDIA PIEKARSKA-RADZIK, ELŻBIETA KLEWICKA, JOANNA MILALA,
ROBERT KLEWICKI, NATALIA ROSÓŁ, BOŻENA MATYSIAK,
MICHAŁ SÓJKA, JAROSŁAW MARKOWSKI

WPŁYW POLIFENOLI Z WYTŁOKÓW Z PSEUDOOWOCÓW *ROSA RUGOSA* THUNB. NA WZROST BAKTERII Z RODZAJU *LACTOBACILLUS*

Streszczenie

Polifenole jako metabolity wtórne roślin stanowią podstawową barierę dla mikroflory uznanej za chorobotwórczą i patogenną (wirusy, grzyby, bakterie). Spożywane wraz z pokarmem zdolne są do wywołania wielu pozytywnych efektów w organizmach ssaków (zwierząt i człowieka) oraz ptaków. Przypisuje im się nie tylko właściwości przeciwutleniające, ale także obniżające ciśnienie, przeciwpalne oraz przeciwdrobnoustrojowe. Tym samym niestrawione polifenole docierając do jelit w znacznym stopniu odpowiadają za modulację mikroflory jelitowej (w tym bakterii z rodzaju *Lactobacillus*). Jedną z roślin, która zawiera dużo związków polifenolowych jest *Rosa rugosa* Thunb. – jeden z najpopularniejszych gatunków dzikiej róży występujący na terenie Polski.

Celem pracy była ocena potencjału prebiotycznego ekstraktów polifenolowych surowych i oczyszczonych otrzymanych z wycieków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. w stosunku do bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (w tym szczepów o potwierdzonych właściwościach probiotycznych). Dominującymi grupami polifenoli obecnymi w ekstraktach były elagotaniny i procyanidyny. W ekstraktach stwierdzono również obecność wolnego kwasu elagowego, flawonoli i wolnych katechin. Ponadto ekstrakty oczyszczone charakteryzowały się znacznie większą zawartością polifenoli w porównaniu z ekstraktami surowymi. Przeprowadzono również badania potencjału prebiotycznego zliofilizowanych ekstraktów w stosunku do bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (w tym szczepu *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 o potwierdzonych właściwościach probiotycznych). W badaniach zastosowano metodę turbidymetryczną. Potencjał prebiotyczny w stosunku do bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wykazywały jedynie polifenole w stężeniu 0,156 mg/ml. Powyżej tego stężenia polifenole zawarte w wyciekach z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. działały jako czynnik ograniczający przyrost biomasy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*.

Mgr inż. L. Piekarska-Radzik, prof. dr hab. inż. E. Klewicka, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności. Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, dr inż. J. Milala, dr hab. inż. R. Klewicki, prof. nadzw., mgr inż. N. Rosół, dr inż. M. Sójka, Instytut Technologii i Analizy Żywności, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności. Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź, dr hab. B. Matysiak, prof. nadzw., dr hab. J. Markowski, prof. nadzw., Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice.
Kontakt: lidia.piekarska@edu.p.lodz.pl

Słowa kluczowe: *Lactobacillus* sp., wzrost bakterii, *Rosa rugosa* Thunb., polifenole

Wprowadzenie

Rodzaj *Rosa* (należący do rodziny *Rosacea*) obejmuje 120 - 200 gatunków rozpowszechnionych głównie w strefie umiarkowanej i subtropikalnej na półkuli północnej [2, 16]. Wśród licznych gatunków można wyróżnić m.in. *Rosa rugosa* (znaną również jako róża pomarszczona, karbowana, japońska, fałdzistolista), występującą na terenie południowo-wschodniej Polski, w Japonii, Chinach, na Kamczatce, Sachalinie oraz na Półwyspie Koreańskim [18, 22].

Ze względu na morfologię *Rosa rugosa* zaliczana jest do szczecińsiastych i gęstych krzewów. Osiąga do 2 metrów wysokości. Pędy *Rosa rugosa* pokrywają nierówne kolce oraz włoski. Liście są duże – do 22 cm, szarzielone od spodu i błyszczące z wierzchu [21]. W okresie kwitnienia *Rosa rugosa* wytwarza różowe kwiaty (o różnym natężeniu barwy; niekiedy białe), charakteryzujące się wyraźnym zapachem [29]. Pseudoowoce *Rosa rugosa* są zazwyczaj czerwonej lub szkarłatnej barwy. Przybierają kształt kulisty, butelkowaty lub wydłużony. Wielkością przypominają groch lub orzechy [21]. Wspólną cechą rodzaju *Rosa* jest unikatowy typ reprodukcji. To, co zazwyczaj nazywane jest „owocem róży”, w rzeczywistości stanowi zbiór owoców. Tym samym tworzy tak zwany „pseudoowoc”, w którym twarde orzeszki (będące owocem właściwym) znajdują się wewnątrz mięsistej i barwnej okrywy [2, 3, 21, 30]. Owoce *Rosa rugosa* są powszechnie wykorzystywane w gastronomii i ziołolecznictwie. W związku z dużą zawartością witaminy C w świeżych owocach (1200 ÷ 2500 mg/100 g) przypisuje się im działanie moczopędne, przeciwszkorbutowe i przede wszystkim przeciwutleniające [4]. Ponadto ekstrakty z *Rosa* spp. zawierają dużo związków organicznych, takich jak: karotenoidy, olejki eteryczne, cukry, nienasycone kwasy tłuszczowe, kwasy organiczne. Szeroka gama związków polifenolowych izolowanych z owoców *Rosa rugosa* obejmuje między innymi terpenoidy, fenole, tokoferole, flawonoidy, garbniki i antocyjany [9, 17].

Ekstrakty z *Rosa* spp. wykazują nie tylko dużą aktywność przeciwutleniającą, ale także właściwości: przeciwalergiczne, obniżające ciśnienie, przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne, przeciwwirusowe, przeciwdrobnoustrojowe [25]. Tym samym preparaty z *Rosa* spp. zdolne są do hamowania rozwoju bakterii i grzybów uznanych za patogenne i zanieczyszczające żywność. W literaturze znajdują się doniesienia świadczące o tym, że ekstrakty ograniczają rozwój gatunków, takich jak: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* [31].

Róża jest często stosowana do produkcji olejków eterycznych, kosmetyków, perfum [9]. Liczne przemysłowe zastosowania owoców rodzaju *Rosa* spowodowały, że

w wielu środowiskach może dochodzić do interakcji między polifenolami zawartymi w owocach a mikroorganizmami. Jedną z matryc, która bez wątpienia może łączyć metabolity wtórne roślin oraz bakterie z rodzaju *Lactobacillus* jest żywność [3].

Celem pracy była ocena potencjału prebiotycznego ekstraktów polifenolowych otrzymanych z wytlóków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. w stosunku do bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (w tym szczepów o potwierdzonych właściwościach probiotycznych).

Material i metody badań

Material biologiczny stanowiły 3 szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*: *Lactobacillus acidophilus* LOCK 0928, *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 (szczep o potwierdzonych właściwościach probiotycznych – PL 214504, B1) [10], *Lactobacillus casei* LOCK 0979, które zostały zdeponowane w Kolekcji Czystych Kultur Przemysłowych LOCK105 w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej.

Mrożone wytlóki z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. (Polska Róża, Falenty Nowe) poddawano 0,5-godzinnej ekstrakcji wodnej w stosunku 1 : 2 (v/v). Następnie wytlóki ekstrahowano dwukrotnie statycznie przez 24 h z użyciem 60-procentowego roztworu acetonu lub 60-procentowego etanolu w stosunku 1 : 3 (v/v). Otrzymane ekstrakty etanolowe i acetonowe zatężano w wyparce próżniowej (Hei-VAP Precision, Heidolph, Schwabach, Niemcy). Następnie zatężone ekstrakty acetonowe lub etanolowe dzielono na 2 części. Jedną z nich poddawano oczyszczaniu z użyciem chromatografii kolumnowej na złożu Amberlite XAD 1600 N (kopolimer diwinylobenzenu). Ekstrakty surowe i oczyszczone poddawano suszeniu sublimacyjnemu z użyciem liofilizatora (Christ, Alpha 1-2 LDplus, Osterode am Harz, Niemcy). W otrzymanych liofilizowanych ekstraktach oznaczano zawartość wybranych grup polifenoli: elagotanin, flawonoli i flawanoli z użyciem metod chromatograficznych HPLC opisanych przez Milalę i wsp. [16] oraz Kosmalę i wsp. [12]. Elagotaniny i flawonole oznaczano przy użyciu chromatografu Dionex z detektorem Dionex DAD (Dionex, USA) i kolumną Gemini 5u C18 110A 250 mm × 4,6 mm, 5 µm. Do oznaczania flawanoli stosowano natomiast chromatograf Knauer Smartline (Knauer, Niemcy) z detektorem Knauer UV-Vis P2800 i detektorem Shimadzu RF-10AXL (Shimadzu, Japonia) oraz kolumną Gemini 5u C18 110A 250 mm × 4,6 mm, 5 µm).

Ocenę aktywności oddziaływania potencjalnie prebiotycznego badanych ekstraktów w stosunku do bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wykonywano metodą turbidymetryczną. Analizie poddawano cztery ekstrakty z wytlóków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb.: acetonowy surowy i oczyszczony oraz etanolowy surowy i oczyszczony, o końcowym stężeniu polifenoli w zakresie 0,156 ÷ 0,625 mg/ml. W tym celu zliofilizowane ekstrakty rozpuszczano w mieszaninie wody destylowanej i DMSO (dimetylosulfotlenek; Sigma, USA) w stosunku 1 : 2 (v/v).

Dynamikę wzrostu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w obecności polifenoli zawartych w ekstraktach z wycieków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. prowadzono z wykorzystaniem płytki 96-dółkowej do mikrotestów (Thermo Scientific, USA). W tym celu do studzienki w mikroteście wprowadzano 20 µl 10-krotnie zatężonego podłoża MRS (de Man, Rogosa and Sharpe – MERCK, Niemcy) oraz 170 µl przygotowanych wcześniej płynnych ekstraktów, których stężenie w studzience wynosiło [mg/ml]: 0,156, 0,313 i 0,625. Przygotowane w ten sposób studzienki zaszczepiano 10 µl 24-godzinnej hodowli bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (o gęstości komórek 10^9 jtk/ml). Próby kontrolne zamiast ekstraktów z wycieków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. dopełniano do 200 µl wodą destylowaną. Do dołków wprowadzano również po 170 µl ekstraktów, 20 µl 10-krotnie stężonego podłoża MRS oraz 10 µl podstawowego podłoża MRS. Przygotowane w ten sposób próby posłużyły jako tło metody.

Zaszczepione płytki 96-dółkowe poddawano inkubacji w temperaturze optymalnej do wzrostu badanych mikroorganizmów. Pomiaru absorbancji przy $\lambda = 560$ nm dokonywano w czasie $t = 0, 3, 5, 9, 12, 24, 30, 48$ h za pomocą automatycznego czytnika mikropłytek (TriStar2 S LB 942, Berthold Technologies, Niemcy). Wyniki przedstawiano w postaci współczynnika przyrostu biomasy (ΔA_{560}) obliczonego z równania:

$$\Delta A_{560} = A_{t_n} - A_{t=0}$$

gdzie: $A_{t=0}$ – ilość biomasy użyta do zaszczepienia hodowli, A_{t_n} – ilość biomasy w kolejnych jednostkach czasu.

Uzyskane wyniki badań przedstawiono jako wartości średnie z co najmniej trzech powtórzeń. Poddano je analizie statystycznej za pomocą testu istotności różnic ANOVA z testem post-hoc Kruskala-Wallisa ($p = 0,05$) w przypadku obliczenia współczynnika przyrostu biomasy oraz za pomocą testu ANOVA z testem post-hoc Dunkana ($p = 0,05$) w przypadku określania zawartości polifenoli w ekstraktach. Obliczenia wykonywano w programie Statistica 12 (StatSoft, Polska).

Wyniki i dyskusja

Analiza ilościowa i jakościowa ekstraktów

W tab. 1. przedstawiono skład polifenolowy otrzymanych ekstraktów: surowych i oczyszczonych. Ekstrakty różniły się istotnie zawartością polifenoli, przy czym ekstrakty surowe charakteryzowały się znacznie mniejszą zawartością związków polifenolowych niż ekstrakty oczyszczone. Zawartość polifenoli w ekstraktach surowych wynosiła odpowiednio: 8,8 g/100 g s.m. (ekstrakt etanolowy) i 14,9 g/100 g s.m. (ekstrakt acetonowy), a w ekstraktach oczyszczonych: 29,2 g/100 g s.m. (ekstrakt etanolowy) i 33,2 g/100 g s.m. (ekstrakt acetonowy). W ekstraktach wykazano obecność grupy

związków polifenolowych: kwasu elagowego i elagotanin, flawanoli (procyjanidyn i wolnych katechin) i flawonoli.

Dominującą grupę polifenoli obecną w ekstraktach otrzymanych z wycieków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. stanowiły elagotaniny. Ich udział w zależności od sposobu otrzymania ekstraktu wynosił $52 \div 58$ %. W ekstraktach obecny był również wolny kwas elagowy, którego zawartość nie przekraczała 2 %. Dane literaturowe potwierdzają obecność tej grupy związków w różach. Według Fecka [8] średnia zawartość elagotanin w owocach róży mieści się w zakresie $43 \div 126$ mg/100 g s.m., miąższ owoców róży zawiera ich natomiast $92 \div 248$ mg/100 g s.m. Koponen i wsp. [11] podają natomiast, że zawartość elagotanin w owocach *Rosa rugosa* wynosi do 110 mg/100 g świeżego surowca.

Tabela 1. Skład polifenolowy ekstraktów z wycieków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb.

Table 1. Content of phenolics in extracts obtained from *Rosa rugosa* Thunb. pseudofruit

Związek Compound	Ekstrakt etanolowy, surowy Ethanollic extract, crude	Ekstrakt etanolowy, oczyszczony Ethanollic extract, purified	Ekstrakt acetonowy, surowy Acetone extract, crude	Ekstrakt acetonowy, oczyszczony Acetone extract, purified
	Zawartość związków polifenolowych Polyphenolic compounds content [mg/100 g s.m./d.m.]			
Elagotaniny Ellagitannins	$4714,3^a \pm 53,8$	$15379,7^c \pm 1344,9$	$8649,1^b \pm 727,1$	$17680,9^c \pm 1141,2$
Wolny kwas elagowy Free ellagic acid	$168,1^a \pm 4,5$	$496,6^c \pm 40,1$	$278,7^b \pm 32,4$	$645,8^d \pm 29,8$
Flawonole Flavonols	$357,5^a \pm 71,1$	$993,7^b \pm 105,7$	$603,2^a \pm 55,3$	$978,4^b \pm 142,7$
Procyjanidyny Procyanidins	$3377,5^a \pm 87,6$	$10750,1^c \pm 6,0$	$5144,3^b \pm 35,2$	$12475,5^d \pm 39,5$
Wolne katechiny Free catechins	$196,2^a \pm 12,2$	$1529,6^c \pm 38,5$	$205,5^a \pm 6,9$	$1399,9^b \pm 5,0$
Suma oznaczonych związków polifenolowych Total of measured polyphenolic compounds [g/100 g s.m./d.m.]	8,8	29,2	14,9	33,2

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie $\pm$ odchylenia standardowe / Table shows mean values $\pm$ standard deviation; a - d – wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / mean values denoted by different letters differ statistically significantly ($p \leq 0.05$).

Drugą dominującą grupę związków polifenolowych w otrzymanych ekstraktach stanowiły procyanidyny, których udział wynosił $35 \div 38$ %. Teleszko i wsp. [24] podają, że zawartość polimerów procyanidyn w owocach *Rosa rugosa* przekracza $25600 \mu\text{g/g s.m.}$ W badaniach własnych zawartość glikozydów flawonoli w ekstraktach wynosiła $357 \div 993 \text{ mg/100 g s.m.}$, przy czym udział w ekstraktach surowych był o $40 \div 75$ % mniejszy niż w ekstraktach oczyszczonych. Cunja i wsp. [6] oraz Milala i wsp. [16] wykazują obecność powyższych związków w pseudoowocach róż, a oznaczane zawartości poszczególnych składników wahają się między $41,2 \div 117 \text{ mg/100 g s.m.}$ w zależności od odmiany róż.

Wpływ ekstraktów na wzrost bakterii z rodzaju Lactobacillus

Na przyrost biomasy bakterii *Lb. acidophilus* LOCK 0928 wpływ miało nie tylko stężenie polifenoli zawartych w ekstrakcie z wyłoków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb., ale także sam sposób ekstrakcji. Polifenole zawarte w ekstraktach wodno-etanolowych w stężeniu $0,156 \text{ mg/ml}$ niezależnie od stopnia oczyszczenia ekstraktu miały zdolność do stymulacji stopnia namnożenia biomasy bakterii *Lb. acidophilus* LOCK 0928. Zarówno przy dodatku ekstraktu wodno-etanolowego surowego, jak i oczyszczonego, przyrost biomasy bakterii był o ponad 14 % większy niż w hodowli kontrolnej. Tym samym w hodowlach prowadzonych z dodatkiem polifenoli zawartych w ekstraktach wodno-etanolowych biomasa nie przeszła w fazę zamierania, tak jak w hodowlach kontrolnych. Dodatek polifenoli zawartych w ekstraktach wodno-acetonowych do hodowli bakterii *Lb. acidophilus* LOCK 0928 skutkował natomiast niższym stopniem namnożenia biomasy w porównaniu z hodowlą kontrolną. Polifenole w stężeniu $0,156 \text{ mg/ml}$ zawarte w ekstrakcie wodno-acetonowym surowym dodane do hodowli bakterii *Lb. acidophilus* LOCK 0928 spowodowały, że przyrost biomasy w 12. h inkubacji był wyraźnie mniejszy niż w hodowli kontrolnej (o blisko 20 %). Tym samym bakterie przechodząc w fazę stacjonarną, nie były w stanie namnożyć się do poziomu zbliżonego do hodowli kontrolnej. Z kolei polifenole w stężeniu $0,156 \text{ mg/ml}$ zawarte w ekstrakcie wodno-acetonowym oczyszczonym dodane do hodowli bakterii *Lb. acidophilus* LOCK 0928 przyczyniły się do osiągnięcia przez biomasę fazy stacjonarnej w drugiej dobie. Hodowla z dodatkiem polifenoli w stężeniu $0,156 \text{ mg/ml}$ zawartych w ekstrakcie wodno-acetonowym oczyszczonym osiągnęła podobny poziom do ilości biomasy w hodowli kontrolnej (rys. 1A).

Dwukrotne zwiększenie stężenia polifenoli (do $0,313 \text{ mg/ml}$) spowodowało, że we wszystkich badanych przypadkach stopień namnożenia biomasy był niższy w przypadku hodowli z dodatkiem ekstraktu niż w hodowli kontrolnej. Polifenole w znacznym stopniu wydłużyły czas trwania fazy adaptacyjnej szczepu *Lb. acidophilus* LOCK 0928 (do 5 h). W ciągu kolejnych 2 h inkubacji przyrost biomasy był prawie 10-krotny. W ciągu następnych 13 h biomasa przyrosła 2-krotnie. Stopień namnożenia biomasy

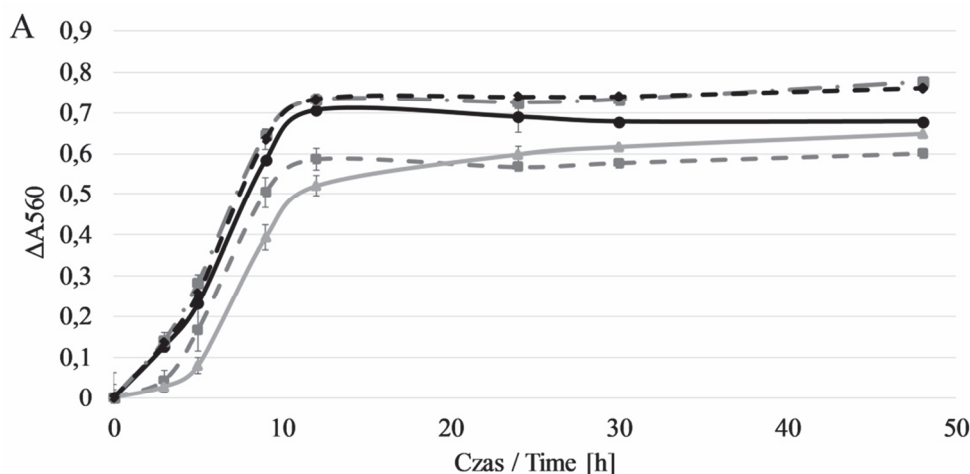
ulegał zwiększeniu do 48 godziny inkubacji. Mimo tego był prawie 2-krotnie mniejszy niż w hodowli kontrolnej (tab. 2).

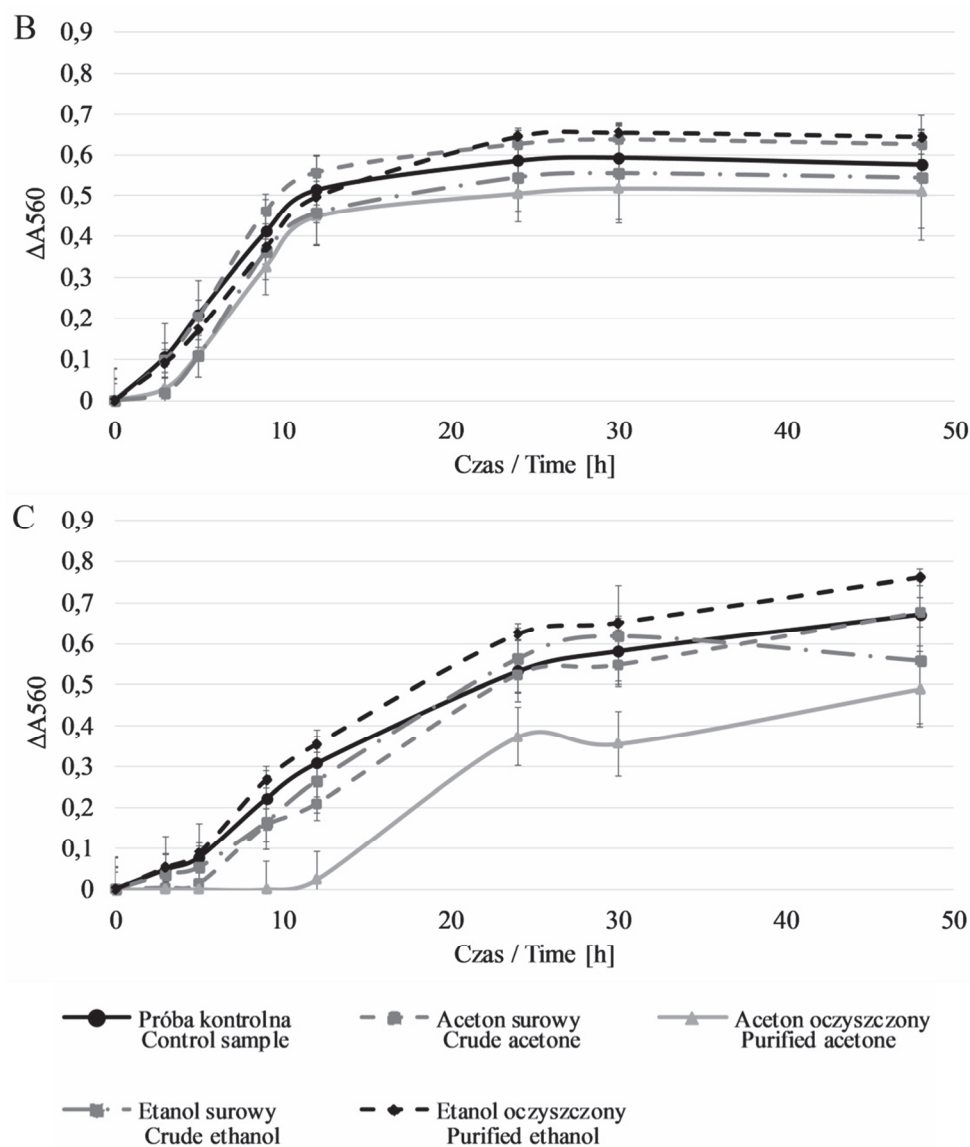
Polifenole w stężeniu 0,625 mg/ml zawarte w ekstraktach z wytlóków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. w znacznym stopniu ograniczyły wzrost bakterii *Lb. acidophilus* LOCK 0928 (tab. 2).

Polifenole w stężeniu 0,156 mg/ml zawarte w ekstraktach z wytlóków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. zarówno stymulowały przyrost biomasy bakterii *Lb. brevis* LOCK 0944, jak i stały się czynnikiem obniżającym stopień namnożenia biomasy w zależności od zastosowanej procedury ekstrakcji. Różnice we wzroście bakterii z dodatkiem ekstraktów z wytlóków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. widoczne były od 12. h prowadzenia hodowli. W 24. h hodowli ekstrakty: wodno-acetonowy surowy oraz wodno-etanolowy oczyszczony spowodowały, że przyrost biomasy był większy o ok. 7 ÷ 10 % niż w hodowli kontrolnej. Z kolei ekstrakty: wodno-acetonowy oczyszczony i wodno-etanolowy surowy przyczyniły się do tego, że biomasa bakterii *Lb. brevis* LOCK 0944 przyrosła na zdecydowanie niższym poziomie (o 6 ÷ 12 %) (rys. 1B).

Dwukrotne podwyższenie stężenia polifenoli (do 0,313 mg/ml) spowodowało, że dodatek ekstraktów wpłynął na obniżenie stopnia namnożenia biomasy w porównaniu z hodowlą kontrolną (tab. 2).

Gdy stężenie polifenoli osiągnęło 0,625 mg/ml bakterie *Lb. brevis* LOCK 0944 nie były zdolne do wzrostu po dodaniu do hodowli ekstraktu wodno-acetonowego oczyszczonego oraz wodno-etanolowego surowego. Poziom namnożenia biomasy z dodatkiem polifenoli (o stężeniu 0,625 mg/ml) zawartych w ekstraktach: wodno-etanolowym oczyszczonym oraz wodno-acetonowym surowym był natomiast ponad 4-krotnie mniejszy niż w hodowli kontrolnej (tab. 2).





Objaśnienia / Explanatory notes:

Na rysunku przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe (w postaci słupków błędów) / Figure shows mean values and standard deviations (presented as error bars).

Rys. 1. Przyrost biomasy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*: A – *Lb. acidophilus* ŁOCK 0928, B – *Lb. brevis* ŁOCK 0944, C – *Lb. casei* ŁOCK 0979 w zależności od dodatku polifenoli w stężeniu 0,156 mg/ml zawartych w ekstraktach z wycieków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb.

Fig. 1. Increase in biomass of *Lactobacillus* bacteria: A – *Lb. acidophilus* ŁOCK 0928, B – *Lb.s brevis* ŁOCK 0944, C – *Lb. casei* ŁOCK 0979 depending on polyphenols added at concentration of 0.156 mg/ml contained in extracts from *Rosa rugosa* Thunb. pseudofruit pomace

Tabela 2. Wzrost bakterii *Lactobacillus* spp. determinowany zawartością polifenoli w ekstraktachTable 2. Growth *Lactobacillus* spp. bacteria dependent on content of polyphenols in extracts

Szczep Strain	Godzina Hour	Przyrost biomasy / Biomass increase [ΔA_{560}]			
		Ekstrakt wodno-acetonowy / Water-acetone extract			
		Surowy / Crude		Oczyszczony / Purified	
		0,321 mg/ml	0,625 mg/ml	0,321 mg/ml	0,625 mg/ml
<i>Lb. acidophilus</i> ŁOCK 0928	3	0,076 ^b ± 0,012	0 ± 0	0,056 ^b ± 0,051	0 ± 0
	5	0,171 ^b ± 0,007	0 ^a ± 0	0,146 ^b ± 0,074	0,076 ^{a,b} ± 0,003
	9	0,481 ^b ± 0,008	0 ^a ± 0	0,488 ^b ± 0,139	0,089 ^{a,b} ± 0,004
	12	0,556 ^b ± 0,005	0 ^{a,b} ± 0	0,575 ^b ± 0,121	0,171 ^{a,b} ± 0,004
	24	0,608 ^b ± 0,005	0,052 ^{a,b} ± 0,012	0,574 ^b ± 0,045	0,213 ^{a,b} ± 0,008
	30	0,635 ^b ± 0,003	0,152 ^{a,b} ± 0,019	0,583 ^b ± 0,043	0,235 ^{a,b} ± 0,009
	48	0,651 ^{a,b} ± 0,004	0,157 ^{a,b} ± 0,008	0,623 ^{a,b} ± 0,004	0,028 ^{a,b} ± 0,008
<i>Lb. brevis</i> ŁOCK 0944	3	0 ± 0	0 ^a ± 0	0 ^b ± 0	0,058 ^{a,b} ± 0,015
	5	0,023 ^{a,b} ± 0,009	0 ^a ± 0	0 ^{a,b} ± 0	0,049 ^{a,b} ± 0,011
	9	0,259 ^{a,b} ± 0,056	0 ^a ± 0	0,043 ^{a,b} ± 0,011	0,052 ^{a,b} ± 0,014
	12	0,348 ^{a,b} ± 0,043	0,039 ^b ± 0,019	0,128 ^{a,b} ± 0,009	0,069 ^b ± 0,012
	24	0,439 ^{a,b} ± 0,018	0,127 ^{a,b} ± 0,005	0,171 ^{a,b} ± 0,009	0,031 ^{a,b} ± 0,017
	30	0,443 ^{a,b} ± 0,017	0,135 ^{a,b} ± 0,001	0,188 ^{a,b} ± 0,025	0,028 ^{a,b} ± 0,018
	48	0,437 ^{a,b} ± 0,016	0,129 ^{a,b} ± 0,005	0,196 ^{a,b} ± 0,009	0,014 ^{a,b} ± 0,013
<i>Lb. casei</i> ŁOCK 0979	3	0 ± 0	0 ± 0	0 ^b ± 0	0 ± 0
	5	0 ± 0	0 ± 0	0 ^b ± 0	0 ± 0
	9	0 ± 0	0 ± 0	0 ^b ± 0	0 ± 0
	12	0 ± 0	0 ± 0	0 ^b ± 0	0 ± 0
	24	0,362 ^{a,b} ± 0,039	0,049 ^{a,b} ± 0,041	0,103 ^{a,b} ± 0,036	0 ^a ± 0
	30	0,392 ^{a,b} ± 0,041	0,119 ^{a,b} ± 0,035	0,124 ^{a,b} ± 0,056	0 ^{a,b} ± 0
	48	0,513 ^{a,b} ± 0,043	0,164 ^{a,b} ± 0,039	0,169 ^{a,b} ± 0,001	0 ^{a,b} ± 0
Szczep Strain	Godzina Hour	Ekstrakt wodno-etanolowy / Water-ethanolic extract			
		Surowy / Crude		Oczyszczony / Purified	
		0,321 mg/ml	0,625 mg/ml	0,321 mg/ml	0,625 mg/ml
<i>Lb. acidophilus</i> ŁOCK 0928	3	0 ^b ± 0	0 ± 0	0 ^b ± 0	0 ± 0
	5	0,066 ^{a,b} ± 0,005	0 ± 0	0 ^{a,b} ± 0	0 ^b ± 0
	9	0,418 ^{a,b} ± 0,005	0 ± 0	0,015 ^{a,b} ± 0,009	0,011 ^b ± 0,009
	12	0,509 ^{a,b} ± 0,003	0,148 ^b ± 0,039	0,149 ^{a,b} ± 0,021	0,085 ^b ± 0,039
	24	0,529 ^{a,b} ± 0,004	0,224 ^{a,b} ± 0,011	0,322 ^{a,b} ± 0,008	0,118 ^{a,b} ± 0,022
	30	0,542 ^{a,b} ± 0,002	0,249 ^{a,b} ± 0,031	0,347 ^{a,b} ± 0,003	0,132 ^{a,b} ± 0,012
	48	0,583 ^{a,b} ± 0,007	0,222 ^{a,b} ± 0,035	0,389 ^{a,b} ± 0,003	0,161 ^{a,b} ± 0,012
<i>Lb. brevis</i> ŁOCK 0944	3	0 ± 0	0 ± 0	0,058 ^b ± 0,039	0 ^b ± 0
	5	0 ^{a,b} ± 0	0 ± 0	0,154 ^{a,b} ± 0,039	0 ^b ± 0
	9	0,135 ^{a,b} ± 0,024	0 ^a ± 0	0,365 ^{a,b} ± 0,024	0,102 ^{a,b} ± 0,015
	12	0,205 ^{a,b} ± 0,023	0 ^{a,b} ± 0	0,456 ^{a,b} ± 0,021	0,182 ^{a,b} ± 0,017

	24	0,269 ^{a,b} ± 0,017	0 ^{a,b} ± 0	0,496 ^{a,b} ± 0,012	0,202 ^{a,b} ± 0,024
	30	0,269 ^{a,b} ± 0,018	0 ^{a,b} ± 0	0,483 ^{a,b} ± 0,018	0,205 ^{a,b} ± 0,023
	48	0,236 ^{a,b} ± 0,021	0 ^{a,b} ± 0	0,503 ^{a,b} ± 0,026	0,183 ^{a,b} ± 0,023
<i>Lb. casei</i> ŁOCK 0979	3	0 ± 0	0 ± 0	0,058 ^b ± 0,039	0 ^b ± 0
	5	0 ^a ± 0	0 ± 0	0,051 ^{a,b} ± 0,008	0 ± 0
	9	0 ^a ± 0	0 ± 0	0,272 ^{a,b} ± 0,028	0 ± 0
	12	0 ^a ± 0	0 ± 0	0,391 ^{a,b} ± 0,021	0 ± 0
	24	0 ^{a,b} ± 0	0 ^b ± 0	0,544 ^{a,b} ± 0,008	0,008 ± 0,07
	30	0 ^{a,b} ± 0	0 ^{a,b} ± 0	0,567 ^{a,b} ± 0,013	0,055 ^{a,b} ± 0,019
	48	0 ^{a,b} ± 0	0 ^{a,b} ± 0	0,567 ^{a,b} ± 0,017	0,143 ^{a,b} ± 0,021

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Polifenole w stężeniu 0,156 mg/ml zawarte w ekstraktach z wycieków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. oddziaływały również dwójako na przyrost biomasy bakterii *Lb. casei* ŁOCK 0979 – stymulowały ten przyrost lub były czynnikiem obniżającym stopień namnożenia biomasy w zależności od zastosowanej procedury ekstrakcji. Różnice we wzroście bakterii z dodatkiem ekstraktów z wycieków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. widoczne były od początku prowadzenia hodowli. W 24 godzinie hodowli ekstrakt wodno-etanolowy oczyszczony spowodował, że przyrost biomasy był większy o ok. 16 % w stosunku do hodowli kontrolnej. Z kolei ekstrakty: wodno-acetonowy surowy i wodno-etanolowy surowy w stężeniu 0,156 mg/ml nie wpływały znacząco na przyrost biomasy bakterii *Lb. casei* ŁOCK 0979. Polifenole zawarte w ekstrakcie wodno-acetonowym oczyszczonym do 12 godziny hodowli hamowały przyrost biomasy bakterii *Lb. casei* ŁOCK 0979. Po 48-godzinnej inkubacji stopień namnożenia biomasy w hodowli z dodatkiem ekstraktu był niższy o ok. 30 % (rys. 1C).

Zastosowanie dwukrotnie wyższego stężenia polifenoli (0,313 mg/ml) w ekstrakcie wodno-etanolowym oczyszczonym nie wpłynęło znacząco na wzrost bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979. W przypadku pozostałych trzech badanych ekstraktów polifenole w nich zawarte wpłynęły na ograniczenie przyrostu biomasy bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979. Stopień namnożenia biomasy był o ok. 24 % mniejszy przy stosowaniu dodatku ekstraktu wodno-acetonowego surowego i o ok. 33 % mniejszy – w obecności ekstraktu wodno-acetonowego oczyszczonego. Z kolei ekstrakt wodno-etanolowy surowy o stężeniu polifenoli 0,313 mg/ml uniemożliwił wzrost bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979 (tab. 2).

Przy stężeniu polifenoli na poziomie 0,625 mg/ml każdy z czterech ekstraktów z wycieków *Rosa rugosa* Thunb. uniemożliwił rozwój bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0979.

Mimo że większość polifenoli spożywanych wraz z pokarmem roślinnym zostaje bezpośrednio wchłonięta po zjedzeniu, duża część wtórnych metabolitów roślin trafia

do jelit, gdzie w znacznym stopniu odpowiada za modulację mikroflory. Wśród grupy polifenoli, które wywierają wpływ na mikroflorę jelitową ssaków wyróżnia się: polifenole glikozyłowane ramnozą, estry kwasu hydroksycynamonowego, lignany, czy procyanidyny [1]. Ponadto bakterie jelitowe zdolne są do metabolizmu polifenoli, takich jak flawan-3-ol i mogą być czynnikiem wpływającym na powstawanie nowych związków fenolowych („*in situ*”) – niekiedy cechujących się wyższą biodostępnością niż substraty, z których zostały utworzone [19].

W badanych ekstraktach oznaczono zawartość procyanidyn i wolnych katechin, które uznawane są za polifenole wpływające na mikroflorę jelit. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* są typowymi przedstawicielami mikroflory: jamy ustnej, żołądka, jelita czczego i krętego, dwunastnicy oraz okrężnicy. Tym samym możliwe jest, aby niestrawione polifenole docierające do poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego człowieka w znacznym stopniu wpływały na stopień namnożenia bytujących w nim bakterii. Niemniej jednak odpowiedź bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jest zazwyczaj cechą szczepową. Zależy również od grupy związków polifenolowych oraz ewentualnych uzdolnień metabolicznych bakterii.

Niewchłonięte polifenole mogą działać jak aktywatory bądź inhibitory wybranych grup mikroorganizmów. W zależności od struktury (podstawniki pierścieni aromatycznych) i stężenia mogą selektywnie hamować rozwój patogenów, a stymulować wzrost bakterii komensalnych – w tym także szczepów uznanych za probiotyczne [5, 14, 15]. Z wielu badań przeprowadzonych na mikroflorze jelitowej człowieka i ssaków (szczurów, świń) wynika, że polifenole mają korzystny wpływ na wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [7, 26, 27, 28]. Rodríguez i wsp. [20] w swoich badaniach przedstawili aktywność enzymatyczną bakterii *Lactobacillus plantarum*, dzięki której możliwe jest degradowanie niektórych związków polifenolowych. Landete i wsp. [13] dowiedli, że *Lactobacillus brevis* wykazuje aktywność syntezy dekarboksylazy kwasu fenolowego. Z kolei Tabasco i wsp. [23] wykazali, że flawan-3-ol izolowany z nasion winogron w stężeniu 1 mg/ml oraz 0,5 mg/ml w znacznym stopniu ogranicza wzrost bakterii *Lactobacillus gasseri* LC9, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 i *Lactobacillus fermentum* PNA1. Co ciekawe, flawan-3ol izolowany z pestek winogron w stężeniu 0,25 mg/ml może stać się czynnikiem obniżającym stopień namnożenia biomasy bakterii: *Lactobacillus casei* LC-01 i *Lactobacillus plantarum* CIC17, a jednocześnie jest zdolny do stymulacji wzrostu bakterii *Lactobacillus casei* IFPL7190 i *Lactobacillus plantarum* CLB7. Niekiedy również flawon-3-ol izolowany z pestek winogron zupełnie nie wpływa na stopień namnożenia biomasy bakterii takich, jak *Lactobacillus bulgaricus* LBY-27. Tym samym można zauważyć, że odpowiedź bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na dodatek do podłoża hodowlanego polifenoli izolowanych ze środowiska naturalnego jest cechą indywidualną (zależną od gatunku, a nawet szczepu badanych bakterii).

Na wzrost bakterii fermentacji mlekowej w dużej mierze wpływ mogły mieć różne grupy polifenoli zawarte w ekstraktach. Nawet niewielkie różnice w składach ekstraktów oraz stężeniach polifenoli powodowały, że reakcja bakterii z rodzaju *Lactobacillus* była odpowiedzią szczepową. Dalsza analiza interakcji między polifenolami zawartymi w wyciekach z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb. a bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* powinna dotyczyć badania różnic we wzroście bakterii w zależności od stężenia polifenoli w podłożu hodowlanym. Tym samym zostałaby określona aktywność metaboliczna badanych szczepów bakterii *Lactobacillus* sp.

Wnioski

1. Duża zawartość związków polifenolowych w otrzymanych ekstraktach z wycieków z róży potwierdza, że wycieki te mogą stanowić wartościowy surowiec do pozyskiwania tej grupy związków.
2. Ekstrakty, które dodatkowo poddano oczyszczaniu techniką chromatografii kolumnowej, zawierają więcej wybranych grup związków polifenolowych niż ekstrakty surowe, zliofilizowane z pominięciem tego etapu.
3. Stężenie polifenoli na poziomie 0,156 mg/ml ma prebiotyczny wpływ na bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, natomiast polifenole w stężeniu powyżej 0,156 mg/ml, zawarte w ekstraktach z wycieków z pseudoowoców *Rosa rugosa* Thunb., działają jako czynnik ograniczający rozwój bakterii z rodzaju *Lactobacillus*.
4. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wykazują wyższą zdolność do tolerancji polifenoli obecnych w liofilizowanych ekstraktach: wodno-etanolowym oczyszczonym i wodno-acetonowym surowym niż w ekstraktach: wodno-etanolowym surowym i wodno-acetonowym oczyszczonym.
5. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wykazują największą zdolność do tolerancji polifenoli zawartych w zliofilizowanym oczyszczonym ekstrakcie etanolowym.

Literatura

- [1] Aura A.-M.: Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem. Rev.*, 2008, 7 (3), 407-429.
- [2] Buchwald W., Zieliński J., Mścisz A., Adamczak A., Mrozikiewicz P.M.: Aktualny stan i perspektywy badań róż owocowych. *Herb. Pol.*, 2007, 53 (1), 85-92.
- [3] Cendrowski A., Ścibisz I., Mitek M., Kieliszek M., Kolniak-Ostek J.: Profile of the phenolic compounds of *Rosa rugosa* petals. *J. Food Qual.*, 2017, #7941347. DOI: 10.1155/2017/7941347.
- [4] Chrubasik C., Roufogalis B.D., Muller-Ladner U., Chrubasik S.: A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. *Phytother. Res.*, 2008, 22 (6), 725-733.
- [5] Cueva C., Moreno-Arribas M.V., Martin-Alvarez P.J., Bills G., Vicente M.F., Basilio A., Rivas C.L., Requena T., Rodriguez J.M., Bartolome B.: Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Rec. Microbiol.*, 2010, 161 (5), 372-382.

- [6] Cunja V., Mikulic-Petkovsek M., Zupan A., Stampar F., Schmitzer V.: Frost decreases content of sugars, ascorbic acid and some quercetin glycosides but stimulates selected carotenes in *Rosa canina* hips. *J. Plant Physiol.*, 2015, 178, 55-63.
- [7] Dolara P., Luceri C., de Filippo C., Femia A.P., Giovannelli L., Caderni G., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Cresci A.: Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat. Res.*, 2005, 591 (1-2), 237-246.
- [8] Fecka I.: Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. *Phytochem. Anal.*, 2009, 20 (3), 177-190.
- [9] Grys A.: Dzika Róża (*Rosa canina* L.) – chemizm i zastosowanie w lecznictwie. *Post. Fitoter.*, 2009, 4, 245-247.
- [10] Klewicka E., Libudzisz Z., Śliżewska K., Otlewska A.: Nowy szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus brevis*. Patent Polska 2013 (PL 214504, B1).
- [11] Koponen J.M., Happonen A.M., Mattila P.H., Torronen A.R.: Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55 (4), 1612-1619.
- [12] Kosmala M., Zdunczyk Z., Kolodziejczyk K., Klimczak E., Juskiewicz J., Zdunczyk P.: Chemical composition of polyphenols extracted from strawberry pomace and their effect on physiological properties of diets supplemented with different types of dietary fibre in rats. *Eur. J. Nutr.*, 2014, 53 (2), 521-532.
- [13] Landete J.M., Rodriguez H., Curiel J.A., de las Rivas B., Mancheno J.M., Munoz R.: Gene cloning, expression, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Lactobacillus brevis* RM84. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 37 (6), 617-624.
- [14] Larrosa M., Yanez-Gascon M.J., Selma M.V., Gonzalez-Sarrias A., Toti S., Ceron J.J., Tomas-Barberan F., Dolara P., Espin J.C.: Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57 (6), 2211-2220.
- [15] Lee H.C., Jenner A.M., Low C.S., Lee Y.K.: Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.*, 2006, 157 (9), 876-884.
- [16] Milala J., Sójka M., Król K., Buczek M.: Charakterystyka składu chemicznego owoców *Rosa pomifera* 'Karpattia'. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, 5 (90), 154-167.
- [17] Nadpal J.D., Lesjak M.M., Šibul F.S., Anačkov G.T., Četojević-Simin D.D., Mimica-Dukić N.M., Beara I.N.: Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: *Rosa canina* L. and *Rosa arvensis* Huds. *Food Chem.*, 2016, 192, 907-914.
- [18] Nowak D., Nienautowska A.: Wpływ warunków liofilizacji na właściwości suszonego przecieru z owoców dzikiej róży. *Post. Techn. Przetw. Spoż.*, 2017, 1, 60-65.
- [19] Requena T., Monagas M., Pozo-Bayón M.A., Martín-Álvarez P.J., Bartolomé B., del Campo R., Ávila M., Martínez-Cuesta M.C., Peláez C., Moreno-Arribas M.V.: Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends Food Sci. Technol.*, 2010, 21 (7), 332-344.
- [20] Rodríguez H., Curiel J.A., Landete J.M., de las Rivas B., de Felipe F.L., Gómez-Cordovés C., Mancheño J.M., Muñoz R.: Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, 132 (2), 79-90.
- [21] Skręty J., Gramza-Michałowska A., Sidor A., Korczak J.: Wpływ wybranych warunków przechowywania na zawartość witaminy C w owocach róży pomarszczonej *Rosa rugosa*. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 2013, 94 (4), 869-872.
- [22] Sołtys-Lelek A.: Chorologia krytycznych rodzajów – *Crataegus* L., *Rosa* L., *Rubus* L. na Wyżynie Krakowsko-Częstochowskiej. *Prądnik. Prace i Materiały Muzeum im. Prof. W. Szafera*, 2011, 21, 5-109.

- [23] Tabasco R., Sanchez-Patan F., Monagas M., Bartolome B., Victoria Moreno-Arribas M., Pelaez C., Requena T.: Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food Microbiol.*, 2011, 28 (7), 1345-1352.
- [24] Teleszko M., Wojdyło A., Oszmiański J.: Zawartość kwasu elagowego i spolimeryzowanych proantocyjanidyn w pseudoowocach wybranych gatunków róż. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, 5 (84), 37-46.
- [25] Turan I., Demir S., Kilinc K., Yaman S.O., Misir S., Kara H., Genc B., Mentese A., Aliyazicioglu Y., Deger O.: Cytotoxic effect of *Rosa canina* extract on human colon cancer cells through repression of telomerase expression. *J. Pharm. An.*, 2018, 8 (6), 394-399.
- [26] Tzounis X., Rodriguez-Mateos A., Vulevic J., Gibson G.R., Kwik-Urbe C., Spencer J.P.: Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2011, 93 (1), 62-72.
- [27] Tzounis X., Vulevic J., Kuhnle G.G., George T., Leonczak J., Gibson G.R., Kwik-Urbe C., Spencer J.P.: Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *Br. J. Nutr.*, 2008, 99 (4), 782-792.
- [28] Viveros A., Chamorro S., Pizarro M., Arija I., Centeno C., Brenes A.: Effects of dietary polyphenolrich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poultry Sci.*, 2011, 90 (3), 566-578.
- [29] Wąlejko A.: Właściwości przeciwutleniające owoców róży pomarszczonej (*Rosa rugosa* Thunb.). W: Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców 2. Tom I. Red. M. Kuczera, K. Piech. Wyd. Creativetime, Kraków 2015, ss. 118-121.
- [30] Wiśniewska-Grzeszkiewicz H.: Róże owocowe. *Hasło Ogrodnicze*, 1999, (10), 260-261.
- [31] Yilmaz S.O., Ercisli S.: Antibacterial and antioxidant activity of fruits of some rose species from Turkey. *Rom. Biotechnol. Lett.*, 2011, 16 (4), 6407-6411.

IMPACT OF POLYPHENOLS FROM *ROSA RUGOSA* THUNB. PSEUDOFRUITS POMACE ON GROWTH OF *LACTOBACILLUS* BACTERIA

S u m m a r y

As secondary metabolites of plants, polyphenols constitute a basic barrier for microflora that is considered to be morbidic and pathogenic (viruses, fungi, bacteria). When consumed with food, the polyphenols are able to produce many positive effects in the organisms of mammals (animals and human) and birds. Attributed to them are not only antioxidant properties, but also blood pressure lowering, anti-inflammatory and antimicrobial properties. Thus, when reaching the intestines, the undigested polyphenols are responsible, to a large extent, for the modulation of intestinal microflora (including bacteria of the *Lactobacillus* genus). *Rosa rugosa* Thunb. is one of the plants that contains large amounts of polyphenolic compounds; it is one of the most popular species of wild rose occurring in Poland.

The objective of the research study was to assess the prebiotic potential of crude and purified polyphenol extracts obtained from *Rosa rugosa* Thunb. pseudofruit pomace towards bacteria of the *Lactobacillus* genus (including strains with the verified probiotic properties). The predominant groups of polyphenols present in the extracts were ellagitannins and procyanidins. Also free ellagic acid, flavonols, and catechins were present in the extracts. In addition, the purified extracts were characterised by a much higher content of polyphenols in comparison to crude extracts. Furthermore, studies were performed on the prebiotic potential of lyophilized extracts towards bacteria of the *Lactobacillus* genus (including the *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 strain with the verified probiotic properties) using turbidimetric method. Only polyphenols at a concentration of 0.156 mg/ml has a prebiotic potential towards the *Lactobacillus* bacteria.

Higher concentrations of polyphenols contained in *Rosa rugosa* Thunb. pseudofruit acted as a factor limiting the increase in the biomass of *Lactobacillus* spp. bacteria.

Key words: *Lactobacillus* sp., bacteria growth, *Rosa rugosa* Thunb., polyphenols ☒

SYLWIA ŚCIESZKA, ELŻBIETA KLEWICKA, DOROTA ŻYŻELEWICZ

**WPLYW ALG *CHLORELLA VULGARIS* NA PRZEŻYWALNOŚĆ BAKTERII
LACTOBACILLUS BREVIS W OBECNOŚCI WYSOKICH STĘŻEŃ
CHLORKU SODU**

S t r e s z c z e n i e

Połączenie alg z produktami fermentowanymi bogatymi w bakterie fermentacji mlekowej przynosi wiele korzyści zdrowotnych oraz pozwala na utworzenie nowego segmentu żywności fermentowanej. Jedną z efektywnych metod utrwalania żywności jest stosowanie procesu odwodnienia osmotycznego polegającego na dodaniu substancji (np. chlorku sodu) obniżającej aktywność wody w produkcie.

Celem pracy było określenie wpływu *Chlorella vulgaris* na przeżywalność bakterii *Lactobacillus brevis* w niekorzystnych warunkach środowiskowych (duże stężenia chlorku sodu) metodą płytkową oraz turbidymetryczną. Zawartość 5 i 10 % chlorku sodu w środowisku wzrostowym bakterii obniżyła statystycznie istotnie liczbę badanych bakterii fermentacji mlekowej. Jednakże dodatek alg *Chlorella vulgaris* zabezpieczył badane szczepy *Lactobacillus brevis* przed obumieraniem. Ponadto w przypadku szczepów *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 oraz LOCK 0992 nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy próbą kontrolną z bakteriami i *Chlorella vulgaris* a próbą badaną z bakteriami, algami oraz dodatkiem 10 % chlorku sodu w 48 godzinie inkubacji. Zatem wprowadzenie alg do środowiska wzrostowego bakterii fermentacji mlekowej zredukowało niekorzystne działanie chlorku sodu o stężeniu 10 %. Stwierdzono, że przeżywalność wszystkich badanych szczepów *Lactobacillus brevis* hodowanych w obecności *Chlorella vulgaris* po 48-godzinnej inkubacji była wyższa w środowisku o stężeniu 10 % chlorku sodu niż w obecności 5 %. Za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) stwierdzono, że prawdopodobnie spowodowane to było uwolnieniem dodatkowej treści komórek alg.

Słowa kluczowe: *Chlorella vulgaris*, *Lactobacillus brevis*, niekorzystne warunki środowiskowe, chlorek sodu

Mgr inż. S. Ścieszka, prof. dr hab. inż. E. Klewicka, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczńska 171/173, 90-924 Łódź, dr hab. inż. D. Żyżelewicz, prof. nadzw., Instytut Technologii i Analizy Żywności, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.
Kontakt: sylwia.scieszka@edu.p.lodz.pl

Wprowadzenie

Algi są bogatym źródłem błonnika pokarmowego, wielu cennych witamin i pierwiastków, a także wytwarzają szeroką gamę cennych substancji bioaktywnych [1, 2, 7]. Ponadto wykazują właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze oraz przejawiają działanie prebiotyczne, neuroochronne, przeciwzapalne, immunomodulacyjne, przeciwcukrzycowe, przeciwwazopiętne i przeciwnowotworowe [2]. Mikroalgi należące do gatunku *Chlorella* otrzymały status GRAS (ang. *Generally Regarded as Safe*) [6]. Ze względu na swoje właściwości algi mogą być wykorzystywane do projektowania fermentowanej żywności funkcjonalnej [3, 4, 5]. Połączenie produktów fermentowanych, bogatych w bakterie kwasu mlekowego, z algami pozwala nie tylko na uzyskanie produktów zasobnych w niezbędne składniki odżywcze, ale również na utworzenie nowego segmentu żywności fermentowanej. Pomimo tak wielu korzyści wynikających z połączenia alg z bakteriami fermentacji mlekowej istnieje niewiele badań na temat wykorzystania alg w żywności fermentowanej [12]. Jednakże, aby bakterie fermentacji mlekowej mogły pozytywnie wpływać na organizm gospodarza, muszą charakteryzować się wysoką przeżywalnością w niekorzystnych warunkach środowiskowych, a także podczas stosowania metod utrwalania żywności. Jednym ze sposobów na przedłużenie trwałości żywności oraz podwyższenie cech jakościowych produktu jest zastosowanie zjawiska odwodnienia osmotycznego [11]. Proces ten polega na dodaniu substancji (np. NaCl) wytwarzającej wysokie ciśnienie osmotyczne i powodującej obniżenie aktywności wody w produkcie [10].

Celem pracy było określenie wpływu alg *Chlorella vulgaris* na przeżywalność bakterii z gatunku *Lactobacillus brevis* w niekorzystnych warunkach środowiskowych (duże stężenia chlorku sodu).

Materiał i metody badań

Materiał biologiczny stanowiły cztery szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus brevis* wyizolowane ze spontanicznych kiszonek roślinnych. Trzy z nich, należące do gatunku *Lactobacillus brevis* LOCK 0944, LOCK 0980 oraz LOCK 0992, zdeponowane są w Kolekcji Czystych Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych LOCK 105 (Łódź, Polska). Sekwencję szczepu *Lactobacillus brevis* MG451813 zdeponowano w biotechnologicznej bazie danych GenBank National Center. Bakterie fermentacji mlekowej hodowano w płynnym podłożu MRS (DeMan, Rogosa, & Sharpe, Merck, Niemcy) przez 48 h w temp. 30 °C.

Materiał doświadczalny stanowiła sproszkowana *Chlorella vulgaris* (suplement diety, Bellis Food, Chiny). W badaniach zastosowano 1,5-procentowe stężenie alg, które wynika z dziennej dawki zalecanej przez producenta do spożycia.

Wpływ *Chlorella vulgaris* na przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej w obecności 5 i 10 % chlorku sodu oznaczano metodami turbidymetryczną oraz płytkową. W pierwszej metodzie używano czytnika mikroplatek TriStar² S LB 942 (Berthold Technologies, Niemcy), a pomiary absorbancji wykonywano w 0, 2, 4, 6, 16, 21, 24 i 48 godzinie inkubacji przy $\lambda = 540$ nm. W metodzie płytkowej stosowano podłoże MRS agar (DeMan, Rogosa & Sharpe, Merck, Niemcy). Posiewy wykonywano w punktach czasowych: 0, 24 oraz 48 godzina.

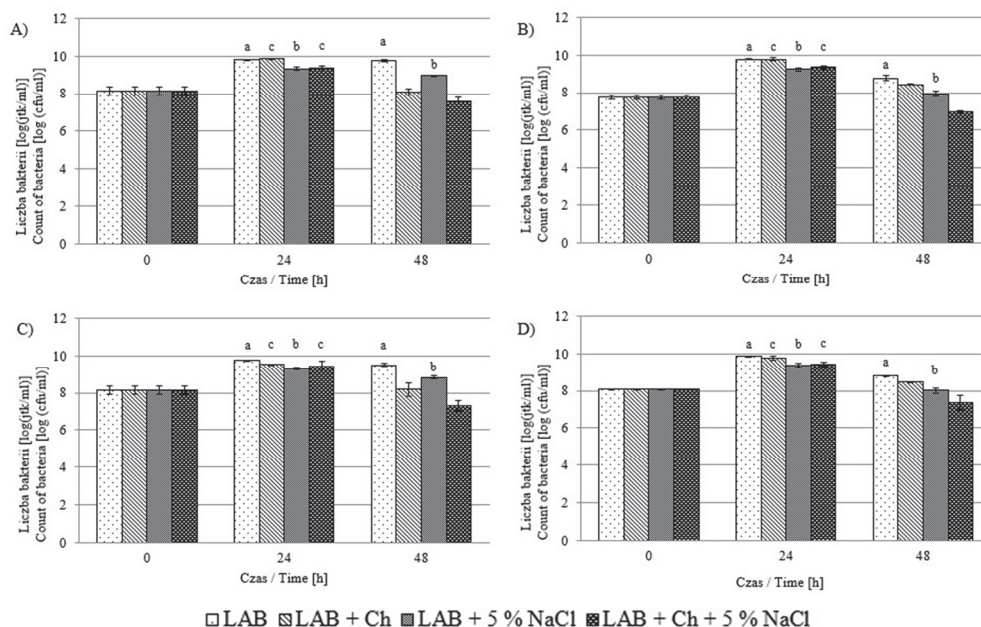
Wykonano test istotności różnic ANOVA (jednoczynnikowy) za pomocą programu OriginPro 2017 ($p \leq 0.05$). Różnice pomiędzy wartościami średnimi oznaczeń weryfikowano testem Tukeya ($p \leq 0.05$).

Przeprowadzono również ocenę wpływu chlorku sodu na strukturę *Chlorella vulgaris* z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM ang. scanning electron microscope) JEOL JFC 1200 fine coater manual (Japonia). Zastosowano następujące parametry napyłania złotem: ciśnienie – 8 Pa, natężenie prądu – 30 mA, czas – 30 s.

Wyniki i dyskusja

Obecność 5 % chlorku sodu w środowisku wzrostowym obniżyła statystycznie istotnie liczbę badanych bakterii *Lactobacillus brevis* zarówno w 24, jak i w 48 godzinie hodowli (rys. 1). Wprowadzenie do medium alg *Chlorella vulgaris* zabezpieczyło badane bakterie fermentacji mlekowej przed obumieraniem. W 24 godzinie dodatek 5 % chlorku sodu do próbek z algami spowodował nieznaczne zmniejszenie namnożenia bakterii fermentacji mlekowej, jednak w przypadku wszystkich badanych bakterii różnice te nie były statystycznie istotne.

Porównano wyniki przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w obecności dużych stężeń chlorku sodu uzyskane metodą płytkową i metodą turbidymetryczną. Jako przykład przedstawiono wzrost szczepu *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 (rys. 2). W przypadku metody płytkowej zaobserwowano wzrost liczby bakterii do 24 godziny, a następnie obniżenie namnożenia biomasy w 48 godzinie. Przy zastosowaniu metody turbidymetrycznej stwierdzono natomiast wzrost bakterii *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 również w 48 godzinie inkubacji. Wyniki uzyskane metodą turbidymetryczną nasunęły pewne wątpliwości. Prawdopodobnie wzrost liczby bakterii w 48 godzinie hodowli spowodowany był tym, że metodą turbidymetryczną oznaczane były wszystkie komórki żywe, również te w stadium VBNC (ang. *viable but non culturable*) oraz martwe [8]. Zatem w dalszej części pracy nie przedstawiono wyników uzyskanych metodą turbidymetryczną.

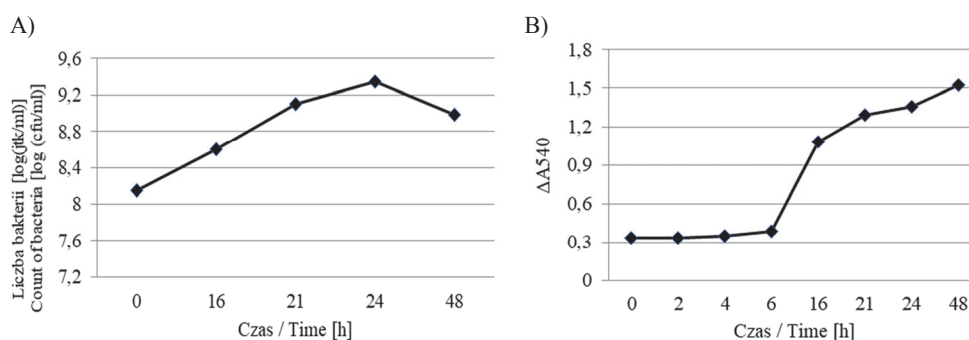


Objaśnienia / Explanatory notes:

LAB – bakterie fermentacji mlekowej / lactic acid bacteria; Ch – *Chlorella vulgaris*. Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments); $n = 4$; a-d – różnice statystycznie istotne między średnimi wartościami liczby bakterii tych samych szczepów w obrębie jednego przedziału czasowego ($p \leq 0.05$) / statistically significant differences between mean values of the count of bacteria of the same strains within one time interval ($p \leq 0.05$).

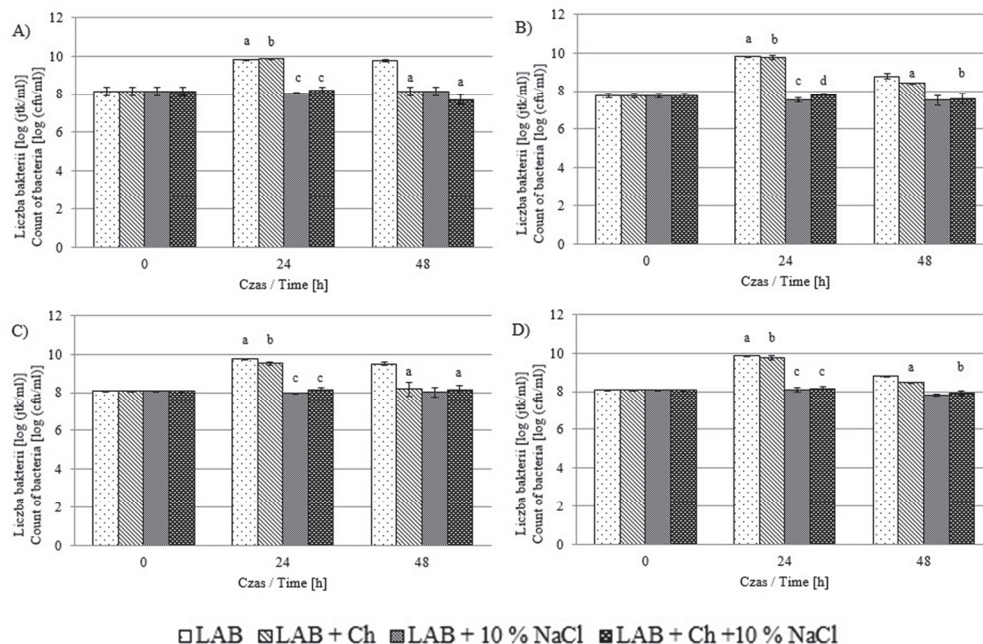
Rys. 1. Przeżywalność bakterii *Lactobacillus brevis*: A) LOCK 0944, B) LOCK 0980, C) LOCK 0992, D) MG451814 w obecności 5 % chlorku sodu

Fig. 1. Survival of *Lactobacillus brevis* bacteria: A) LOCK 0944, B) LOCK 0980, C) LOCK 0992, D) MG451814 in the presence of 5 % sodium chloride



Rys. 2. Wzrost bakterii *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 w obecności 5 % chlorku sodu oznaczony A) metodą płytkową, B) metodą turbidymetryczną

Fig. 2. Growth of bacteria *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 in the presence of 5 % sodium chloride, determined A) by plate method, B) turbidimetric method



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as under Fig. 1.

Rys. 3. Przeżywalność bakterii *Lactobacillus brevis*: A) LOCK 0944, B) LOCK 0980, C) LOCK 0992, D) MG451814 w obecności 10 % chlorku sodu

Fig. 3. Survival of *Lactobacillus brevis* bacteria: A) LOCK 0944, B) LOCK 0980, C) LOCK 0992, D) MG451814 in the presence of 10 % sodium chloride

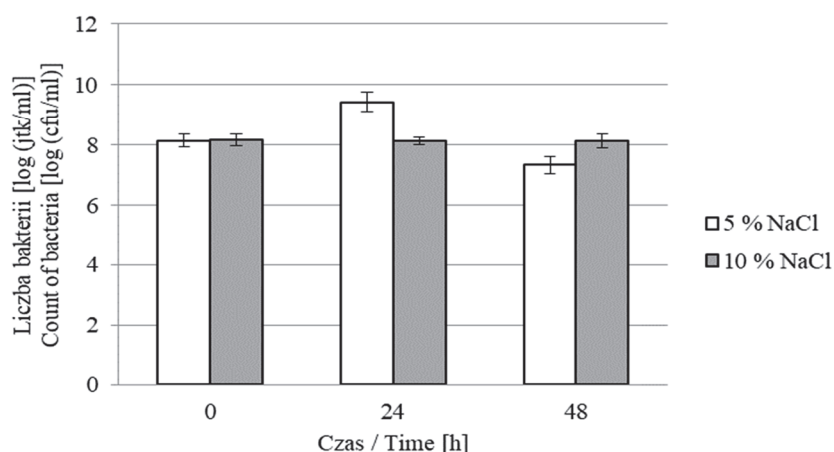
Przeżywalność badanych bakterii fermentacji mlekowej w obecności 10 % chlorku sodu przedstawiono na rys. 3. Po 24-godzinnej inkubacji stwierdzono obniżenie liczby bakterii *Lactobacillus brevis* o ok. 2 jednostki logarytmiczne w przypadku wszystkich badanych szczepów (różnice statystycznie istotne). Zatem dodatek 10 % chlorku sodu wpływał negatywnie na przeżywalność badanych bakterii fermentacji mlekowej. Wykazano również, że dodatek alg *Chlorella vulgaris* działał ochronnie na bakterie z gatunku *Lactobacillus brevis* przed procesem obumierania. Po porównaniu w 24 godzinie hodowli próbek z dodatkiem 10 % chlorku sodu w hodowlach z dodatkiem alg zaobserwowano nieznaczny wzrost liczby badanych bakterii. W przypadku szczepu *Lactobacillus brevis* LOCK 0980 różnice te były statystycznie istotne, co dowodzi, że dodatek *Chlorella vulgaris* do środowiska wzrostowego bakterii nie tylko zabezpieczał komórki przed obumieraniem w obecności 10 % chlorku sodu, ale również umożliwiał ich namnażanie. W przypadku szczepów *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 oraz LOCK 0992 w 48 godzinie inkubacji nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy próbą kontrolną z *Chlorella vulgaris* a próbą z algami oraz

dodatkiem 10 % chlorku sodu. Uzyskane wyniki potwierdziły korzystne działanie alg *Chlorella vulgaris*, których dodatek zredukował niekorzystne działanie 10 % chlorku sodu, a tym samym zabezpieczył komórki bakterii przed obumieraniem.

Badane bakterie z rodzaju *Lactobacillus brevis* pochodzące z kiszonek roślinnych wykazywały znaczącą tolerancję na stres osmotyczny wywołany dodatkiem zarówno 5 %, jak i 10 % chlorku sodu. Olszewska i wsp. [9], którzy zbadali wpływ chlorku sodu w zakresie 0,5 ÷ 2,5 % na aktywność fizjologiczną komórek bakterii fermentacji mlekowej, również stwierdzili, że szczep *Lactobacillus brevis* wyizolowany z kiszonej kapusty wykazał tolerancję na działanie NaCl w badanym zakresie.

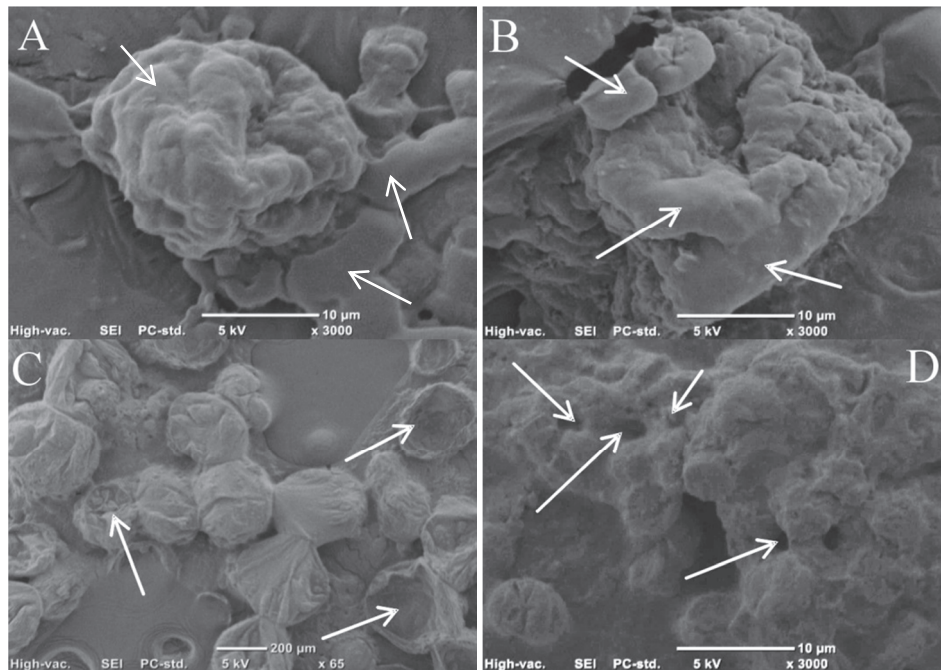
Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że algi *Chlorella vulgaris* dodane do hodowli bakterii *Lactobacillus brevis* (0944, 0980, 0992, MG451814) działają ochronnie w obecności dużych stężeń chlorku sodu, a nawet w zależności od szczepu mogą stymulować wzrost tych bakterii. Dzięki temu mogą znaleźć zastosowanie w projektowaniu fermentowanego produktu funkcjonalnego, a także w przemysłowych procesach produkcyjnych o zwiększonym udziale soli oraz utrwalaniu żywności metodą osmoaktywną.

Z porównania danych na rys. 1. i 3. wynika, że w 48 godzinie inkubacji przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej hodowanych w obecności alg *Chlorella vulgaris* i w obecności 5 % chlorku sodu była niższa niż w przypadku hodowli z 10 % chlorku sodu. Przykładowe zestawienie wyników dotyczące szczepu *Lactobacillus brevis* LOCK 0992 zamieszczono na rys. 4.



Rys. 4. Wzrost *Lactobacillus brevis* LOCK 0992 hodowanego w obecności alg *Chlorella vulgaris* z dodatkiem 5 oraz 10 % chlorku sodu w 48 godzinie inkubacji

Fig. 4. Growth of *Lactobacillus brevis* LOCK 0992 cultured in the presence of *Chlorella vulgaris* algae in 5 and 10 % sodium chloride at 48th hour of incubation



Fot. 1. Obraz SEM A) i B) alg *Chlorella vulgaris* (próbę kontrolną), C) i D) alg *Chlorella vulgaris* inkubowanych przez 48 h w obecności 10 % chlorku sodu (próbę badaną)

Photo 1. SEM image: A and B) of *Chlorella vulgaris* algae (control), C and D) of *Chlorella vulgaris* algae incubated for 48 h in the presence of 10 % sodium chloride (test sample)

Przeprowadzono analizę preparatu alg *Chlorella vulgaris* za pomocą elektronicznego mikroskopu skaningowego JEOL JFC 1200 fine coater manual. Porównano próbę kontrolną zawierającą *Chlorella vulgaris* z próbą badaną, w której algi inkubowano w obecności 10 % chlorku sodu przez 48 h (fot. 1). W próbach kontrolnych (fot. 1A i 1B) widoczne były gładkie skupiska, jakby pokryte substancją polimeryzującą. Natomiast w próbce badanej z dodatkiem 10 % chlorku sodu powierzchnia była wyraźnie porowata, przypominająca krater (fot. 1D). Agregaty komórek *Chlorella vulgaris* były małe i nieliczne, zdecydowanie nie uwidoczniło się polimeru powierzchniowego. Ponadto zaobserwowano pojedyncze komórki, z których pod wpływem działania 10 % chlorku sodu została uwolniona treść komórki alg (fot. 1C). Ze względu na bogaty skład chemiczny alg można przypuszczać, że uwolniona treść komórki *Chlorella vulgaris* sprzyjała namnażaniu bakterii fermentacji mlekowej.

Wnioski

1. Obecność w środowisku hodowlanym 5 i 10 % chlorku sodu powoduje obniżenie liczby badanych bakterii fermentacji mlekowej o 1 do 2 jednostek logarytmicznych.
2. Algi *Chlorella vulgaris* obecne w środowisku bakterii *Lactobacillus brevis* stanowią czynnik ochronny dla badanych bakterii w warunkach niekorzystnych, wynikających z obecności dużych stężeń chlorku sodu.
3. Dodatek *Chlorella vulgaris* do hodowli bakterii *Lactobacillus brevis* ŁOCK 0944 oraz ŁOCK 0992 w warunkach o zmiennych parametrach stresu osmotycznego (10 % NaCl) chroni komórki bakterii przed stresem, co uwidoczniłoby się jako stabilna żywotność bakterii w 48 godzinie hodowli.

Podziękowanie: Autorki dziękują Panu Jarosławowi Akusińskiemu za techniczną pomoc przy analizie SEM.

Literatura

- [1] Borowitzka M.A.: High-value products from microalgae-their development and commercialisation. J. Appl. Phycol., 2013, 25 (3), 743-756.
- [2] Charoensiddhi S., Lorbeer A.J., Franco C.M.M., Su P., Conlon M.A., Zhang W.: Process and economic feasibility for the production of functional food from the brown alga *Ecklonia radiata*. Algal Res., 2018, 29, 80-91.
- [3] Cofrades S., Serdaroğlu M., Jiménez-Colmenero F.: Design of healthier foods and beverages containing whole algae. In: Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals. Ed. H. Dominguez. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge 2013, pp. 609-633.
- [4] Heo J.-Y., Shin H.-J., Oh D.-H., Cho S.-K., Yang C.-J., Kong I.-K., Lee S.-S., Choi K.-S., Choi S.-H., Kim S.-C., Choi H.-Y., Bae I.: Quality properties of Appenzeller cheese added with *Chlorella*. Korean J. Food Sci. Anim. Resour., 2006, 26 (4), 525-531.
- [5] Jeon J.-K.: Effect of *Chlorella* addition on the quality of processed cheese. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 2006, 35 (3), 373-377.
- [6] Loveday S.M.: Food proteins: Technological, nutritional, and sustainability attributes of traditional and emerging proteins. Ann. Rev. Food Sci. Technol., 2019, 10 (1), 311-339.
- [7] Mohsenpour S.F., Willoughby N.: Luminescent photobioreactor design for improved algal growth and photosynthetic pigment production through spectral conversion of light. Bioresour. Technol., 2013, 142, 147-153.
- [8] Oliver J.D.: The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiol., 2005, 43, 93-100.
- [9] Olszewska M.A., Kocot A., Gryn M., Łaniewska-Trokanheim Ł.: Odpowiedź komórek *Lactobacillus brevis* na stres osmotyczny zbadana metodą cytometrii przepływowej. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2015, 3 (100), 53-63.
- [10] Piasecka E., Uczciwek M., Klewicki R.: Odwadnianie osmotyczne owoców w roztworach zawierających fruktooligosacharydy. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2009, 2 (63), 138-153.
- [11] Qiu L., Zhang M., Tang J., Adhikari B., Cao P.: Innovative technologies for producing and preserving intermediate moisture foods: A review. Food Res. Int., 2019, 116, 90-102.

- [12] Ścieszka S., Klewicka E.: Algae in food: A general review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2019, 59 (21), 3538-3547.

**EFFECT OF ALGAE *CHLORELLA VULGARIS* ON SURVIVAL OF BACTERIA
LACTOBACILLUS BREVIS AT HIGH CONCENTRATIONS OF SODIUM CHLORIDE**

S u m m a r y

The combination of algae and fermented products rich in lactic acid bacteria brings many health benefits and makes it possible to design a brand new segment of fermented food. One of the effective food preservation methods is the use of osmotic dehydration process consisting in adding a substance (e.g. sodium chloride) to reduce water activity in the product.

The objective of this research study was to determine the effect of *Chlorella vulgaris* on the survival of *Lactobacillus brevis* under adverse environmental conditions (high concentrations of sodium chloride) using a plate and turbidimetric method. The content of 5 and 10 % sodium chloride in the bacterial growth environment significantly reduced the count of lactic acid bacteria tested. However, adding the *Chlorella vulgaris* algae caused the tested *Lactobacillus brevis* strains to be protected from dying. Moreover, in the case of *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 and LOCK 0992 no statistically significant differences were reported between the control sample containing bacteria plus *Chlorella vulgaris* and the tested sample with bacteria, algae and 10 % sodium chloride added in the 48th hour of incubation. Therefore, the algae introduced into the growth environment of lactic acid bacteria reduced the adverse effect of 10 % sodium chloride. It was found that the survival of all the tested *Lactobacillus brevis* strains cultured in the presence of *Chlorella vulgaris* after 48 h of incubation was higher in the presence of 10 % sodium chloride than in the case of 5 % NaCl. Using a scanning electron microscopy (SEM), it was found that this was probably owing to the release of additional content of algae cells.

Key words: *Chlorella vulgaris*, *Lactobacillus brevis*, adverse environmental conditions, sodium chloride



MARCIN KRUK, TOMASZ WÓJCIK, MONIKA TRZĄSKOWSKA

ZASTOSOWANIE NAPARU HERBACIANEGO KOMBUCHA I KULTURY SYMBIOTYCZNEJ SCOBY DO PRODUKCJI FERMENTOWANEGO NAPOJU MLECZNEGO

Streszczenie

Do produkcji mlecznych napojów fermentowanych można wykorzystać inne kultury mikroorganizmów niż stosowane tradycyjnie. Zdolnością fermentacji mlekowej charakteryzuje się na przykład symbiotyczna kultura bakterii i drożdży SCOBY (ang. *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) używana do produkcji napoju herbacianego Kombucha.

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania naparu herbacianego Kombucha i symbiotycznej kultury SCOBY do produkcji mlecznych napojów fermentowanych na bazie mleka tradycyjnego oraz mleka bez laktozy. Na podstawie badań własnych opracowano recepturę, a także parametry fermentacji mlecznych napojów fermentowanych. W przeprowadzonych badaniach zdolności adaptacji symbiotycznej wykazano, że mikroorganizmy bytujące w kulturze SCOBY wykazują zdolność do wzrostu i aktywności metabolicznej w środowisku mleka tradycyjnego oraz mleka bez laktozy. Dynamika wzrostu typowych grup mikroorganizmów była uzależniona od pasaży SCOBY. W kolejnym pasażu bakterie fermentacji mlekowej i octowej osiągnęły liczbę ok. $8 \log \text{ jtk/cm}^3$ wcześniej niż w pierwszym pasażu. Jakość mikrobiologiczna wytworzonych napojów była bardzo dobra i charakterystyczna dla mlecznych napojów fermentowanych. Jakość sensoryczna określona została przy użyciu metod konsumenckich. Badane produkty charakteryzowały się umiarkowaną akceptowalnością sensoryczną. Opracowana receptura oraz warunki fermentacji mlecznych napojów na bazie symbiotycznej kultury SCOBY oraz naparu herbacianego Kombucha wymagają optymalizacji w celu uzyskania bardziej pożądaných cech sensorycznych produktu.

Słowa kluczowe: fermentowany napój mleczny, Kombucha, SCOBY, mleko bez laktozy

Wprowadzenie

Z dotychczasowej wiedzy, zaleceń żywieniowych i badań wynika, że istnieje silny związek między zdrowiem człowieka a jego sposobem odżywiania. Wzrastająca świadomość żywieniowa konsumentów ma ponadto coraz większy wpływ na rozwój

M. Kruk, T. Wójcik, dr hab. inż. M. Trzaskowska, 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: monika_trzaskowska@sggw.pl

trendu prozdrowotnego w produkcji żywności [13]. Szczególną grupą żywności, która wspomaga zdrowie człowieka, są napoje funkcjonalne. Spożywanie tego typu napojów może poprawić ogólny stan zdrowia i wpływać na zmniejszenie ryzyka zachorowania na wiele chorób. Napoje, które wykazują udokumentowany wpływ na zdrowie człowieka to m.in. mleczne napoje fermentowane produkowane zwykle dzięki zastosowaniu kultur startowych bakterii z rodzaju *Streptococcus* i *Lactobacillus* [6].

Do produkcji mlecznych napojów fermentowanych można wykorzystać inne kultury mikroorganizmów niż stosowane tradycyjnie. Potencjalne zdolności fermentacji mlekowej wykazuje symbiotyczna kultura bakterii i drożdży (ang. *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* – SCOBY) używana do produkcji napoju herbacianego znanego pod nazwą Kombucha. Mikrobiom SCOBY i napój Kombucha znane są od wielu lat. Wywodzą się one ze wschodniej Azji, skąd trafiły do wschodniej Europy, a obecnie są rozpoznawane na całym świecie [4]. Popularność napoju wynika z pozytywnego oddziaływania na zdrowie [5, 15], korzystnego profilu kwasów organicznych [12], jak również potencjalnego działania probiotycznego [2]. Jest to wynikiem bogatego składu mikroflory inokulum oraz napoju powstałego po fermentacji naparu z herbaty [8]. W badaniach Malbaša i wsp. [9, 10] oraz Ilić i wsp. [7] dowiedziono, że mikroorganizmy zawarte w kulturze symbiotycznej fermentują laktozę. Świadczy to o tym, że wśród nich znajdują się m.in. bakterie fermentacji mlekowej [2]. Dane te wskazują na możliwość przeprowadzenia fermentacji i otrzymania mlecznego napoju fermentowanego. Podejmowano próby opracowania mlecznych napojów fermentowanych na bazie SCOBY oraz naparu herbacianego Kombucha, jednak cechy sensoryczne produktów nie były poddane ocenie konsumenckiej [9].

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania naparu herbacianego Kombucha i kultury symbiotycznej SCOBY do produkcji fermentowanego napoju mlecznego o wysokiej jakości sensorycznej i mikrobiologicznej.

Materiał i metody badań

Materiałem do badań był fermentowany napój mleczny przygotowany z mleka krowiego UHT (o zawartości 1,5 % tłuszczu), odtłuszczonego mleka w proszku, naparu herbacianego Kombucha i symbiotycznej kultury SCOBY (celulozowego biofilmu nazywanego także grzybem). Do badań przygotowano 2 warianty napoju: z mleka tradycyjnego z laktozą i z mleka bezlaktozowego. Fermentację napojów mlecznych prowadzono w temp. 42 °C. Kultura (biofilm) wykorzystana do fermentacji była pasażowana trzykrotnie w środowisku mleka.

Napar herbaciany Kombucha przygotowywano z wody wodociągowej, kultury startowej, liści zielonej herbaty i sacharozy. Surowce zakupiono w lokalnym sklepie. Napar herbaty przygotowywano z 1 dm³ wody i 10 g zielonej herbaty liściastej, którą parzono przez 10 min. Do uzyskanego naparu dodawano sacharozę w ilości 80 g/dm³.

Uzyskany napar herbaciany chłodzono do temp. 30 °C, następnie zaszczipiano go kulturą startową SCOBY o masie 30 g oraz naparem herbacianym Kombucha w ilości 30 cm³/dm³. Fermentację prowadzono przez 7 dni w temp. 20 °C.

W gotowym produkcie oznaczano pH metodą potencjometryczną za pomocą aparatu Elmetron CP501 (Elmetron, Polska).

Oznaczano liczbę bakterii fermentacji mlekowej i octowej oraz liczbę drożdży w napoju przed fermentacją i po niej (9 i 24 h) w temp. 42 °C. Wszystkie analizy prowadzono w napoju. Do oznaczeń pobierano 1 cm³ i dodawano 9 cm³ sterylnej wody peptonowej (Biomaxima, Polska) oraz wykonywano rozcieńczenia dziesiętne.

Liczbę bakterii fermentacji mlekowej oznaczano metodą płytkową wgłębną. Płytki Petriego z odpowiednim rozcieńczeniem dziesiętnym zalewano agarem MRS (Biokar, Polska) i inkubowano w temp. 37 °C przez 48 h. Liczbę bakterii octowych oznaczano metodą płytkową powierzchniową. Używano podłoża składającego się z 40 mg/dm³ natamycyny (Sigma-Aldrich, Polska) 0,3 % peptonu (Merck, Polska), 0,3 % ekstraktu drożdżowego (Merck, Polska), 0,7 % węglanu wapnia (Sigma-Aldrich, Polska), 2 % glukozy (Sigma-Aldrich, Polska), 2 % agaru (Sigma-Aldrich, Polska) i 2 % 96-procentowego etanolu (POCH S.A., Polska). Płytki Petriego z zestalonym podłożem i rozcieńczeniem dziesiętnym próby inkubowano w temp. 25 °C przez 4 dni. Liczbę drożdży oznaczano metodą płytkową powierzchniową (agar YGC, Bio-Rad, Polska). Na płytki Petriego z zestaloną pożywką наносzono odpowiednie rozcieńczenie dziesiętne próby, rozprowadzano jałową gąszczką i inkubowano 5 dni w temp. 25 °C. Po inkubacji liczono typowe kolonie na poszczególnych podłożach selektywnych. Oznaczenia wykonano w 3 powtórzeniach z wyjątkiem liczby bakterii octowych.

Badanie zdolności adaptacji symbiotycznej kultury SCOBY do środowiska mleka polegało na trzykrotnym pasażowaniu celulozowego biofilmu do napoju mlecznego i pomiarze wartości pH bezpośrednio po wymieszaniu wszystkich składników oraz po 3, 6, 9, 22 i 24 h fermentacji.

Do oceny jakości sensorycznej zastosowano metodę profilowania różnicowego (sensoryczna analiza opisowa) oraz metodę 9-stopniowej skali hedonicznej (stopień akceptacji produktu) [1]. Przeprowadzono semikonsumencką ocenę sensoryczną (n = 41). Osobami oceniającymi byli studenci oraz pracownicy Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie przeszkoleni w wykonywaniu zastosowanych metod oceny sensorycznej. Ocenę przeprowadzano po 9 i 24 h fermentacji.

W metodzie profilowania różnicowego [1] zadaniem oceniającego było zaznaczenie na skali bipolarnej, jak bardzo określony wyróżnik badanej próbki różni się od produktu odniesienia (standardu). Zastosowano skalę odchyłeń od -5 do +5. Jako standard przyjęto kefir tradycyjny z laktozą o zawartości 1,5 % tłuszczu (Mlekovita, Polska) oraz kefir bez laktozy – 1,5 % tłuszczu (Robico, Polska).

W metodzie 9-stopniowej skali hedonicznej [1] zadanie oceniającego polegało na spróbowaniu napoju mlecznego i przyporządkowaniu mu jednego z dziewięciu określeń podanych na karcie, zgodnie z wrażeniem sensorycznym, jakie wywołała ocena próbki. Określenia były następujące: 1 – wyjątkowo niepożądana, 2 – bardzo niepożądana, 3 – niepożądana, 4 – nieco niepożądana, 5 – ani pożądana, ani niepożądana, 6 – nieco pożądana, 7 – pożądana, 8 – bardzo pożądana, 9 – wyjątkowo pożądana.

W obydwu metodach sensorycznych oceniane były cztery wyróżniki: zapach, konsystencja, smakowitość oraz ogólna pożądalność.

Analizę statystyczną wyników wykonano w programie Statistica 13.0 (StatSoft, Polska). Obliczono wartości średnie i odchylenia standardowe oraz zastosowano test t-Studenta dla prób niezależnych i wieloczynnikową analizę wariancji ANOVA. Do porównania wartości średnich post hoc wykorzystano test Bonferroniego. Różnicę uznawano za statystycznie istotną przy $p < 0,05$ w odniesieniu do wyników liczby mikroorganizmów i $p < 0,01$ w odniesieniu do wyników oceny sensorycznej.

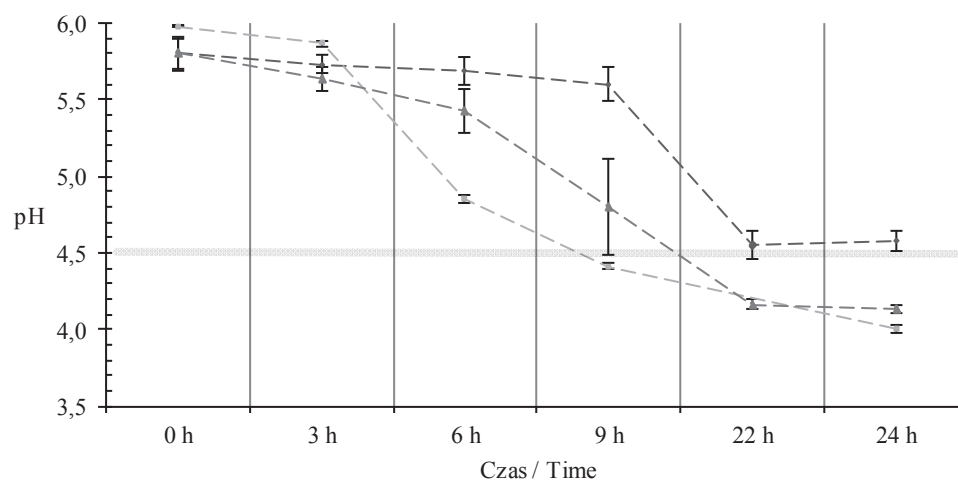
Wyniki i dyskusja

Na podstawie badań własnych opracowano recepturę, a także parametry fermentacji mlecznych napojów fermentowanych na bazie mleka tradycyjnego (z laktozą) oraz mleka bez laktozy. Szczegółowy skład napoju jest przedmiotem ochrony patentowej, do chwili składania artykułu do publikacji nie uzyskano numeru zgłoszenia patentowego. Wyznacznikiem fizykochemicznym zakończenia fermentacji w odniesieniu do optymalnej jakości sensorycznej było pH 4,5.

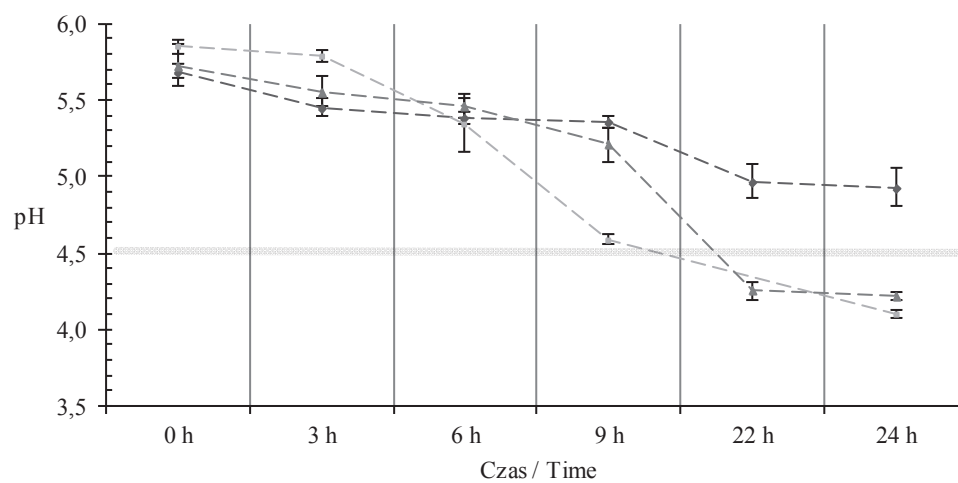
W badaniach zdolności adaptacji kultury SCOBY w środowisku mleka tradycyjnego i bezlaktozowego wykazano, że mikroorganizmy są zdolne do wzrostu i aktywności metabolicznej w tym środowisku. Na wartość pH napoju fermentowanego istotnie wpływał czas fermentacji, kolejny pasaż i obecność laktozy ($p < 0,05$). Podczas pierwszego pasażu zaobserwowano, że pH 4,5 zostało osiągnięte po 24 h. Podczas drugiego pasażu tę wartość pH stwierdzono po ok. 9 h fermentacji. Produkty fermentowane przez 24 h osiągnęły natomiast wartość pH ok. 4,2. W trzecim pasażu prędkość obniżania się wartości pH było zbliżone do wartości oznaczonych w pasażu drugim (rys. 1).

Liczba mikroorganizmów w mlecznych napojach fermentowanych powinna kształtować się na odpowiednim poziomie. W jogurtach powinna wynosić ok. $7 \log \text{ jtk/cm}^3$ bakterii fermentacji mlekowej (ang. *lactic acid bacteria* – LAB), natomiast w kefirach – $7 \log \text{ jtk/cm}^3$ LAB i $4 \log \text{ jtk/cm}^3$ drożdży [11]. Wykazano, że na liczbę LAB w mlecznym napoju fermentowanym statystycznie istotnie ($p < 0,05$) wpływał czas fermentacji, kolejny pasaż i obecność laktozy. Przed fermentacją liczba bakterii fermentacji mlekowej wynosiła $5,26 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju z mleka z laktozą i $5,43 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju na bazie mleka bez laktozy. W pierwszym pasażu po 9 h fermentacji

A - - - - - Pasaż 1 / Passage 1 - - - - - Pasaż 2 / Passage 2 - - - - - Pasaż 3 / Passage 3



B - - - - - Pasaż 1 / Passage 1 - - - - - Pasaż 2 / Passage 2 - - - - - Pasaż 3 / Passage 3



Objaśnienia / Explanatory notes:

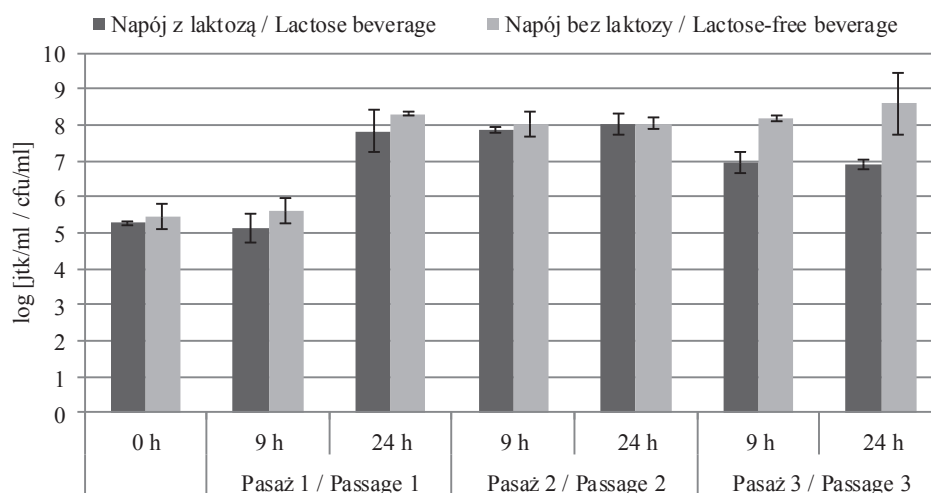
Linia przy wartości pH 4,5 odnosi się do optymalnej jakości sensorycznej produktu / Line at pH value of 4.5 refers to optimal sensory quality of product. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe / Error bars represent standard deviation; n = 3.

Rys. 1. Zmiana wartości pH podczas fermentacji mleka z laktozą (A) i bez laktozy (B)

Fig. 1. Change in pH during milk fermentation with lactose (A) and without lactose (B)

liczba tych bakterii była na podobnym poziomie, natomiast po 24 h fermentacji wzrosła do $7,81 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju na bazie mleka z laktozą i $8,31 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju na bazie mleka bez laktozy. Podczas drugiego pasażu liczba LAB osiągnęła poziom ok. $8 \log \text{ jtk/cm}^3$ już po 9 h i utrzymywała się na podobnym poziomie także po 24 h fermentacji, zarówno w przypadku napoju na bazie mleka z laktozą, jak i mleka bez laktozy. W trakcie trzeciego pasażu zaobserwowano wzrost liczby LAB w produkcie na bazie mleka z laktozą po 9 h fermentacji do $6,93 \log \text{ jtk/cm}^3$, a po 24 h fermentacji było ich średnio $6,90 \log \text{ jtk/cm}^3$. W porównaniu z drugim pasażem szybkość wzrostu była istotnie mniejsza ($p < 0,05$). Liczba bakterii obecnych w napoju na bazie mleka bez laktozy była zbliżona do napojów fermentowanych podczas drugiego pasażu i wynosiła ok. $8,59 \log \text{ jtk/cm}^3$ (rys. 2).

Grupa mikroorganizmów typowa dla mlecznych napojów fermentowanych, tj. LAB, w symbiotycznej kulturze SCOBY stanowi niewielką część jego mikroflory [3]. Warunki środowiska mlecznego wpłynęły pozytywnie na liczbę bakterii fermentacji mlekowej typowej dla napojów tego typu. Kolejne pasaże symbiotycznej kultury SCOBY w środowisku mleka przyczyniły się do przyspieszenia tempa rozwoju populacji LAB i uzyskania napojów mlecznych fermentowanych o wysokiej jakości mikrobiologicznej w krótszym czasie w porównaniu z pierwszym pasażem.



Objaśnienia / Explanatory notes:

Słupki oznaczają średnią liczbę bakterii / Bars indicate mean count of bacteria. Słupki błędów oznaczają odchylenia standardowe / Error bars indicate standard deviations; $n = 3$.

Rys. 2. Średnia liczba LAB w fermentowanych napojach mlecznych z laktozą i bez laktozy

Fig. 2. Average count of LAB bacteria in fermented milk beverages with lactose and without lactose

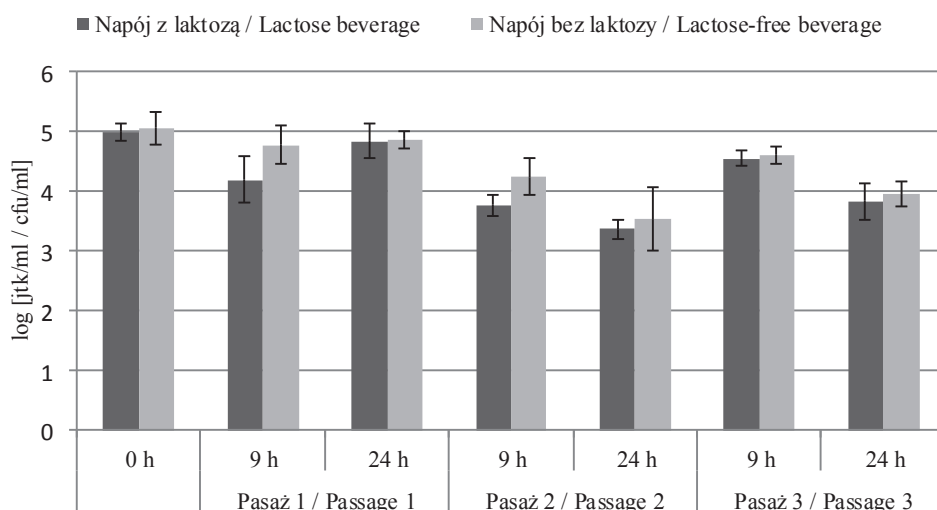
W symbiotycznej kulturze SCOBYY bakterie fermentacji octowej (ang. *acetic acid bacteria* – AAB) stanowią dominującą grupę mikroorganizmów. Ze względów technicznych w badaniu własnym oznaczenie liczby AAB wykonano tylko w jednym powtórzeniu, zatem wyniki mają charakter orientacyjny. Wraz z wydłużeniem czasu fermentacji oraz w kolejnych pasażach liczba tych bakterii w mlecznych napojach fermentowanych zwiększała się. Liczba AAB bezpośrednio po wymieszaniu składników była na poziomie $5,51 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju z mleka z laktozą i $6,12 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju na bazie mleka bez laktozy. Po 9 h fermentacji w pierwszym pasażu zaobserwowano zmniejszenie się liczby bakterii fermentacji octowej w obydwu napojach do poziomu $4,96 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju z mleka z laktozą i $5,96 \log \text{ jtk/cm}^3$ – w napoju na bazie mleka bez laktozy. Po 24 h fermentacji napojów mlecznych liczba AAB zwiększyła się do $6,68 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju na bazie mleka z laktozą i $8,14 \log \text{ jtk/cm}^3$ – w napoju na bazie mleka bez laktozy. Podczas drugiego pasażu liczba bakterii fermentacji octowej utrzymywała się na stałym poziomie ok. $8,1 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju na bazie mleka bez laktozy. Drugi pasaż SCOBYY w mleku z laktozą spowodował zwiększenie się liczby AAB do $9,37 \log \text{ jtk/cm}^3$ już po 9 h fermentacji. Natomiast po 24 h stwierdzono liczbę AAB na poziomie $9,68 \log \text{ jtk/cm}^3$. W trzecim pasażu po 24 h fermentacji liczba AAB zwiększyła się do $9,22 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju na bazie mleka z laktozą oraz $9,09 \log \text{ jtk/cm}^3$ – w napoju na bazie mleka bez laktozy.

Uzyskane w badaniu własnym wyniki dowodzą, że bakterie fermentacji octowej dobrze rozwijają się także w środowisku mleka. Uzyskane wyniki, podobnie jak w przypadku bakterii fermentacji mlekowej, wskazują na znaczącą rolę procesu adaptacji AAB do warunków mleka i zwiększanie ich liczby w kolejnych pasażach biofilmu SCOBYY.

Liczba drożdży w fermentowanym napoju mlecznym zmieniała się w zależności od czasu fermentacji oraz pasażu. Na liczbę drożdży w mlecznym napoju fermentowanym statystycznie istotnie ($p < 0,05$) wpływał czas fermentacji, kolejny pasaż i obecność laktozy. Przed fermentacją napojów mlecznych liczba drożdży była na poziomie ok. $5 \log \text{ jtk/cm}^3$. W trakcie pasażowania symbiotycznej kultury SCOBYY ich liczba zmniejszała się. Po 9 h fermentacji pierwszego pasażu wynosiła w napoju z laktozą $4,19 \log \text{ jtk/cm}^3$, a w napoju bez laktozy – $4,77 \log \text{ jtk/cm}^3$. Po 24 h fermentacji była natomiast równa $4,84$ i $4,87 \log \text{ jtk/cm}^3$ odpowiednio: w napoju z laktozą oraz bez laktozy. Wynikiem drugiego pasażu było dalsze zmniejszenie się liczby drożdży, która po 9 h fermentacji kształtowała się na poziomie $3,77 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju z laktozą i $4,25 \log \text{ jtk/cm}^3$ – w napoju bez laktozy. Do zmniejszenia liczby grzybów mikroskopowych doszło również po 24 h fermentacji i wynosiła ona średnio $3,36 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju na bazie mleka z laktozą oraz $3,53 \log \text{ jtk/cm}^3$ – w napoju na bazie mleka bez laktozy. Podczas trzeciego pasażu liczba drożdży w obu napojach była na podobnym poziomie. Po fermentacji trwającej 9 h wartość ta wynosiła $4,60 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju

na bazie mleka z laktozą oraz $4,55 \log \text{ jtk/cm}^3$ – w napoju na bazie mleka bez laktozy. Fermentacja trwająca 24 h spowodowała zmniejszenie się liczby drożdży do poziomu $3,84 \log \text{ jtk/cm}^3$ w napoju na bazie mleka z laktozą i $3,96 \log \text{ jtk/cm}^3$ – w napoju na bazie mleka bez laktozy (rys. 3).

Liczba drożdży zmniejszała się wraz z wydłużeniem czasu fermentacji oraz kolejnymi zachodzącymi po sobie pasażami. Zastosowana temperatura fermentacji nie jest optymalnym parametrem wzrostu tej grupy mikroorganizmów. Prawdopodobnie gatunki drożdży typowe dla SCOBY nie wykazują odpowiednich zdolności metabolicznych do wzrostu w środowisku mleka [14], jednak oznaczone wartości spełniają kryteria stawiane podobnej grupie produktów, jakimi są kefiry [11].



Objaśnienia / Explanatory notes:

Słupki oznaczają średnią liczbę drożdży / Bars indicate mean count of yeast. Słupki błędów oznaczają odchylenia standardowe / Error bars indicate standard deviations; n = 3.

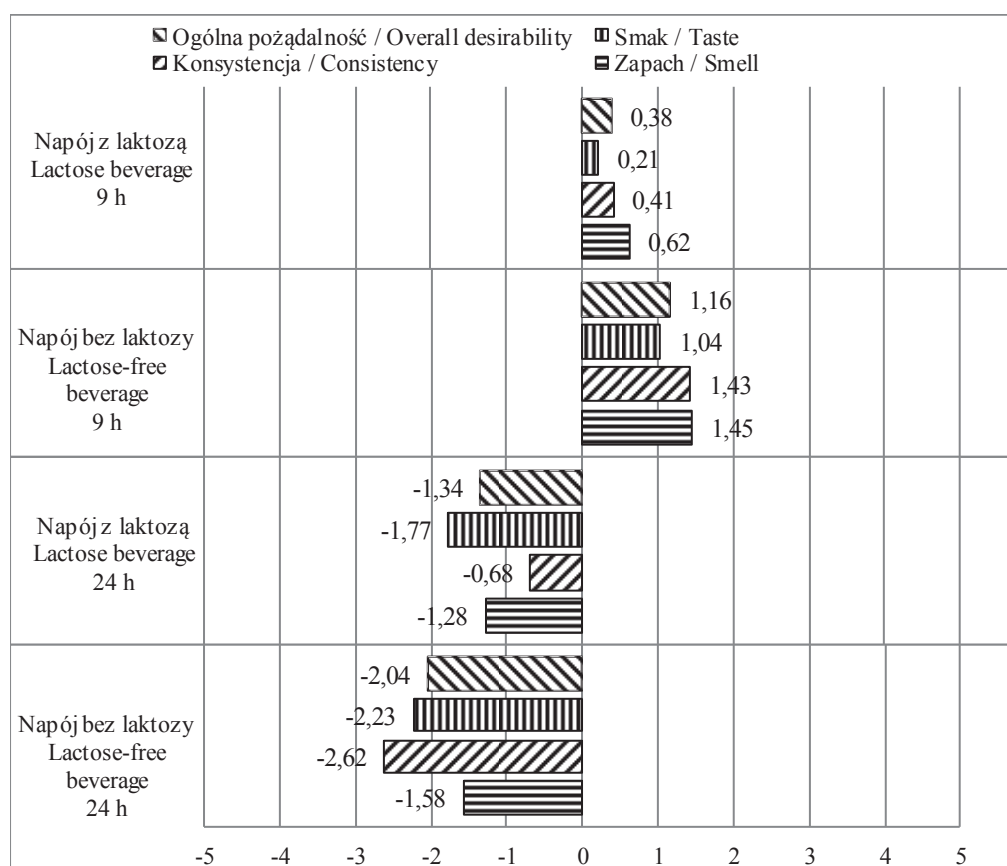
Rys. 3. Średnia liczba drożdży w napojach mlecznych fermentowanych z laktozą i bez laktozy

Fig. 3. Average amount of yeast in fermented milk beverages with lactose and without lactose

W analizie akceptacji sensorycznej napoju na bazie mleka z laktozą fermentowanego przez 9 h średnie rangi wynosiły: zapach – 7,23, konsystencja – 6,41, smakowitość – 5,43 i ogólna pożądalność – 5,98. Napój fermentowany 24 h charakteryzowały natomiast średnie rangi: zapach – 5,41 konsystencja – 6,28, smakowitość – 4,28, ogólna pożądalność – 4,85. Z kolei mlecznym napojom fermentowanym bez laktozy poddanym 9-godzinnej fermentacji przyporządkowano średnie rangi za te same wyróżniki: zapach – 7,05, konsystencja – 6,54, smakowitość – 5,88, ogólna pożądalność – 5,88,

a takie same napoje fermentowane przez 24 h wyróżniono rangami: zapach – 5,38, konsystencja – 4,15, smakowitość – 3,28 i ogólna pożądalność – 4,10.

Produkty, których średnia ocen jest większa lub równa randze 7 (tj. pożądany), uznawane są za produkty o wysokiej akceptacji sensorycznej [1]. Spośród badanych wyróżników jedynie zapach fermentowanych napojów mlecznych charakteryzował się taką rangą. Napoje fermentowane przez 9 h charakteryzowały się wyższymi rangami niż produkty poddane 24-godzinnej fermentacji.



Objaśnienia / Explanatory notes:

Wartość „0” dotyczy wyróżników w produkcie odniesienia / Value “0” refers to distinguishing features of reference product.

Rys. 4. Profilogramy różnicowe napoju mlecznego z laktozą i bez laktozy, fermentowanego 9 lub 24 h w stosunku do standardu – kefiru z laktozą i bez laktozy

Fig. 4. Differential profilograms of 9 or 24 h fermented lactose and lactose-free milk beverage compared to standard beverage – kefir with lactose and without lactose

Metoda profilowania różnicowego służy do oceny produktów, które porównuje się ze wzorcem odniesienia. Standardem odniesienia jest produkt o zdefiniowanych wyróżnikach, traktowany jako środek układu na dwukierunkowej skali. Wyniki oceny sensorycznej metodą profilowania różnicowego przedstawiono na rys. 4. Napoje fermentowane przez 9 h odznaczały się wyższą jakością sensoryczną w porównaniu ze standardem. Produkty po 24-godzinnej fermentacji były natomiast oceniane niżej od poziomu standardu.

Konsumenci zostali poproszeni także o zgłoszenie uwag dotyczących ocenianych produktów na bazie mleka tradycyjnego i mleka bez laktozy. Ok. 50 % oceniających zgłosiła uwagi słowne na temat jakości sensorycznej ocenianych produktów. Pozytywne opinie dotyczyły głównie pożądanej konsystencji, słodkiego posmaku oraz pożądanego smaku produktów. Spośród zgłoszonych uwag większość (ok. 70 %) miała charakter negatywny. Dotyczyły one przede wszystkim wyczuwalności nieznanego i gorzkiego posmaku, a także zbyt kwaśnego smaku produktów. Uwagi dotyczące wszystkich napojów fermentowanych poddanych ocenie były podobne.

Wnioski

1. Symbiotyczna kultura SCOBY wykazała zdolność adaptacji do fermentacji w warunkach mleka z laktozą, jak i mleka bez laktozy. Dynamika fermentacji była uzależniona od czasu fermentacji i pasażu.
2. Jakość mikrobiologiczna wytworzonych napojów była bardzo dobra i charakterystyczna dla mlecznych napojów fermentowanych.
3. Badane produkty charakteryzowały się umiarkowaną akceptowalnością sensoryczną. Fermentowany napój z mleka bezlaktozowego był nieznacznie bardziej akceptowany przez konsumentów.
4. Istnieje możliwość zastosowania naparu herbacianego Kombucha i kultury symbiotycznej SCOBY do produkcji fermentowanego napoju mlecznego.
5. Opracowana receptura oraz warunki fermentacji mlecznych napojów na bazie symbiotycznej kultury SCOBY oraz naparu herbacianego Kombucha wymagają optymalizacji w celu uzyskania bardziej pożądanых cech sensorycznych produktu.

Publikacja finansowana z środków przeznaczonych na działalność statutową Katedry Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności SGGW.

Literatura

- [1] Barylko-Pikielna N., Matuszewska I.: *Sensoryczne badania żywności. Podstawy. Metody. Zastosowania.* Wyd. II. Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków 2014.

- [2] Matei B., Salzat J., FiloŃteia D.C., Petruta C.C., Luta G., Utoiu E.R., Matei F.: Lactic acid bacteria strains isolated from Kombucha with potential probiotic effect. *Romanian Biotechnological Letters*, 2018, 23 (3), 1-7.
- [3] Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinotas A., Chakraborty W., Bhattacharya D., Gachhui R.: Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int. J. Food Microbiol.*, 2016, 220, 63-72.
- [4] Coton M., Pawtowski A., Taminiau B., Burgaud G., Deniel F., Coulloume-Labarthe L., Fall A., Daube G., Coton E.: Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(5), #fix048. DOI: 10.1093/femsec/fix048.
- [5] Dufresne C., Farnworth E.: Tea, Kombucha, and health: A review. *Food Res. Int.*, 2000, 33 (6), 409-421.
- [6] Food and Agriculture Organization of the United Nations: Milk and Milk Products. FAO, Rome 2007.
- [7] Ilić M.D., Milanović S., Kanurić K.G., Lonćar E.S.: Lactose fermentation by Kombucha – a process to obtain new milk – based beverages. *Romanian Biotechnological Letters*, 2012, 17 (1), 7013-7021.
- [8] Jayabalan R., Malbaša R.V., Lonćar E.S., Vitas J.S., Sathishkumar M.: A review on Kombucha tea microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2014, 13 (4), 538-550.
- [9] Malbaša R.V., Milanović S.D., Lonćar E.S., Djurić M.S., Carić M.D., Ilić M.D., Kolarov L.: Milk-based beverages obtained by Kombucha application. *Food Chem.*, 2009, 112 (1), 178-184.
- [10] Malbaša R., Vitas J., Lonćar E., Grahovac J., Milanović S.: Optimisation of the antioxidant activity of kombucha fermented milk products. *Czech J. Food Sci.*, 2014, 32 (5), 477-484.
- [11] Mojka K.: Charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2013, 94 (4), 722-729.
- [12] Neffe-Skocińska K., Sionek B., Ścibisz I., Kołozyn-Krajewska D.: Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA – Journal of Food*, 2017, 15 (4), 601-607.
- [13] Tomaszewska M., Bilśka B., Grzesińska W., Przybylski W.: Żywność funkcjonalna jako możliwość rozwoju polskich firm spożywczych. *Stowarzyszenie Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu*, Warszawa 2014.
- [14] Torija M.: Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, 80 (1), 47-53.
- [15] Villarreal-Soto S.A., Beaufort S., Bouajila J., Souchart J.-P., Taillandier P.: Understanding Kombucha tea fermentation: A review. *J. Food Sci.*, 2018, 83 (3), 580-588.

APPLICATION OF KOMBUCHA TEA BREW AND SCOBY SYMBIOTIC CULTURE TO PRODUCE FERMENTED MILK BEVERAGE

S u m m a r y

To produce fermented milk beverages, there can be used cultures of microorganisms other than those traditionally applied. For example SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) is characterized by its ability to carry out lactic acid fermentation; it is used to produce a Kombucha tea beverage.

The objective of the research study was to evaluate the applicability of Kombucha tea brew and SCOBY culture to produce fermented milk beverages based on the traditional and lactose-free milk. On

the basis of the authors' own research studies, a recipe was developed of fermented milk beverages, including the fermentation parameters. The research study was performed on the adaptability of symbiotic culture and it was shown that the microorganisms living in SCOBY were capable of growth and metabolic activity in the environment of traditional and lactose-free milk. The growth dynamics of typical groups of microorganisms was dependent on the SCOBY passage. In the subsequent passage the count of lactic and acetic bacteria of ca. 8 log cfu/ml was reported earlier than in the first passage. The microbiological quality of the beverages produced was very good and characteristic for fermented milk beverages. The sensory quality was determined using consumer methods. The products analysed were characterized by moderate sensory acceptability. In order to obtain better sensory attributes of the product, the developed recipe should be optimised as should be the fermentation conditions of milk beverages based on SCOBY symbiotic culture and Kombucha tea brew.

Key words: fermented milk beverage, Kombucha, SCOBY, lactose-free milk 

ALEKSANDRA SZYDŁOWSKA, DOROTA ZIELIŃSKA

**WPLYW WYBRANYCH TECHNOLOGII MROŻENIA NA LICZBĘ
BAKTERII *LACTOBACILLUS CASEI* LOCK 0900, AKTYWNOŚĆ
PRZECIWUTLENIAJĄCĄ I CECHY SENSORYCZNE SORBETÓW
NA BAZIE FERMENTOWANEJ PULPY DYNIOWEJ**

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu wybranych technologii mrożenia na przeżywalność probiotycznego szczepu bakterii *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900, jakość sensoryczną oraz aktywność przeciwutleniającą sorbetów z miąższu dyni. Zakres pracy obejmował produkcję trzech wariantów sorbetów w warunkach laboratoryjnych z zastosowaniem: (1) klasycznego zamrażania, (2) suchego lodu i (3) ciekłego azotu, a następnie oznaczenie liczby probiotycznego szczepu bakterii *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 w produkcji, pomiar pH, ocenę zmian jakości sensorycznej produktów podczas przechowywania w temp. -18 °C przez 16 tygodni. Dodatkowo oznaczono aktywność przeciwutleniającą surowca i świeżych gotowych produktów. Stwierdzono, że niezależnie od zastosowanej technologii produkcji sorbetów wraz z upływem czasu przechowywania następowało istotne obniżenie liczby bakterii LAB w produktach (o ok. 1 rząd logarytmiczny), jednak komórki bakterii przeżywały w większym stopniu w przypadku zastosowania ciekłego azotu i suchego lodu do mrożenia w porównaniu z metodą klasyczną. Rodzaj zastosowanej technologii produkcji sorbetów determinował także jakość sensoryczną deserów. Najwyższe noty ogólnej jakości sensorycznej przyznano produktowi wytworzonemu z użyciem technologii ciekłego azotu. Proces fermentacji spowodował istotny wzrost wartości aktywności przeciwutleniającej produktów gotowych w porównaniu z surowcem wyjściowym.

Słowa kluczowe: dynia, technologie produkcji sorbetów, probiotyki, jakość sensoryczna, aktywność przeciwutleniająca

Wprowadzenie

Do produktów pochodzenia roślinnego, owocowych lub/i warzywnych, o wysokiej wartości odżywczej można zaliczyć sorbety. Są to mrożone desery, które zyskały popularność, tradycyjnie produkowane ze świeżych lub pasteryzowanych surowców

Dr inż. A. Szydłowska, dr inż. D. Zielińska, 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: aleksandra_szydłowska@sggw.pl

pochodzenia roślinnego, tj. z puree czy soków, ale bez użycia mleka [17, 24]. Ze względu na skład sorbety mogą być nie tylko atrakcyjnym sensorycznie deserem, ale również elementem pełnowartościowej diety. Część surowców roślinnych o właściwościach prozdrowotnych jest dostępna w stanie świeżym jedynie sezonowo, a mrożonki nie dla wszystkich konsumentów są równie atrakcyjne [18]. W związku z rosnącą popularnością sorbetów oraz ulegającymi zmianie preferencjami konsumentów w odniesieniu do lodów [22] obserwuje się pewien trend w produkcji mrożonych deserów, związany z optymalizacją stosowanych dotąd technologii produkcji tych wyrobów.

Proces tzw. zamrażania kriogenicznego z użyciem ciekłego azotu stanowi jeden z kierunków rozwoju przetwarzania surowca roślinnego [24] ze względu na to, że szybsze tempo zamrażania powoduje mniejsze straty witamin i składników odżywczych [23].

Pavlyuk i wsp. [25] przeprowadzili badania nad możliwością zastosowania zamrażania kriogenicznego „szokowego”, niskiej temperatury oraz rozdrabniania warzyw i owoców jako innowacji w opracowywaniu nowego sposobu wytwarzania prozdrowotnych (na etapie wprowadzania do produkcji) sorbetów owocowych i warzywnych. Uzyskano nowe warianty mrożonych deserów z nawet 3-krotnie większą zawartością substancji biologicznie aktywnych [BAS] (ang. *biologically active substances*) w porównaniu z użytymi surowcami, co przyczyniło się do ograniczenia konieczności stosowania sztucznych dodatków do żywności, tj. stabilizatorów, emulgatorów czy syntetycznych środków barwiących, tradycyjnie dodawanych do składu recepturalnego sorbetów.

Współczesna gastronomia, poszukując nowych smaków, czy też dostosowując stare przepisy kulinarne do współczesnych warunków, również wyznacza trend określany mianem „food hunting”, którego przykładem jest kuchnia molekularna, wykorzystująca m.in. technologie z użyciem ciekłego azotu czy suchego lodu [10].

W literaturze przedmiotu [10, 23, 25] dostępne są jedynie doniesienia dotyczące możliwości wykorzystania technologii ciekłego azotu czy suchego lodu np. w produkcji gastronomicznej bądź też na etapie badań laboratoryjnych, przeprowadzanych w celu optymalizacji procesu produkcji deserów mrożonych. Brakuje natomiast danych dotyczących wpływu zastosowania tych technologii na liczbę bakterii probiotycznych w mrożonych deserach przygotowywanych na bazie surowca roślinnego, świeżych oraz przechowywanych, a także na wszelkie ich wyróżniki jakościowe, tj. profil sensoryczny produktu. Powyższe staje się uzasadnieniem podjętych badań.

Celem pracy było określenie wpływu wybranych technologii mrożenia na przeżywalność probiotycznego szczepu bakterii *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900, jakość sensoryczną oraz aktywność przeciwutleniającą sorbetów z miąższu dyni.

Material i metody badań

Material do badań stanowiły sorbety dyniowe wyprodukowane w warunkach laboratoryjnych trzema metodami: (1) klasycznego zamrażania, (2) z użyciem suchego lodu oraz (3) z zastosowaniem ciekłego azotu, z następujących surowców:

- przecier z dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima Duchesne*) odmiany Melonowa Żółta (według rejestru COBORU), przygotowany według Szydłowskiej i Kołożyn-Krajewskiej [28],
- pasteryzowana woda oraz dodatki smakowo-teksturotwórcze, tj. sacharoza i żelatyna spożywcza,
- probiotyczny szczep bakterii *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 pochodzący z kolekcji Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej [3, 19]. Szczep hodowano na pożywce MRS w temp. 37 °C, następnie 24-godzinną hodowlą bakterii zaszczepiano pasteryzowany przecier z dyni w ilości 1 % (v) produktu. Proces fermentacji prowadzono w temp. 32 °C przez 26 h, z dodatkiem sacharozy na poziomie 8 % (v) [28]. Wielkość dodawanego inokulum wynosiła ok. 9 log jtk/ml.

Sorbety dyniowe, stanowiące material do badań, wyprodukowano w warunkach laboratoryjnych następującymi metodami:

1. Metoda klasycznego zamrażania

Po połączeniu surowców otrzymywano masę lodową, którą mieszano i zamrażano w warunkach laboratoryjnych w maszynie do lodów typu IC 5000 (DeLonghi, Treviso, Włochy). Następnie produkty przekładano za pomocą jałowych łyżek do plastikowych pojemników o pojemności 300 ml i umieszczano w zamrażarce w temp. -18 °C.

2. Metoda z użyciem suchego lodu

Używano granulatu suchego lodu o średnicy 16 mm i temp. -78,5 °C (DryIce Zone, Polska). Suchy lód w ilości 400 g rozdrabniano mikserem i dodawano stopniowo do fermentowanego przecieru z dyni, jednocześnie intensywnie chłodząc całą masę. Po upływie ok. 10 min mieszania schłodzoną masę przekładano za pomocą jałowych łyżek do plastikowych pojemników o pojemności 300 ml i umieszczano w zamrażarce w temp. -18 °C.

3. Metoda z zastosowaniem ciekłego azotu

Do produkcji sorbetów z dyni stosowano ciekły azot o temp. -195,8 °C. Transportowano go i przechowywano w naczyniu Dewara o pojemności 4 l (Air Products, Polska). Ciekły azot stopniowo przelewano z naczynia Dewara do naczynia z uprzednio połączonymi składnikami sorbetu. Następnie mikserem mieszano masę, jednocześnie intensywnie ją chłodząc. Po upływie ok. 5 min mieszania schłodzoną masę przekładano za pomocą jałowych łyżek do plastikowych pojemników o pojemności 300 ml i umieszczano w zamrażarce w temp. -18 °C.

Wszystkie próby sorbetów przechowywano przez 16 tygodni. Oznaczenia liczby bakterii LAB oraz pomiar pH wykonywano po 0, 8 i 16 tygodniach przechowywania.

Oznaczanie liczby bakterii kwasu mlekowego w sorbetach dyniowych wykonywano metodą płytkową przez posiew na podłożu Agar MRS (Biokar Diagnostic, Francja) zgodnie z normą PN-ISO: 15214:2002 [26].

Pomiar pH badanych produktów wykonywano przy użyciu pH-metru CP-501 (Elmetron, Polska) z uwzględnieniem temperatury próbek.

Do oceny sensorycznej produktów zastosowano metodę ilościowej analizy opisowej QDA zgodnie z normą ISO 13299: 2016 [11]. Oceniano produkty świeże oraz po 8 i 16 tygodniach przechowywania w temp. -18 °C. W celu zdefiniowania jakości sensorycznej produktów wyszkolony zespół oceniających wytypował 9 wyróżników – 2 wyróżniki tekstury: gęstość i gładkość; 6 wyróżników smaku: dyniowy, słodki, kwaśny, gorzki, cierpki, piekący i inny oraz jakość ogólną. Oceny zostały przeprowadzone z udziałem 10-osobowego zespołu pracowników Katedry Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, przeszkolonego w zakresie metodyki wykonywanych analiz oraz przebadanego pod względem wrażliwości sensorycznej.

Aktywność przeciwutleniającą oznaczano według zmodyfikowanej metody Branda-Wiliamsa i wsp. [6] z użyciem rodnika DPPH[•] (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl, Sigma Aldrich, Polska). Analizowano niefermentowany surowiec – przecier z dyni oraz świeże sorbety wyprodukowane trzema metodami. Ekstrakty sporządzano z 25 g próbki, do której dodawano 100 ml etanolu. Ekstrakcję z wytrząsaniem prowadzono przez 20 h, następnie mieszaninę filtrowano. Absorbancję roztworów mierzono przy długości fali $\lambda = 517$ nm. Roztwór DPPH[•] sporządzono z 0,012 g DPPH[•] ($M = 394,32$ g/mol), który rozpuszczono w 100 cm³ etanolu. Kalibrację spektrofotometru przeprowadzono, używając etanolu. Absorbancję A₀ mierzono po dodaniu do 0,2 cm³ roztworu DPPH[•] 0,8 cm³ etanolu. Próbką zawierała 0,2 cm³ roztworu DPPH[•], 0,6 cm³ etanolu i 0,2 cm³ badanego ekstraktu. Po upływie 5, 10, 20, 30 i 40 min od zainicjowania reakcji mierzono absorbancję (A). Każdy pomiar wykonywano trzykrotnie (dla 3 różnych partii produktów) i obliczano średnią wartość absorbancji (A_r) dla danego roztworu. Inhibicję wyrażoną w procentach obliczano z równania:

$$\% \text{ inhibicji} = 100 (A_0 - A_r)/A_0$$

gdzie:

A_r – średnia wartość absorbancji badanej próbki,

A₀ – absorbancja kontrolna.

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 13.1 (StatSoft, Polska). Do statystycznej oceny wyników uzyskanych podczas oznaczania liczby bakterii LAB, pomiarów pH oraz pomiaru aktywności przeciwutleniającej zastosowano jedno-

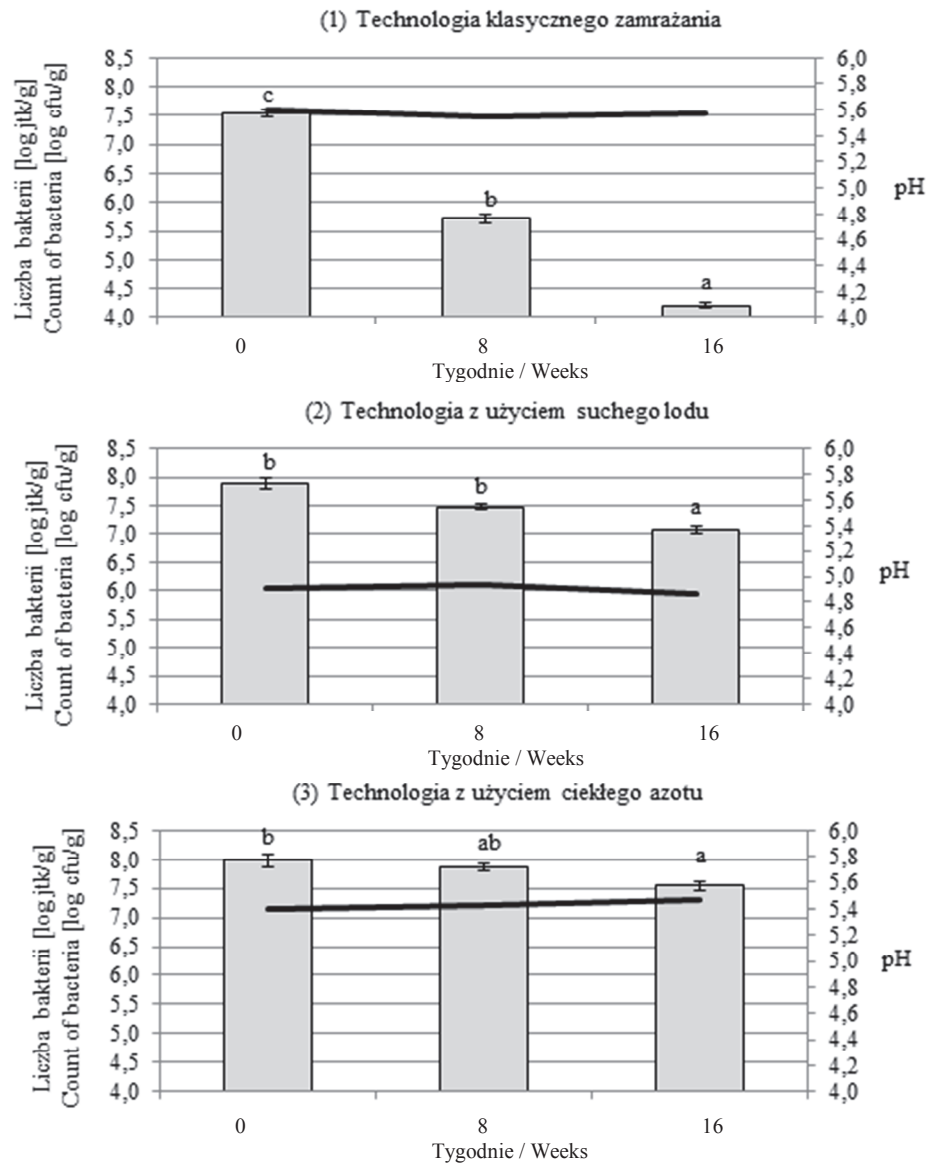
czynnikową analizę wariancji (Anova). Testowanie prowadzono przy $p = 0,05$. Do interpretacji wyników oceny sensorycznej sorbetów wykorzystano analizę składowych głównych PCA (ang. *Principal Component Analysis*). Wyodrębniono 3 składowe główne, których suma wyjaśniała 65,6 % całkowitej wariancji zmiennych. Natomiast suma 2 pierwszych składowych głównych wyjaśniała 57 % wariancji zmiennych. Obliczono także wartości współczynników korelacji ($p = 0,01$) jakości ogólnej z badanymi wyróżnikami jakości sorbetów z fermentowanego miąższu dyni.

Wyniki i dyskusja

W przypadku każdej z zastosowanych technologii odnotowano statystycznie istotne obniżenie ($p = 0,0015$) liczby bakterii LAB w sorbetach po okresie przechowywania (rys. 1). Zastosowanie technologii ciekłego azotu i suchego lodu do produkcji mrożonych deserów dyniowych pozwoliło jednak na otrzymanie statystycznie istotnie wyższej liczby bakterii *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 (ok. 7 log jtk/g) po 16 tygodniach przechowywania w porównaniu z przechowywanymi sorbetami wytwarzanymi metodą tradycyjną (ok. 4 log jtk/g). Przyczyną tego zjawiska jest zmniejszenie zmian zachodzących w komórkach bakterii przy intensywnym mrożeniu (z użyciem suchego lodu czy ciekłego azotu), co ogranicza tworzenie dużych kryształków lodu, które uszkadzają struktury komórkowe.

Rodzaj zastosowanej technologii produkcji determinował wartość pH gotowych wyrobów (rys. 1). Najniższą wartość pH spośród wszystkich badanych świeżych próbek odnotowano w przypadku sorbetów wyprodukowanych z użyciem technologii suchego lodu (wartość 4,9). Pozostałe technologie, tj. tradycyjna i z użyciem ciekłego azotu nie różnicowały produktów istotnie ($p > 0,05$) pod względem wartości pH (średnia wartość 5,5). Wartość pH żadnego z 3 rodzajów sorbetów nie uległa statystycznie istotnym zmianom podczas 16 tygodni przechowywania w temp. -18°C . Başıgıt i wsp. [4], Favaro-Trindade i wsp. [9] oraz Nousia i wsp. [21] także nie obserwowali statystycznie istotnych zmian wartości pH w mrożonych deserach na bazie surowców roślinnych lub mleka w okresie przechowywania dochodzącym nawet do 180 dni, w temperaturze zbliżonej do zastosowanej w badaniach własnych.

Szydłowska i Kołożyn-Krajewska [29] wykazały w potencjalnie probiotycznych sorbetach, wyprodukowanych na bazie fermentowanego miąższu dyni metodą tradycyjną, po przechowywaniu wyższą liczbę bakterii probiotycznych *Lactobacillus rhamnosus* LOCK0900 (powyżej 9 log jtk/g) ze względu na niższą temperaturę przechowywania produktów (-30°C) niż w niniejszym doświadczeniu (-18°C). Z kolei według Akalina i wsp. [2] liczba probiotycznych bakterii starterowych *Lactobacillus acidophilus* osiągnęła poziom 6,88 log jtk/g po 180 dniach przechowywania lodów mlecznych w temp. -18°C .



Objaśnienia / Explanatory notes:

Słupki przedstawiają liczbę komórek bakterii, linie – zmiany wartości pH / Bars represent count of bacteria, lines – changes in pH values; a, b, c – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się między sobą statystycznie istotnie ($p > 0,05$) / mean values denoted by the same letters don't differ statistically significantly ($p > 0.05$).

Rys. 1. Zmiany liczby bakterii *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 oraz wartości pH w sorbetach podczas 16 tygodni przechowywania w temp. -18 °C

Fig. 1. Changes in count of *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 bacteria and in pH value of sorbets during 16 week storage at a temp. of -18 °C

Badania *in vitro* dotyczące analizy aktywności przeciwutleniającej różnych gatunków drobnoustrojów probiotycznych (głównie bakterii należących do *Lactobacillus* spp. oraz *Bifidobacterium* spp.) były przedmiotem prac naukowych [13, 16, 27, 31]. Achuthan i wsp. [1] stwierdzili, że różne szczepy bakterii tego samego gatunku wyizolowane z jednego środowiska wykazują odmienną tolerancję na nadtlenek wodoru czy rodnik hydroksylowy. Mogą charakteryzować się także różną ekspresją genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową i katalazę oraz prowadzić inhibicję peroksydacji kwasu linolowego w różnym stopniu. Świadczy to o, zależnej od szczepu, zróżnicowanej skuteczności przeciwutleniającej probiotycznych bakterii.

Wyniki dotyczące wpływu procesu fermentacji i rodzaju zastosowanej technologii produkcji sorbetów na wartość aktywności przeciwutleniającej przedstawiono w tab. 1. Stwierdzono, że w wyniku procesu fermentacji z udziałem probiotycznego szczepu bakterii *Lactobacillus rhamnosus* ŁOCK 0900 wartość aktywności przeciwutleniającej gotowych sorbetów była ponad 5-krotnie wyższa w porównaniu z fermentowanym surowcem, czyli pulpą dyniową wykorzystywaną do produkcji warzywnych deserów mrożonych. Nie odnotowano natomiast statystycznie istotnych różnic pomiędzy próbkami sorbetów wytwarzanych przy zastosowaniu różnych technologii produkcji (tab. 1).

Tabela 1. Wartości aktywności przeciwutleniającej sorbetów determinowane procesem fermentacji i rodzajem zastosowanej technologii mrożenia

Table 1. Antioxidant activity values of sorbets dependent on fermentation process and type of sorbet manufacturing technology used

Sorbet	Aktywność przeciwutleniająca [% inhibicji DPPH [•]] Antioxidant activity [% of DPPH [•] inhibition]
Surowiec – dynia / Raw material – pumpkin	14,1 ^a ± 2,07
(1) Zamrożony tradycyjnie / Traditionally frozen	74,6 ^c ± 2,63
(2) Zamrożony przy użyciu suchego lodu / Frozen using dry ice	76,2 ^c ± 2,55
(3) Zamrożony przy użyciu ciekłego azotu / Frozen using liquid nitrogen	73,0 ^{bc} ± 1,58

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenie standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; a, b, c – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się między sobą statystycznie istotnie ($p > 0,05$) / mean values denoted by the same letters don't differ statistically significantly ($p > 0.05$).

Wpływ procesu fermentacji na wartość aktywności przeciwutleniającej żywności pochodzenia roślinnego był przedmiotem badań, które prowadzili m.in. Kusznerewicz

i wsp. [14]. Poddali oni spontanicznej fermentacji sok z białej kapusty. Po 7 dniach prowadzenia procesu zaobserwowano znaczący wzrost potencjału przeciwutleniającego wobec rodnika DPPH[•]. Sok z kiszonej kapusty otrzymany po 14 dniach fermentacji charakteryzował się ok. 7-krotnie wyższym potencjałem wobec DPPH[•] w porównaniu z sokiem ze świeżej kapusty. Również w badaniach Chłopickiej i wsp. [7] fermentacja nasion gryki wpłynęła na kilkakrotny, istotny wzrost wartości parametrów przeciwutleniających (DPPH[•]).

Na podstawie wyników oceny sensorycznej sorbetów z dyni z dodatkiem bakterii probiotycznych zaobserwowano trend związany z jakością ogólną produktów. Spośród 9 ocenianych wyróżników 4 miały pozytywny wpływ na jakość ogólną (tab. 2).

Tabela 2. Wartości współczynników korelacji (r) jakości ogólnej z badanymi wyróżnikami jakości sorbetów z fermentowanego mięsna dyni

Table 2. Values of coefficients of correlation (r) between overall quality and tested quality characteristics of sorbets made of fermented pumpkin pulp

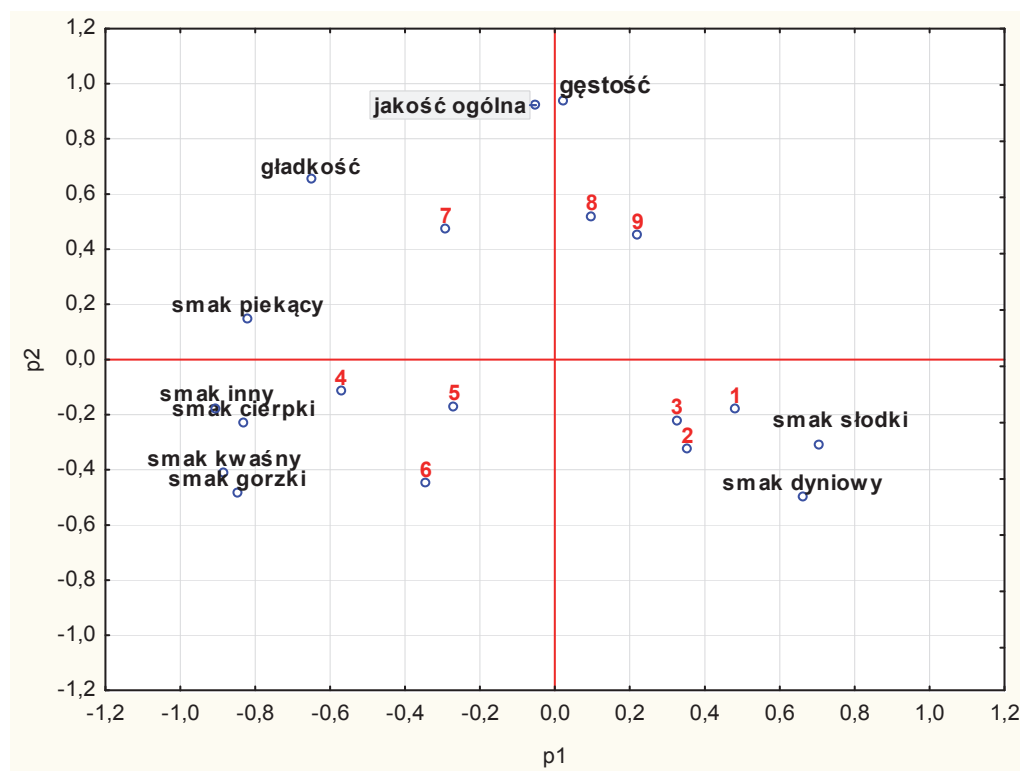
Wyróżnik jakościowy Quality characteristic	r	
	dodatnia / positive	ujemna / negative
Konsystencja / Consistency:		
Gęstość / Thickness	0,2135	-
Gładkość / Smoothness	0,2311*	-
Smak / Flavour		
Dyniowy / Pumpkin flavour	0,1169	-
Słodki / Sweet flavour	0,1114	-
Kwaśny / Acid flavour	-	-0,1962
Gorzki / Bitter taste	-	-0,1279
Cierpki / Pungent taste	-	-0,0754
Piekący / Burning taste	-	-0,0489
Inny / Other flavour	-	-0,0815

Objaśnienia / Explanatory notes:

* – współczynnik korelacji statystycznie istotny ($p < 0,01$) / statistically significant correlation coefficient ($p < 0.01$).

Statystycznie istotną zależność stwierdzono jedynie w przypadku wyróżnika konsystencji – gładkości, natomiast wyróżniki jakości sensorycznej, takie jak smak kwaśny i gorzki w niewielkim stopniu obniżały ogólną jakość sensoryczną sorbetów, jednak nie zaobserwowano tu statystycznie istotnych zależności.

Wyniki uzyskane metodą PCA przedstawiono graficznie na rys. 2. Pierwszą grupą jednorodną pod względem jakościowym były próbki sorbetów wyprodukowanych metodą klasycznego zamrażania, oznaczone cyframi 1, 2, 3. Ich usytuowanie w pobliżu wektora smaku dyniowego i smaku słodkiego wskazuje, że te produkty charakteryzowały się wyraźnym smakiem słodkim i dyniowym.



Objaśnienia / Explanatory notes:

jakość ogólna / overall quality; gęstość / thickness; gładkość / smoothness; smak piekący / burning taste; smak inny / other flavour; smak cierpki / pungent taste; smak kwaśny / acid flavour; smak gorzki / bitter taste; smak słodki / sweet flavour; smak dyniowy / pumpkin flavour; 1 – sorbet wyprodukowany metodą tradycyjną, świeży / sorbet manufactured by traditional method, fresh; 2 – sorbet wyprodukowany metodą tradycyjną, przechowywany przez 8 tygodni / sorbet manufactured by traditional method, stored for 8 weeks; 3 – sorbet wyprodukowany metodą tradycyjną, przechowywany przez 16 tygodni / sorbet manufactured by traditional method, stored for 16 weeks; 4 – sorbet wyprodukowany z użyciem suchego lodu, świeży / sorbet manufactured using dry ice, fresh; 5 – sorbet wyprodukowany z użyciem suchego lodu, przechowywany przez 8 tygodni / sorbet manufactured using dry ice, stored for 8 weeks; 6 – sorbet wyprodukowany z użyciem suchego lodu, przechowywany przez 16 tygodni / sorbet manufactured using dry ice, stored for 16 weeks; 7 – sorbet wyprodukowany z użyciem ciekłego azotu, świeży / sorbet manufactured using liquid nitrogen, fresh; 8 – sorbet wyprodukowany z użyciem ciekłego azotu, przechowywany przez 8 tygodni / sorbet manufactured using liquid nitrogen, stored for 8 weeks; 9 – sorbet wyprodukowany z użyciem ciekłego azotu, przechowywany przez 16 tygodni / sorbet manufactured using liquid nitrogen, stored for 16 weeks.

Rys. 2. Wykres konfiguracji punktów reprezentujących zmienne w układzie dwóch pierwszych osi czynnikowych (głównych składowych)

Fig. 2. Graph of configuration of points representing variables in system of first two factorial axes (principal components)

Ledeker i wsp. [15] zbadali różnice cech sensorycznych pomiędzy puree z mango a sorbetem z mango wyprodukowanym także metodą tradycyjnego zamrażania. Wyniki tych badań dowodzą, że dominującą nutą smakową mrożonych deserów z mango była nuta słodko-owocowa pochodząca ze wsadu roślinnego użytego do produkcji. Próbkę sorbetów z fermentowanego miąższu dyni, oznaczone cyframi 4, 5, 6 – rys. 2 (technologia z wykorzystaniem suchego lodu) odznaczały się dużą intensywnością odczucia smaku gorzkiego, kwaśnego, cierpkiego i innego. Dwie ostatnie (próbki 5 i 6) zostały ocenione najniżej spośród wszystkich dziewięciu produktów pod względem ogólnej jakości sensorycznej. Według Myhrvolda i wsp. [20] użycie suchego lodu sprawia, że produkt poddany jego działaniu staje się gazowany oraz przybiera lekko kwaśny smak, co może mieć wpływ na niższe oceny cech sensorycznych.

Z kolei na drugim „biegunie jakościowym” znajdują się próbki sorbetów dyniowych oznaczone numerami 8 i 9 – rys. 2 (technologia z wykorzystaniem ciekłego azotu). Jakość sensoryczna tych produktów była najwyższa spośród wszystkich ocenianych. Przy użyciu tej technologii można osiągnąć inne efekty niż z użyciem suchego lodu. Mrożone desery wytworzone z użyciem ciekłego azotu mają bardziej kremową i jednolitą konsystencję w porównaniu z wyrobami powstałymi w procesie tradycyjnego mrożenia. Przyczyną takiego zjawiska jest powstawanie kryształków lodu o małej średnicy w porównaniu z innymi metodami mrożenia [5, 30].

Wnioski

1. Niezależnie od zastosowanej technologii mrożenia sorbetów, czas przechowywania wpływał istotnie na obniżenie liczby bakterii *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 w produktach. Po 16 tygodniach przechowywania w temperaturze -18 °C odnotowano obniżenie liczby bakterii o ok. 1 rząd logarytmiczny w stosunku do wyrobów świeżych, jednak w przypadku sorbetów wyprodukowanych metodą przy użyciu ciekłego azotu i suchego lodu przeżywalność bakterii była istotnie wyższa.
2. Rodzaj zastosowanej technologii mrożenia sorbetów determinował jakość sensoryczną deserów. Najwyższe noty ogólnej jakości sensorycznej przyznano sorbetowi wytworzonemu z użyciem technologii ciekłego azotu.
3. Fermentacja i rodzaj zastosowanej technologii mrożenia wpłynęły istotnie na zwiększenie aktywności przeciwutleniającej sorbetów w porównaniu z surowcem roślinnym.
4. Nie odnotowano statystycznego istotnego wpływu rodzaju zastosowanej technologii mrożenia sorbetów na wartość aktywności przeciwutleniającej gotowych wyrobów.

Literatura

- [1] Achuthan A.A., Duary R.K., Madathil A., Panwar H., Kumar H., Batish V.K., Grover S.: Antioxidative potential of lactobacilli isolated from the gut of Indian people. *Mol. Biol. Rep.*, 2012, 39, 7887-7897.
- [2] Akalin A.S., Kesenkas H., Dinkci N., Unal G., Kinik O.: Enrichment of probiotic ice cream with different dietary fibers: Structural characteristics and culture viability. *J. Dairy Sci.*, 2018, 101, 37-46.
- [3] Aleksandrak-Piekarczyk T., Koryszewska-Bagińska A., Bardowski J.: Genome sequence of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* (formerly *Lactobacillus casei*) LOCK908. *Genome Announ.*, 2013, 1 (4), 1-2.
- [4] Başıyigit G., Kuleşan H., Karahan A.G.: Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 33 (9), 796-800.
- [5] Berrizbeitia L., Calello D., Dhir N., O'Reilly C., Marcus S.: Liquid nitrogen ingestion followed by gastric perforation. *Pediatric Emergency Care*, 2010, 26 (1), 48-50.
- [6] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss.-Technol.*, 1995, 28, 25-30.
- [7] Chłopicka J., Bartoń H., Foltá M., Baster A.: Wpływ fermentacji mlekowej na aktywność antyoksydacyjną nasion i kiełków gryki (*Fagopyrum Esculentum*). *Bromat. Chem. Toksyk.*, 2016, XLIX (3), 243-247.
- [8] Clarke C.: *The Science of the Ice Cream*. 2nd ed. Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge 2015.
- [9] Favaro-Trindade C.S., de Carvalho J.C., Felix Dias P., AmaralSanino F., Boschini C.: Effects of culture, pH and fat concentration on melting rate and sensory characteristics of probiotic fermented yellow mombin (*Spondias mombin* L.) ice creams. *Food Sci. Technol. Int.*, 2007, 13 (4), 285-291.
- [10] Głuchowski A., Czarniecka-Skubina E.: Kuchnia modernistyczna w gastronomii. *Zesz. Nauk. Turystyka i Rekreacja*, 2016, 1 (17), 193-206.
- [11] ISO 13299:2016. Sensory analysis. Methodology. General guidance for establishing a sensory profile.
- [12] Kilara A., Chandan R.C.: Ice cream and frozen desserts. In: *Handbook of Food Products Manufacturing*. Ed. Y.H. Hui. John Wiley and Sons Inc., Hoboken 2006, pp. 593-633.
- [13] Kim H.S., Jeong S.G., Ham J.S., Chae H.S., Lee J.M., Ahn C.N.: Antioxidative and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* NLRI-312 isolated from Korean infant feces. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 2006, 19, 1335-1341.
- [14] Kusznierevich B., Śmiechowska A., Bartoszek A., Namieśnik J.: The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. *Food Chem.*, 2008, 108 (3), 853-861.
- [15] Ledeker C.N., Chambers D.H., Chambers I., Adhikari K.: Changes in the sensory characteristics of mango cultivars during the production of mango purée and sorbet. *J. Food Sci.*, 2012, 77 (10), S348-S355.
- [16] Lin M.Y., Chang F.J.: Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig. Dis. Sci.*, 2000, 45, 1617-1622.
- [17] Marshall R.T., Goff H.D., Hartel R.W.: *Ice Cream*. Springer Science+Business Media LLC, New York City 2003.
- [18] Michalczyk M., Kuczewski D.: Zmiany zawartości składników o charakterze prozdrowotnym w przechowywanych sorbetach z owoców jagodowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, 4 (83), 66-74.
- [19] Motyl I., Klewicka E., Libudzisz Z.: New strain of lactic acid bacteria *Lactobacillus casei*. Polish Patent Application 2009, PL382760 (A1)-2009-01-05.

- [20] Myhrvold N., Young Ch., Bilet M.: *Modernist Cuisine. The Art and Science of Cooking. Vol. 2: Techniques and Equipment.* The Cooking Lab LLC, Bellevue 2011.
- [21] Nousia F.G., Androukalis P.I., Fletouris D.J.: Survival of *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 in probiotic ice cream and its influence on sensory acceptability. *Int. J. Dairy Technol.*, 2011, 64 (1), 130-136.
- [22] Palka A.: 2015, Zmiany w preferencjach konsumentów na rynku lodów. *Handel Wewnętrzny*, 2015, 2 (355), 308-331.
- [23] Pavlyuk R.Y., Pogarskiy A.S., Kaplun O.A., Losyeva S.M.: Developing the cryogenic freezing technology of chlorophyll-containing vegetables. *Eastern-Eur. J. Enter. Technol.*, 2015, 6 (10), 42-47.
- [24] Pavlyuk R.Y., Pogarska V., Kakadii I., Pogarskiy A.S., Stukonozhenko T.: Influence of the processes of steam-thermal cryogenic treatment and mechanolysis on biopolymers and biologically active substances in the course of obtaining health promoting nanoproducts. *Eastern-Eur. J. Enter. Technol.*, 2017, 6 (11), 41-47.
- [25] Pavlyuk R., Pogarska V., Pavlyuk V., Pogarskiy A., Kakadii I., Stukonozhenko T., Telenkov O.: The development of new method of production of healthy ice-cream-sorbet of fruits and vegetables with a record bas content. *EUREKA: Life Sciences*, 2018, 6, 33-40.
- [26] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 stopni C.
- [27] Shen Q., Shang N., Li P.: *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Bifidobacterium animalis* 01 isolated from centenarians. *Curr. Microbiol.*, 2011, 62, 1097-1103.
- [28] Szydłowska A., Kołożyn-Krajewska D.: Zastosowanie bakterii potencjalnie probiotycznych do fermentacji przecieru z dyni. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 6 (73), 109-119.
- [29] Szydłowska A., Kołożyn-Krajewska D.: Development of potentially probiotic and synbiotic pumpkin frozen desserts. *CyTA J. Food*, 2019, 17(1), 251-259.
- [30] Woźniczko M., Orłowski D.: Kuchnia molekularna w restauracji z gwiazdką Michelin – „Atelier-Amaro” w Warszawie. *Zesz. Nauk. Turystyka i Rekreacja*, 2016, 1 (17), 161-191.
- [31] Yoon Y.H., Byun J.R.: Occurrence of glutathione sulphydryl (GHS) and antioxidant activities in probiotic *Lactobacillus* spp. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 2004, 17, 1582-1585.

EFFECT OF SELECTED FREEZING TECHNOLOGIES ON COUNT OF *LACTOBACILLUS CASEI* LOCK 0900, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND SENSORY CHARACTERISTICS OF FERMENTED PUMPKIN-BASED SORBETS

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the effect of some selected freezing technologies on the survival of the *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 probiotic bacterial strain, on the sensory quality and antioxidant activity of sorbets made from pumpkin flesh. The scope of study included: the production of three types of sorbets under the laboratory conditions, where the following was applied: (1) classical freezing, (2) dry ice and (3) liquid nitrogen; the determination of the count of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 bacteria strain in the product; the measurement of the pH value and the assessment of changes in the sensory quality of the products during their storage at -18 °C for 16 weeks. In addition, the antioxidant activity of the raw material and fresh, finished products was determined. It was found that, irrespective of the sorbets production technology used, the count of LAB bacteria decreased in the products (by ca. 1 logarithmic row) with the storage time passing, however when the liquid nitrogen and dry ice technology were used to freeze the products, more bacterial cells survived compared to the

classical method used. Also, the type of the technology applied to manufacture the sorbets determined the sensory quality of those desserts. The highest scores received the overall sensory quality of the products manufactured using the liquid nitrogen technology. Compared to the initial raw material, the finished products showed a significantly higher value of antioxidant activity and this increase was caused by the fermentation process.

Key words: pumpkin, sorbets manufacturing technologies, probiotics, sensory quality, antioxidant activity



BEATA ŁASZKIEWICZ, PIOTR SZYMAŃSKI,
DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA

**WPLYW WYBRANYCH SZCZEPÓW BAKTERII KWASU MLEKOWEGO
NA PRZYDATNOŚĆ TECHNOLOGICZNĄ I JAKOŚĆ
MIKROBIOLOGICZNĄ MIĘSA DROBIOWEGO
ODDZIELONEGO MECHANICZNIE**

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na przydatność technologiczną i trwałość mikrobiologiczną mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie (MDOM).

Materiał doświadczalny stanowiło mięso drobiowe MDOM, do którego dodano trzy szczepy bakterii kwasu mlekowego na poziomie 10^7 jtk/g – *Lactobacillus plantarum* SCH1 i *Lactobacillus brevis* KL5 wyizolowane z surowych wędlin dojrzewających oraz *Lactobacillus plantarum* S21 wyizolowany z serwatki kwasowej. Wariant kontrolny nie zawierał dodatku bakterii. Farsze z MDOM przechowywano w warunkach chłodniczych i badano po 1, 4 i 7 dniach przechowywania. Zakres badań obejmował oznaczenie: ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej, liczby *Escherichia coli*, liczby *Enterobacteriaceae*, obecności *Salmonella* spp., obecności *Campylobacter* spp. i liczby gronkowców koagulazododatnich oraz oznaczenie cech fizykochemicznych, tj. pH i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, zawartości azotanów (III) i (V) oraz ocenę barwy w systemie CIE $L^*a^*b^*$. Zastosowanie szczepów bakterii kwasu mlekowego w farszach z mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie nie wpłynęło negatywnie na ich przydatność technologiczną. Zaobserwowano pozytywny wpływ *Lactobacillus brevis* KL5 na kształtowanie barwy surowych farszów z MDOM. Wykazano hamujący wpływ *Lactobacillus plantarum* SCH1 na bakterie *Escherichia coli* oraz *Enterobacteriaceae* w surowych farszach z MDOM po 4 dniach chłodniczego przechowywania. Przeprowadzone badania umożliwiają stwierdzenie, że wybrane szczepy LAB wyizolowane z produktów pochodzenia zwierzęcego wpływają hamująco na wzrost drobnoustrojów w MDOM.

Słowa kluczowe: mięso drobiowe oddzielone mechanicznie (MDOM), przydatność technologiczna MDOM, bakterie kwasu mlekowego, jakość mikrobiologiczna MDOM

Mgr inż. B. Łaszkiewicz, dr inż. P. Szymański, Zakład Technologii Mięsa i Tłuszczu, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego, ul. Jubilerska 4, 04-190 Warszawa, prof. dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydz. Nauk o Żywnieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa. Kontakt: beata.laszkiewicz@ibprs.pl

Wprowadzenie

Mięso oddzielone mechanicznie (MOM) to produkt pozyskiwany z kości zwierząt rzeźnych lub ich fragmentów bądź z tusz drobiowych (MDOM) z naturalnie przyległą tkanką miękką w postaci fragmentów mięsa chudego, tłuszczu i tkanki łącznej, które oddzielane są od kości. MOM uzyskuje się za pomocą środków mechanicznych, co prowadzi do utraty lub modyfikacji struktury włókien mięśniowych [18, 38, 43]. W praktyce przemysłowej MOM otrzymywany jest najczęściej metodą naruszającą strukturę kości i metodą nienaruszającą tej struktury. W pierwszej metodzie kości są częściowo rozdrabniane, a tkanka miękka przyległa do kości wyciskana jest pod ciśnieniem $10 \div 40$ MPa przez głowice separujące oraz sita o małej średnicy otworów. W przypadku drugiej metody mięso oddziela się bez naruszenia struktury kości za pomocą wirującego bębna z perforacją [14, 20].

Mięso oddzielone mechanicznie jest surowcem tańszym od mięsa wykrawanego ręcznie i powszechnie stosowanym w przetwórstwie w kraju i na świecie [8, 24].

Zastosowanie MOM w przemyśle spożywczym to w dużej mierze produkcja pasztetów, konserw, kielbas drobno rozdrobnionych i homogenizowanych oraz wyrobów garmazeryjnych, np. hamburgerów czy krokietów [5, 46]. W ostatnich latach obserwuje się na świecie coraz większe spożycie mięsa drobiowego, co wiąże się ze wzrostem produkcji MDOM z kości drobiowych oraz jego wykorzystaniem w przemyśle [10].

W procesie separacji mięsa od kości następuje duże rozdrobnienie surowca, zanik struktury tkankowej oraz napowietrzenie, co sprzyja wzrostowi zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Ponadto surowiec do produkcji mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie (MDOM) może zawierać stosunkowo wysoką liczbę drobnoustrojów, w tym patogennych, szczególnie z rodziny *Enterobacteriaceae*. W mikroflorze MOM mogą być obecne bakterie chorobotwórcze, jak: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, jak również bakterie saprofityczne, głównie z rodzaju *Pseudomonas*, przyspieszające psucie mięsa [8, 21].

W badaniach Michalskiego i Pomykały [21, 36] wykazano w 46 partiach MDOM z krajowych zakładów przemysłowych obecność *Salmonella* spp. w 25 g. W 58 % prób MDOM stwierdzono obecność beztlenowych bakterii przetrwalnikujących w 0,01 g, w 87 % prób stwierdzono obecność bakterii z grupy coli w 0,001 g, a w 76 % badanych prób były obecne gronkowce koagulazo-dodatnie w 0,1 g.

Do najczęściej stosowanych metod utrwalania mięsa oddzielonego mechanicznie można zaliczyć mrożenie i peklowanie, jednak ich stosowanie wiąże się z pewnymi ograniczeniami. Proces mrożenia powoduje pogorszenie cech sensorycznych i technologicznych surowca [45]. Zastosowanie peklowania może być natomiast niewystarczające w związku z planowanymi zmianami w zakresie obniżania poziomu stosowania

azotanów(III) w produkcji żywności [12, 18]. Celowe wydaje się zatem poszukiwanie nowych, szybkich metod i sposobów jego konserwacji.

Bakterie kwasu mlekowego (ang. *lactic acid bacteria*, LAB) mogą mieć szerokie zastosowanie w bioprotekcyj, ponieważ w naturalny sposób są w stanie zdominować mikroflorę wielu produktów spożywczych w czasie ich przechowywania [2, 25, 37]. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa szczepów LAB przypisywana jest m.in. pozakomórkowym substancjom białkowym [37, 39]. Bakterie kwasu mlekowego są powszechnie stosowane do produkcji wędlin surowych dojrzewających. Nowym kierunkiem jest próba zastosowania LAB, m.in. *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* do zwiększenia trwałości i bezpieczeństwa zdrowotnego wyrobów surowych (metki i tataru). Prowadzone są także badania nad zastosowaniem wybranych szczepów LAB w bioprotekcyj wędlin parzonych plastrowanych [4, 11].

Mięso oddzielone mechanicznie jest surowcem o niższej jakości pod względem mikrobiologicznym, fizykochemicznym i technologicznym w porównaniu z mięsem wykrawanym ręcznie [3, 22]. Zastosowanie bakterii kwasu mlekowego w MOM może być alternatywą dla aktualnie stosowanych metod konserwowania lub dodatkowym elementem w technologii płatków podwyższających jego jakość [1, 18].

Celem pracy była ocena wpływu zastosowania wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na trwałość mikrobiologiczną i przydatność technologiczną mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie (MDOM).

Material i metody badań

Badania przeprowadzono na mięsie drobiowym oddzielonym mechanicznie z korpusów kurczaków, wytworzonym w warunkach przemysłowych w separatorze (AM2C, Francja) techniką naruszającą strukturę kości (średnica otworów 1 mm). MDOM transportowany był w postaci zamrożonej (-18 °C). Doświadczalne produkcje farszów z MDOM przeprowadzono w hali póltechnicznej Zakładu Technologii Mięsa i Tłuszczu Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie.

Do badań zastosowano trzy szczepy bakterii kwasu mlekowego: *Lactobacillus plantarum* SCH1 i *Lactobacillus brevis* KL5 wyizolowane z surowych wędlin dojrzewających oraz *Lactobacillus plantarum* S21 wyizolowany z serwatki kwasowej. Szczepy pochodziły z kolekcji mikroorganizmów Zakładu Higieny i Zarządzania Jakością Żywności SGGW i zostały wybrane na podstawie badań Rzepkowskiej i wsp. [39, 40]. Bakterie po namnożeniu w bulionie MRS (Merck, Polska) były odwirowywane w wirówce (4500 obr./min, 2313 × g) typu J2-21 (Beckman, Dania) po zakończeniu drugiego pasaży i zawieszane w roztworze soli fizjologicznej (0,9 %). W takiej formie bakterie były wprowadzane do farszów z MDOM. Wariant kontrolny (K) nie zawierał dodatku bakterii kwasu mlekowego. Warianty doświadczalne zawierały dodatek bakte-

rii: L1 – *Lactobacillus plantarum* SCH1 w ilości 10^7 jtk/g, L2 – *Lactobacillus brevis* KL5 w ilości 10^7 jtk/g i L3 – *Lactobacillus plantarum* S21 w ilości 10^7 jtk/g.

MDOM z biomasa bakteryjną mieszano w mieszalce (Keripar, USA) przez 3 min i zamykano w puszkach o gramaturze 190 g w celu ograniczenia zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Następnie puszki przechowywano w temp. 4 °C przez 7 dni. Badania wykonywano po 1, 4 i 7 dniach chłodniczego przechowywania. W próbkach farszy oznaczano:

- pH [35] elektrodą In Lab Cool (Mettler Toledo, Szwajcaria) i potencjał oksydacyjno-redukcyjny elektrodą InLab Redox Pro (Mettler Toledo, Szwajcaria) w aparacie Mettler Delta 350 (Mettler Toledo, Szwajcaria). Pomiar wykonywano w roztworze przygotowanym przez zhomogenizowanie 10 g farszu MDOM z 50 ml wody destylowanej w ciągu 1 min przy prędkości noży 14000 obr./min przy użyciu blendera (Bosch, Niemcy),
- zawartość azotanów (III) i (V) [28] z modyfikacją [41] oznaczano przy użyciu modułowego chromatografu cieczowego (Agilent Technologies, Niemcy),
- składowe barwy w systemie CIE $L^*a^*b^*$ – spektrofotometrem odbiciowym Minolta CR-300 (Minolta, Japonia). Pomiar wykonywano przy następujących ustawieniach: obserwator standardowy CIE 2°, iluminant D65, obszar pomiaru 8 mm. Jako źródło odniesienia zastosowano wzorzec bieli ($L^* = 95,87$, $a^* = -0,49$, $b^* = 2,39$).

Zakres badań mikrobiologicznych MDOM określano na podstawie badań wstępnych, które obejmowały:

- ogólną liczbę drobnoustrojów w 1 g (pożywka PCA, inkubacja 30 ± 1 °C, 72 ± 3 h) [30],
- liczbę mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej w 1 g (pożywka MRS, inkubacja 30 ± 1 °C, 72 ± 3 h) [33],
- liczbę *Escherichia coli* w 1 g (podłoże agar TBX, inkubacja 44 ± 1 °C, 18 - 24 h) [29],
- liczbę *Enterobacteriaceae* w temp. 37 °C w 1 g (podłoże VRBD, inkubacja 37 ± 1 °C, 24 ± 2 h) [34],
- obecność *Salmonella* spp. w 25 g (inkubacja w workach w zbuforowanej wodzie peptonowej (WPZ), 37 ± 1 °C, 18 ± 2 h. Po inkubacji posiew 0,1 ml do RVS – inkubacja $41,5 \pm 1$ °C, 24 ± 3 h oraz posiew 1,0 ml do MKTT – inkubacja 37 ± 1 °C, 24 ± 3 h. Po inkubacji posiew na pożywki stałe: XLD i RA, inkubacja 37 ± 1 °C, 24 ± 3 h) [31],
- obecność *Campylobacter* spp. w 25 g (inkubacja w atmosferze mikroaerofilnej w 37 ± 1 °C, 4 - 6 h, na pożywce płynnej BOLTON. Następnie inkubacja w temp. $41,5 \pm 1$ °C, 44 ± 4 h. Do wykrywania obecności *Campylobacter* zastosowano szybki test serologiczny Singlepath *Campylobacter*) [27],

- liczbę gronkowców koagulazododatnich w 1 g (pożywka agarowa z plazmą króliczą i fibrynogenem (RPF), inkubacja 37 ± 1 °C, 18 - 24 h) [32].

Do oznaczeń pobierano 10 g próbki w przypadku oznaczeń ilościowych lub 25 g w przypadku oznaczeń jakościowych po wymieszaniu produktu i zawieszano w 100 ml wody peptonowej, następnie wykonywano szereg rozcieńczeń i wysiewano na poszczególne podłoża.

W przypadku, gdy w MDOM nie stwierdzono obecności wybranych drobnoustrojów, nie oznaczano ich w dalszym etapie badań przechowalniczych.

Doświadczenia przeprowadzono w trzech równoległych powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statgraphics Plus 4.1. Wykonano jednoczynnikową analizę wariancji, a istotność różnic między wartościami średnimi weryfikowano testem Fishera ($p \leq 0,05$).

Wyniki i dyskusja

Wartość pH farszów z mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie (MDOM) była stosunkowo wysoka ($6,70 \div 7,09$) w porównaniu z mięsem wykrawanym ręcznie, którego pH kształtuje się na poziomie $5,9 \div 6,2$ [16]. Ta kwasowość surowca wynikała ze zwiększonej zawartości szpiku kostnego w MDOM pochodzącego ze wstępnie rozdrabnianych kości. Wartość pH szpiku kostnego wynosi $6,8 \div 7,4$. Mięso drobiowe oddzielone mechanicznie charakteryzuje pH między 6,5 a 7,0 [47]. Zbliżoną kwasowość MDOM (6,88) wykazali Stangierski i wsp. [42].

Stwierdzono, że pH farszów z MDOM obniżało się podczas chłodniczego przechowywania. Największą dynamikę wzrostu kwasowości farszów z MDOM obserwowano między 1. a 4. dniem przechowywania (tab. 1). Różnice kwasowości farszów z MDOM stwierdzone w poszczególnych okresach przechowywania były niewielkie, choć w niektórych przypadkach statystycznie istotne ($p \leq 0,05$). Zastosowanie bakterii kwasu mlekowego wpłynęło istotnie ($p \leq 0,05$) na obniżenie pH po jednym dniu przechowywania w przypadku wariantu L1 ze szczepem *Lactobacillus plantarum* SCH1 (tab. 1). Po 4 dniach przechowywania we wszystkich wariantach próbek kwasowość farszów z MDOM była zbliżona ($6,79 \div 6,80$), natomiast po 7 dniach przechowywania najniższe pH stwierdzono w farszu L1 z dodatkiem *L. plantarum* SCH1 (6,72) oraz w wariantcie K (6,70). Biorąc pod uwagę, że stwierdzone różnice pH między wariantami w trzech okresach przechowywania były niewielkie ($0,01 \div 0,09$) można wnioskować, że nie miały one wpływu na przydatność technologiczną farszów w zakresie wodochłonności surowca.

Tabela 1. Wartości pH i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego (ORP) farszów z MDOM podczas chłodniczego przechowywania

Table 1. Values of pH and oxidation-reduction potential (ORP) of MSPM forcemeats during cold storage

Parametr Parameter	Próba / Sample	Czas przechowywania [dni] / Storage time period [days]		
		1	4	7
pH	K	7,08 ^{bC} ± 0,02	6,80 ^{aB} ± 0,01	6,70 ^{aA} ± 0,01
	L1	7,03 ^{aC} ± 0,03	6,79 ^{aB} ± 0,01	6,72 ^{aA} ± 0,01
	L2	7,08 ^{bB} ± 0,02	6,80 ^{aA} ± 0,01	6,79 ^{bA} ± 0,02
	L3	7,09 ^{bB} ± 0,02	6,80 ^{aA} ± 0,02	6,78 ^{bA} ± 0,02
ORP [mV]	K	324,4 ^{bA} ± 6,6	336,7 ^{bA} ± 8,1	326,6 ^{bA} ± 2,3
	L1	314,9 ^{abA} ± 5,2	315,3 ^{aA} ± 1,8	313,8 ^{aA} ± 1,2
	L2	321,3 ^{bA} ± 4,1	317,4 ^{aA} ± 2,9	317,1 ^{aA} ± 1,2
	L3	304,8 ^{aA} ± 6,0	316,7 ^{aB} ± 0,4	317,4 ^{aB} ± 5,2

Objaśnienia / Explanatory notes:

K – próba kontrolna / control sample; L1 – MDOM z *Lactobacillus plantarum* SCH1 / MSPM with *Lactobacillus plantarum* SCH1; L2 – MDOM z *Lactobacillus brevis* KL5 / MSPM with *Lactobacillus brevis* KL5; L3 – MDOM z *Lactobacillus plantarum* S21 / MSPM with *Lactobacillus plantarum* S21. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; n = 3; a, b – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / mean values in columns denoted by different letters differ statistically significantly ($p \leq 0,05$); A, B, C – wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / mean values in rows denoted by different letters differ statistically significantly ($p \leq 0,05$).

W badaniach Szymańskiego i wsp. [44] obserwowano istotny wpływ wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na kwasowość farszów z mięsa rozdrobnionego z szynki wieprzowej. MDOM różni się składem chemicznym od mięsa wykrawanego ręcznie. Charakteryzuje się m.in. dużą zawartością tłuszczu i kolagenu, a niską aktywnością wody [21, 22, 47]. Można przypuszczać, że środowisko, w którym znalazły się bakterie kwasu mlekowego, było niekorzystne dla ich rozwoju. Stosunkowo mała zawartość cukrów w MDOM mogła mieć również wpływ na ograniczoną produkcję wybranych metabolitów, w tym kwasu mlekowego, przez zastosowane LAB [15].

Podczas całego okresu przechowywania stwierdzono istotny wzrost potencjału oksydacyjno-redukcyjnego tylko w wariancie L3 (o 12,6 mV) ($p \leq 0,05$). W pozostałych wariantach doświadczalnych średnie wartości potencjału redox nie zmieniły się istotnie ($p > 0,05$) w czasie przechowywania, co wskazuje na stabilność oksydacyjną farszów z MDOM. Po 4 i 7 dniach przechowywania w wariantach z dodatkiem bakterii kwasu mlekowego wartość potencjału redoks była na niższym poziomie niż w wariancie K (tab. 1). Podobną zależność wykazali Wójciak i wsp. [48], którzy zastosowali bakterie kwasu mlekowego (*L. casei* LOCK 0900) do kiełbas surowych dojrzewają-

cych niepeklowanych. Obserwowali niższe wartości potencjału redoks po dojrzewaniu kielbas w próbach z dodatkiem LAB w porównaniu z wariantem kontrolnym.

Nie stwierdzono obecności NaNO_3 i NaNO_2 w farszach z MDOM, co wskazywało na brak zanieczyszczeń surowca tymi związkami. Azotany(V) mogą występować w mięsie przerobowym i kulinarnym, w szczególności wołowym i wieprzowym [7, 9]. Lammarino i Taranto [17] stwierdzili obecność azotanu(V) w mięsie wieprzowym na poziomie $10,2 \div 14,8$ mg/kg, a w mięsie wołowym – $10,8 \div 15,0$ mg/kg.

W próbie L2, w której zastosowano *Lactobacillus brevis* KL5, zaobserwowano najwyższy udział barwy czerwonej $a^* = 22,76$ w tonie barwy (tab. 2). Wysoka wartość parametru a^* farszu z MDOM (L2) wskazywała na udział *L. brevis* KL5 w procesach barwotwórczych zachodzących w mięsie. Mogło to być związane z mechanizmem syntezy NO z L-argininy przez bakterie kwasu mlekowego. Wykazano, że niektóre szczepy bakterii kwasu mlekowego wytwarzają NO poprzez syntezę z L-argininy. W przypadku bakterii tlenek azotu(II) pełni szereg istotnych funkcji – jest cząsteczką sygnałową, aktywuje lub dezaktywuje enzymy. Mechanizm przekształcania L-argininy w przemianach komórki bakteryjnej polega na utlenieniu z udziałem tlenu cząsteczkowego grupy iminowej reszty guanidynowej L-argininy. Reakcja zachodzi dwuetapowo. W pierwszym etapie L-arginina jest hydroksylowana z udziałem tlenu i koenzymu (NADPH), następnie powstały związek pośredni utleniany jest do cytruliny i tlenu azotu. Reakcja katalizowana jest przez kilka izoform enzymu syntazy tlenu azotu [6, 23, 49]. Niektóre szczepy LAB wykazują zdolność do przemiany formy barwnika z MbFe^{3+} do MbFe^{2+} , co wpływa na zmianę barwy mięsa surowego niepeklowanego z brązowej na jasnoczerwoną [19, 50].

Najniższy udział składowych barw $a^* = 19,45$ i $b^* = 8,38$ oraz statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) najwyższą wartość parametru $L^* = 53,88$ (opisującego jasność wyrobu) po 7 dniach przechowywania zaobserwowano w wariacie L1 z *Lactobacillus plantarum* SCH1. W farszach L1 i L3 po 4 dniach przechowywania jasność L^* istotnie obniżyła się, a następnie po 7 dniach przechowywania istotnie wzrosła ($p \leq 0,05$) – tab. 2.

W badaniach wstępnych jakości mikrobiologicznej MDOM wykazano, że surowiec nie spełniał kryterium wymaganego w normie PN-A-86522:1992 [26] pod względem zawartości ogólnej liczby drobnoustrojów ($6,30 \log \text{ jtk/g}$) oraz obecności pałeczek z grupy *coli* (liczba *Escherichia coli* wynosiła $2,04 \log \text{ jtk/g}$). Norma dopuszczała ogólną liczbę drobnoustrojów na poziomie $1 \times 10^6 \text{ jtk/g}$, a pałeczki z grupy *coli* nieobecne w $0,001 \text{ g}$. W surowcu nie wykryto obecności *Salmonella* spp. oraz *Campylobacter* spp., a liczba gronkowców koagulazo-dodatnich wynosiła $< 10 \log \text{ jtk/g}$. Ponadto oznaczono liczbę *Enterobacteriaceae* na poziomie $3,83 \log \text{ jtk/g}$. W badaniach wstępnych oznaczono także liczbę mezofilnych bakterii kwasu mlekowego, która wynosiła $4,18 \log \text{ jtk/g}$.

Tabela 2. Wartości parametrów barwy L* a* b* farszów z MDOM po 1, 4 i 7 dniach przechowywania

Table 2. Values of L* a* b* colour parameters of MSPM forcemeat after 1, 4 and 7 days of storage

Parametr Parameter	Próba / Sample n = 15	Czas przechowywania [dni] / Storage time period [days]		
		1	4	7
L*	K	51,82 ^{aA} ± 0,68	51,86 ^{aA} ± 0,96	51,59 ^{aA} ± 0,79
	L1	53,95 ^{cB} ± 1,17	52,64 ^{aA} ± 1,27	53,88 ^{cB} ± 1,02
	L2	53,15 ^{bA} ± 1,25	52,36 ^{aA} ± 0,96	53,11 ^{bA} ± 1,27
	L3	55,33 ^{dC} ± 0,77	51,98 ^{aA} ± 1,49	53,16 ^{bcB} ± 0,72
a*	K	18,38 ^{aA} ± 0,75	22,60 ^{bC} ± 1,51	20,22 ^{abB} ± 1,16
	L1	19,74 ^{bAB} ± 1,71	20,76 ^{aB} ± 1,27	19,45 ^{aA} ± 1,10
	L2	20,39 ^{bA} ± 1,20	20,87 ^{aA} ± 1,55	22,76 ^{cB} ± 1,37
	L3	18,59 ^{aA} ± 1,23	21,49 ^{aB} ± 1,39	20,71 ^{bB} ± 1,02
b*	K	8,96 ^{aB} ± 0,53	9,29 ^{aB} ± 0,65	8,41 ^{aA} ± 0,87
	L1	9,20 ^{aB} ± 0,52	9,01 ^{aB} ± 0,92	8,38 ^{aA} ± 0,81
	L2	9,41 ^{aAB} ± 0,72	8,85 ^{aA} ± 0,99	9,60 ^{cB} ± 0,66
	L3	9,02 ^{aA} ± 0,92	9,52 ^{aA} ± 0,53	9,06 ^{bA} ± 0,43

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

We wszystkich farszach z MDOM w czasie przechowywania obserwowano wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów. W przypadku wariantów z dodatkiem bakterii kwasu mlekowego ogólna liczba drobnoustrojów była wyższa z powodu wprowadzenia do farszów z MDOM szczepów LAB (tab. 3).

W farszach, do których wprowadzono LAB (L1, L2, L3), liczba bakterii kwasu mlekowego utrzymywała się na zbliżonym poziomie w całym okresie przechowywania. Podczas przechowywania chłodniczego obserwowano stopniowe hamowanie wzrostu *E. coli* w farszu L1 z *Lactobacillus plantarum* SCH1 (tab. 3).

Zastosowanie *Lactobacillus plantarum* SCH1 wpłynęło również hamująco na rozwój *Enterobacteriaceae* po 4 dniach przechowywania. Istotnie najniższą liczbę *Enterobacteriaceae* (4,56 log jtk/g) po 4 dniach przechowywania stwierdzono w wariantcie L1, w którym zastosowano *Lactobacillus plantarum* SCH1, natomiast w tym samym czasie w wariantcie kontrolnym oznaczono *Enterobacteriaceae* na poziomie 6,26 log jtk/g (tab. 3).

Można przypuszczać, że inhibujące działanie względem niekorzystnej mikroflory było związane z produkcją bakteriocyn (plantarycyny) i/lub innych metabolitów uwalnianych poza komórkę bakterii [13, 40]. Źródło wyizolowania, jakim było środowisko mięsne, prawdopodobnie miało wpływ na łatwiejszą adaptację *Lactobacillus plantarum* SCH1 do warunków panujących w farszu z MDOM w porównaniu ze szczepem *Lactobacillus plantarum* S21 wyizolowanym z serwatki kwasowej.

Tabela 3. Jakość mikrobiologiczna farszów z MDOM po 1, 4 i 7 dniach chłodniczego przechowywania
 Table 3. Microbiological quality of stuffings with MSPM after 1, 4 and 7 days of cold storage

Parametr / Parameter	Próba Sample n = 15	Czas przechowywania [dni] Storage time period [days]		
		1	4	7
Ogólna liczba drobnoustrojów w temp. 30 °C [log jtk/g] Total bacterial count at 30 °C [log CFU/g]	K	6,93 ^{aA} ± 6,07	7,03 ^{aA} ± 6,32	7,99 ^{aB} ± 7,05
	L1	7,94 ^{dA} ± 6,81	8,28 ^{dB} ± 7,00	8,41 ^{cC} ± 7,32
	L2	7,62 ^{cA} ± 6,74	8,01 ^{cB} ± 6,83	8,31 ^{cC} ± 7,61
	L3	7,40 ^{bA} ± 5,76	7,89 ^{bB} ± 6,42	8,27 ^{bC} ± 7,06
Liczba mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej [log jtk/g] Mesophilic lactic acid bacteria count [log CFU/g]	K	4,26 ^{aB} ± 3,00	4,07 ^{bA} ± 2,76	4,12 ^{aA} ± 3,46
	L1	7,84 ^{dA} ± 6,75	7,85 ^{dA} ± 6,00	7,78 ^{cA} ± 6,79
	L2	7,37 ^{cA} ± 5,76	7,45 ^{cB} ± 6,30	7,32 ^{bA} ± 6,42
	L3	7,26 ^{bA} ± 0,00	7,28 ^{bA} ± 6,00	7,43 ^{bB} ± 6,18
Liczba <i>Escherichia coli</i> [log jtk/g] <i>Escherichia coli</i> count [log CFU/g]	K	2,32 ^{bB} ± 1,49	2,32 ^{bB} ± 1,42	< 1,00 ^{aA}
	L1	2,28 ^{bC} ± 1,30	2,10 ^{aB} ± 1,32	1,94 ^{bA} ± 0,76
	L2	2,03 ^{aAB} ± 1,18	2,09 ^{aB} ± 1,40	1,85 ^{bA} ± 1,30
	L3	2,15 ^{aB} ± 1,24	2,32 ^{bC} ± 1,00	< 1,00 ^{aA}
Liczba <i>Enterobacteriaceae</i> [log jtk/g] <i>Enterobacteriaceae</i> count [log CFU/g]	K	3,94 ^{aA} ± 2,67	6,26 ^{dB} ± 5,18	6,61 ^{aC} ± 5,75
	L1	3,94 ^{aA} ± 2,64	4,56 ^{aA} ± 3,58	6,65 ^{aB} ± 5,82
	L2	4,29 ^{cA} ± 3,18	5,94 ^{bA} ± 4,62	6,97 ^{bB} ± 5,88
	L3	4,07 ^{bA} ± 3,06	6,03 ^{cB} ± 4,76	6,63 ^{aC} ± 5,42

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Rzepkowska i wsp. [39, 40], w badaniach metodą dyfuzyjno-krażkową na płytkach z selektywnym podłożem, obserwowali wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową szczepów LAB (m.in. *L. plantarum* SCH1 i *L. brevis* KL5 oraz *L. plantarum* S21) w stosunku do *E. coli* i *Pseudomonas fluorescens*. Aktywność przeciwdrobnoustrojową zastosowanych szczepów LAB potwierdzono w badaniach własnych na modelowych farszach z MDOM w odniesieniu do *E. coli*. Po 7 dniach przechowywania w ocenie technologicznej farszów z MDOM stwierdzono nieakceptowany zapach świadczący o zepsuciu surowca. Liczba bakterii *E. coli* w tym czasie była najniższa w każdym z wariantów w porównaniu do liczby tych bakterii po 1 i 4 dniach przechowywania. Zmiany liczby bakterii *E. coli* po 7 dniach przechowywania mogły być spowodowane zdominowaniem mikroflory farszów z MDOM przez inne drobnoustroje obecne w farszach. Wskazywała na to wysoka ogólna liczba drobnoustrojów w tym okresie przechowywania (tab. 3).

Trudno porównywać uzyskane wyniki jakości mikrobiologicznej farszów z wymaganiami normy PN-A-86522:1992 [26], ponieważ nie przewidziano w niej zabezpieczenia surowca z zastosowaniem bioprotekcji, a wprowadzenie LAB do MDOM spowodowało wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów. Po 7-dniowym okresie przechowywania

wywania we wszystkich wariantach z dodatkiem LAB ogólna liczba drobnoustrojów przekraczała granicę dopuszczoną w normie, a liczba *E. coli* wynosiła $2,09 \div 2,32 \log \text{ jtk/g}$ (tab. 3). W przypadku bakterii z grupy *coli* obserwowano stopniową redukcję liczby *E. coli* w farszu L1, niemniej nie zostało spełnione kryterium założone w normie.

Kolejnym etapem pracy będzie przeprowadzenie badań w kierunku oceny przydatności wybranych szczepów LAB w biokonserwacji farszów z MDOM peklowanych z zastosowaniem obniżonej dawki azotanu(III) sodu.

Wnioski

1. Zastosowanie szczepów bakterii kwasu mlekowego w farszach z mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie nie wpłynęło negatywnie na ich przydatność technologiczną.
2. Zaobserwowano pozytywny wpływ *Lactobacillus brevis* KL5 na kształtowanie barwy surowych farszów z MDOM.
3. Wykazano hamujący wpływ *Lactobacillus plantarum* SCH1 na bakterie *E. coli* oraz *Enterobacteriaceae* w surowych farszach z MDOM po 4 dniach chłodniczego przechowywania.
4. Przeprowadzone badania wskazują, że wybrane szczepy LAB wyizolowane z produktów pochodzenia zwierzęcego wpływają hamująco na wzrost drobnoustrojów w MDOM.

Badania sfinansowano ze środków statutowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie.

Literatura

- [1] Angmo K., Kumari A., Savitri M., Bhalla T.Ch.: Antagonistic activities of lactic acid bacteria from fermented foods and beverage of Ladakh against *Yersinia enterocolitica* in refrigerated meat. Food Biosci., 2016, 13, 26-31.
- [2] Balciunas E.M., Martinez F.A.C., Todorov S.D., Gombossy de Melo Franco B.D., Converti A., Pinheiro de Souza Oliveira R.: Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. Food Control, 2013, 32(1), 134-142.
- [3] Branscheid W., Judas M., Höreth R.: The morphological detection of bone and cartilage particles in mechanically separated meat. Meat Sci., 2009, 81, 46-50.
- [4] Bredholt S., Nesbakken T., Holck A.: Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. Int. J. Food Microbiol., 2001, 66, 191-196.
- [5] Cegiełka A., Kuczyńska N., Pietrzak D.: Zastąpienie surowca wieprzowo-wołowego w kielbasach homogenizowanych przez mięso drobiowe oddzielone mechanicznie, uzyskane po separacji wysoko- i niskociśnieniowej. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2014, 3 (94), 123-135.

- [6] Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J.A., Steele J.L.: Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw*, 1999, 76, 217-246.
- [7] Cierach M.: Azotyny w procesie peklowania mięsa – funkcje, aspekty zdrowotne, peklowanie bezazotynowe. Część I. *Gospodarka Mięsna*, 2007, 59 (4), 24-27.
- [8] Daros F.G., Masson M.L., Amico S.C.: The influence of the addition of mechanically deboned poultry meat on the rheological properties of sausage. *J. Food Eng.*, 2005, 68, 185-189.
- [9] Duda Z.: Wybrane zagadnienia stosowania azotynu w przetwórstwie mięsa. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1998, 3 (16), 5-42.
- [10] Dybowski M.: Rynek mięsa drobiowego i jaj. *Biuletyn Miesięczny, Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej*, 2019, 2 (336), 56-61.
- [11] Enan G.: Behaviour of *Listeria monocytogenes* LMG 10470 in poultry meat and its control by the bacteriocin Plantaricin UG 1. *Int. J. Poult. Sci.*, 2006, 5, 355-359.
- [12] Food Chain Evaluation Consortium: Study on the monitoring of the implementation of Directive 2006/52/EC as regards the use of nitrites by industry in different categories of meat products. Final report, 2016.
- [13] Gong H., Meng X., Wang H.: Mode of action of plantaricin MG, a bacteriocin active against *Salmonella Typhimurium*. *J. Basic Microbiol.*, 2010, 50, 37-45.
- [14] Groves K.: Evaluation of simple microscopy protocol for identifying mechanically separated meat in pork, chicken and turkey. *Leatherhead Food Res.*, 2011, 8, 1-52.
- [15] Kołożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J.: Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochem*, 2012, 47, 1761-1772.
- [16] Kondratowicz J., Chwastowska-Siwiecka I., Burczyk E., Piekarska J., Kułdo Ż.: Ocena sensoryczna i mikrobiologiczna mięśni piersiowych indyczek w zależności od metody i czasu przechowywania chłodniczego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, 3 (76), 143-152.
- [17] Lammario M., Di Taranto A.: Nitrite and nitrate in fresh meats: A contribution to the estimation of admissible maximum limits to introduce in directive 95/2/EC. *Food Sci. Technol. Int.*, 2012, 47, 1852-1858.
- [18] Łaszkiewicz B., Szymański P., Kołożyn-Krajewska D.: Problemy jakości mięsa oddzielonego mechanicznie. *Med. Weter*, 2019, 75 (3), 131-137.
- [19] Li P., Luo H., Kong B., Liub Q., Chen C.: Formation of red myoglobin derivatives and inhibition of spoilage bacteria in raw meat batters by lactic acid bacteria and *Staphylococcus xylosum*. *LWT - Food Sci. Technol.*, 2016, 68, 251-257.
- [20] Magda F.: Separatory MOM w przemyśle mięsnym. *Gospodarka Mięsna*, 2012, 4, 18-22.
- [21] Michalski M.: Charakterystyka podstawowego składu mięsa drobiowego uzyskanego z mechanicznego odkastniania. *Rocz. Inst. Przem. Mięs.*, 2006, 56, 67-68.
- [22] Michalski M.: Wymagania i ocena jakościowa mięsa oddzielonego mechanicznie otrzymywanego techniką niszczącą oraz techniką nienaruszającą struktury kości. XXXII Dni Przemysłu Mięsnego IBPRS pt. „Postęp w nauce o mięsie i technologii oraz nowe regulacje prawne w przemyśle mięsnym”. IBPRS, Warszawa 2009, ss. 6-15.
- [23] Morita H., Yoshikawa H., Sakata R., Nagata Y., Tanaka H.: Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidinonitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum*. *J. Bacteriol.*, 1997, 179 (24), 7812-7815.
- [24] Pereira A.G.T., Ramos E.M., Teixeira J.T., Pereira Cardoso G., Ramos A.L.S., Fontes P.R.: Effects of the addition of mechanically deboned poultry meat and collagen fibers on quality characteristics of frankfurter-type sausages. *Meat Sci.*, 2011, 89, 519-525.
- [25] Plessas S., Nouska Ch., Karapetsas A., Kazakos S., Alexopoulos A., Mantzourani I., Chondrou P., Fournomiti M., Galanis A., Bezirtzoglou E.: Isolation, characterization and evaluation of the pro-

- biotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese. Food Chem., 2007, 226, 102-108.
- [26] PN-A-86522:1992. Mięso drobiowe oddzielone mechanicznie.
- [27] PN-EN ISO 10272-1:2017-08. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Campylobacter* spp. Część 1. Metoda wykrywania.
- [28] PN-EN 12014-3:2006. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie zawartości azotanów i/lub azotynów. Część 3. Spektrometryczne oznaczanie zawartości azotanów i azotynów w produktach mięsnych po enzymatycznej redukcji azotanów do azotynów
- [29] PN-EN ISO 16649-2:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby β -glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 2. Metoda płytkowa w temperaturze 44 °C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo β -D-glukuronidu.
- [30] PN-EN ISO 4833-1:2013-12. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Część 1. Oznaczanie liczby metodą posiewu zalewowego w temperaturze 30 °C.
- [31] PN-EN ISO 6579-1:2017-04. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania, oznaczania liczby i serotypowania *Salmonella*. Część 1. Wykrywanie *Salmonella* spp.
- [32] PN-EN ISO 6888-2:2001. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków). Część 2. Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej z plazmą króliczą i fibrynogenem.
- [33] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.
- [34] PN-EN ISO 21528-2:2017-08. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae*. Część 2. Metoda liczenia kolonii.
- [35] PN-ISO 2917:2001. Mięso i przetwory mięsne. Pomiar pH. Metoda odwoławcza.
- [36] Pomykała R., Michalski M.: Jakość mikrobiologiczna mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie. Acta Sci. Polonorum, Medicina Veterin., 2008, 7 (4), 43-49.
- [37] Pothakos V., Devlieghere F., Villani F., Björkroth J., Ercolini D.: Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. Meat Sci., 2015, 109, 66-74.
- [38] Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. Dz. U. L 139, ss. 55-205, z 30.04.2004.
- [39] Rzepkowska A., Zielińska D., Ołdak A., Kołożyn-Krajewska D.: Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties. Int. J. Food Sci. Technol., 2017, 52 (9), 1983-1994.
- [40] Rzepkowska A., Zielińska D., Ołdak A., Kołożyn-Krajewska D.: Safety assessment and antimicrobial properties of the lactic acid bacteria strains isolated from Polish raw fermented meat products. Int. J. Food Prop., 2017, 20 (11), 2736-2747.
- [41] Siu D., Henshall A.: Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products. J. Chromatog., 1998, 804, 156-160.
- [42] Stangierski J., Baranowska H.M., Rezler R., Kijowski J.: Enzymatic modification of protein preparation obtained from water-washed mechanically recovered poultry meat. Food Hydrocolloid, 2008, 22, 1629-1636.
- [43] Szymański P., Łaszkiewicz B.: Problemy w identyfikacji mięsa oddzielonego mechanicznie. Gospodarka Mięsna, 2017, 12, 30-36.
- [44] Szymański P., Łaszkiewicz B., Maszewska A., Kern-Jędrychowski J., Moch P.: Sprawozdanie z realizacji tematu BST o symbolu: 500-01-ZMT-03 pt. Wpływ wybranych szczepów bakterii denitryfikujących i kwasu mlekowego zastosowanych w procesie peklowania mięsa z obniżoną dawką

- azotanu(III) sodu na wybrane cechy jakościowe modelowego produktu mięsnego poddanego obróbce cieplnej. Warszawa 2017.
- [45] Thielke S., Lhaft S.K., Kühne M.: Effects of aging prior to freezing on poultry meat tenderness. *Poul. Sci.*, 2005, 84 (4), 607-612.
- [46] Tolik D., Słowiński M., Desperak K.: Wpływ zastosowania drobiowego mięsa oddzielonego mechanicznie oraz mięsa odścięgniętego na jakość pasztetów sterylizowanych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, 5 (102), 132-141.
- [47] Trindade M.A., de Felício P.E., Castillo C.J.C.: Mechanically separated meat of broiler breeder and white layer spent hens. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 2004, 61 (2), 234-239.
- [48] Wójciak K.M., Dolatowski Z.J., Kołożyn-Krajewska D.: Stabilność oksydacyjna ekologicznej kiełbasy surowo dojrzewającej z dodatkiem probiotycznego szczepu *Lactobacillus casei* LOCK 0900 i serwatki kwasowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, 2 (93), 93-109.
- [49] Wójciak K.M., Dolatowski Z.J.: Effect of acid whey on nitrosylmyoglobin concentration in uncured fermented sausage. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2015, 64, 713-719.
- [50] Zhang X., Kong B., Xiong Y.: Production of cured meat color in nitrite-free Harbin red sausage by *Lactobacillus fermentum* fermentation. *Meat Sci.*, 2007, 77, 593-598.

EFFECT OF SELECTED LACTIC ACID BACTERIA ON PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND MICROBIOLOGICAL QUALITY OF MECHANICALLY SEPARATED POULTRY MEAT

S u m m a r y

The objective of the research study was to assess the effect of selected lactic bacteria strains on the technological usefulness and microbiological stability of mechanically separated poultry meat (MSPM).

The experimental material consisted of mechanically separated poultry meat (MSPM); to the MSPM analysed, there were added three strains of lactic acid bacteria at a level of 10^7 CFU/g (*Lactobacillus plantarum* SCH1 and *Lactobacillus brevis* KL5 isolated from raw ripened cured meat and *Lactobacillus plantarum* S21 isolated from acid whey). The control variant did not contain any bacteria added. Force-meats made of MSPM were stored under the refrigeration conditions and tested after 1, 4 and 7 days of storage. The scope of the study included the determination of the following: total count of microorganisms, count of mesophilic lactic bacteria, counts of *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae*, presence of *Salmonella* spp., presence of *Campylobacter* spp. and count of coagulase-positive staphylococci; furthermore, the physicochemical characteristics were determined: pH and oxidation-reduction potential, content of nitrate (III) and (V); the colour of the forcemeat was assessed using a CIE L*a*b* scale. The lactic acid bacteria strains added to forcemeats made of mechanically separated chicken meat did not adversely affect their technological suitability. A positive effect was reported of *Lactobacillus brevis* KL5 on the colour development of raw forcemeats of MSPM. It was shown that *Lactobacillus plantarum* SCH1 had an inhibitory effect on *E. coli* and *Enterobacteriaceae* in raw forcemeats of MSPM after 4 days of refrigerated storage. The research conducted makes it possible to conclude that the selected LAB strains isolated from animal products inhibit the growth of microorganisms in MSPM.

Key words: mechanically separated poultry meat (MSPM), technological usefulness of MSPM, lactic acid bacteria, microbiological quality of MSPM ☒

ANNA OKOŃ, PIOTR SZYMAŃSKI, ZBIGNIEW J. DOLATOWSKI

WPLYW SERWATKI KWASOWEJ NA JAKOŚĆ FIZYKOCHEMICZNĄ I STABILNOŚĆ BARWY FERMENTOWANYCH KIELBAS EKOLOGICZNYCH

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu serwatki kwasowej na wybrane właściwości fizykochemiczne i stabilność barwy fermentowanej kielbasy wieprzowej po procesie dojrzewania oraz po 7 i 14 dniach chłodniczego przechowywania (4 °C).

Materiał doświadczalny stanowiła kielbasa wieprzowa surowo dojrzewająca z dodatkiem serwatki kwasowej i soli morskiej. Przygotowano dwa warianty kielbas: próbę kontrolną poddaną peklowaniu oraz próbę z dodatkiem serwatki kwasowej i soli morskiej. Oceny dokonywano bezpośrednio po procesie dojrzewania oraz po 7 i 14 dniach chłodniczego przechowywania. W badaniach oznaczono wartość pH, potencjał oksydacyjno-redukcyjny (ORP), wskaźnik TBARS, a także parametry barwy w systemie CIE $L^*a^*b^*$ po procesie dojrzewania (0) oraz po 7 i 14 dniach chłodniczego przechowywania.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że dodatek serwatki kwasowej wpłynął istotnie na wzrost kwasowości kielbas podczas 14-dniowego chłodniczego przechowywania. Bardziej stabilnym poziomem potencjału oksydacyjno-redukcyjnego charakteryzowała się kielbasa kontrolna peklowana. W badaniach nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami wskaźnika TBARS w czasie przechowywania kielbas z dodatkiem serwatki kwasowej, a średnia wartość kształtowała się na poziomie 0,937 mg MDA/kg. Nie wykazano istotnych różnic w zakresie parametrów barwy badanych wyrobów. Kielbasa z dodatkiem serwatki kwasowej charakteryzowała się zbliżonymi wartościami parametrów barwy L^* , a^* , b^* , a kielbasa peklowana – większą stabilnością barwy (ΔE^*) podczas chłodniczego przechowywania. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że możliwe jest zastosowanie serwatki kwasowej pochodzącej z województwa kujawsko-pomorskiego do produkcji kielbasy surowo dojrzewającej bez dodatku azotanu(III) sodu.

Słowa kluczowe: kielbasa surowo dojrzewająca, serwatka kwasowa, barwa, TBARS

Wprowadzenie

Przemiany spowodowane utlenianiem lipidów są główną przyczyną niepożądanych zmian chemicznych i sensorycznych prowadzących do ograniczenia lub uniemożliwienia dalszego przechowywania produktów mięsnych. W efekcie powstają pierwotne i wtórne produkty przemian tłuszczu wpływające na pogorszenie cech fizykochemicznych i walorów sensorycznych produktu, a w konsekwencji na obniżenie jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego wyrobu mięsnego [10, 11]. Zastosowanie azotanów (III) i (V) w produktach mięsnych fermentowanych ma na celu działanie ochronne poprzez hamowanie wzrostu i rozwoju patogennych mikroorganizmów, m.in. *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*. Przyczyniają się również do rozwoju smaku fermentowanych produktów mięsnych i tworzenia charakterystycznej czerwonej barwy. Ponadto azotan(III) sodu wykazuje właściwości przeciwutleniające, opóźniające zmiany oksydacyjne podczas przechowywania [2, 11]. Niezależnie od korzyści wynikających ze stosowania azotanu(III) sodu, od dawna wskazuje się na potencjalne ryzyko zdrowotne wynikające ze stosowania tego składnika, szczególne w aspekcie udziału w tworzeniu rakotwórczych nitrozoamin w produktach mięsnych i organizmie człowieka [2, 11]. Rozwiązania legislacyjne w Unii Europejskiej zmierzają do ograniczenia tego składnika w produkcji wędlin, co spowodowało intensywne poszukiwanie substancji o podobnych właściwościach funkcjonalnych [5, 6, 24]. Ograniczenie lub całkowite wyeliminowanie azotanu(III) sodu z produkcji wyrobów mięsnych bez wprowadzenia odpowiednich rozwiązań może mieć negatywny wpływ na jakość i trwałość produktów, dlatego podjęto próbę wykorzystania serwatki kwasowej.

Serwatka jest produktem ubocznym powstającym podczas wytwarzania twarogu. Powstaje w trakcie naturalnej fermentacji węglowodanów i kwasowej koagulacji białek mleka. Występuje w postaci żółto-zielonkawego płynu. Serwatka zawiera aminokwasy o rozgałęzionych łańcuchach, białka i peptydy (laktoalbuminy, glutation), laktozę, szereg związków mineralnych, witaminy i śladowe ilości tłuszczu. Serwatka kwasowa (pH 3,8 ÷ 4,6) charakteryzuje się dużym udziałem kwasu mlekowego (ok. 0,7 %). W procesie wytwarzania jednego kilograma twarogu otrzymuje się ok. dziewięć litrów serwatki. Serwatka kwasowa jest źródłem potencjalnie probiotycznych bakterii kwasu mlekowego (*Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp.) i wielu innych cennych składników, które kształtują jej właściwości prozdrowotne [20, 25].

W dotychczas przeprowadzonych badaniach [13, 25, 27, 28] zaobserwowano pozytywny wpływ serwatki kwasowej na barwę oraz trwałość mikrobiologiczną produktów mięsnych surowo dojrzewających z jej użyciem, pochodzącej z regionów Podkarpacia oraz Lubelszczyzny. Wykazano również korzystny wpływ serwatki kwasowej i gorczycy na zmiany oksydacyjne tłuszczu, właściwości fizykochemiczne, barwę oraz cechy sensoryczne parzonych i fermentowanych kiełbas [14, 27]. W dostępnej literatu-

rze publikowane są dane potwierdzające skuteczność serwatki kwasowej jako składnika wyrobów mięsnych o właściwościach przeciwutleniających, antybakteryjnych oraz potencjalnie prozdrowotnych. Serwatka kwasowa pochodząca z różnych regionów Polski może różnić się podstawowym składem oraz właściwościami funkcjonalnymi ze względu na różny skład mleka [16, 18].

Celem pracy było określenie wpływu zastosowania serwatki kwasowej pochodzącej z województwa kujawsko-pomorskiego do produkcji kielbasy surowo dojrzewającej na jakość fizykochemiczną i parametry barwy w systemie CIE $L^*a^*b^*$ kielbas po dojrzewaniu oraz podczas 14 dni chłodniczego przechowywania.

Materialy i metody badań

Surowiec do produkcji kielbas dojrzewających stanowiło mięso wieprzowe pochodzące z gospodarstwa ekologicznego w województwie kujawsko-pomorskim. Świnie pochodziły z hodowli ekologicznej, z jednego miotu, chowane były w jednakowych warunkach przez 8 miesięcy do uzyskania masy przyżyciowej ok. $120 \div 130$ kg. Serwatkę kwasową otrzymano z produkcji ekologicznych serów twarogowych.

Materiał doświadczalny stanowiła kielbasa surowo dojrzewająca, w której skład wchodziło 50 % mięsa kl. IIa i 50 % mięsa kl. IIb. Mięso poddawano soleniu lub peklowaniu metodą „na sucho” 24 h od uboju. Do solenia jednej części mięsa używano 1,8 % soli morskiej (o zawartości 99,7 % NaCl) w stosunku do masy surowca, nie stosowano azotanów. Drugą część mięsa traktowano peklosolą (o zawartości 99,5 % NaCl i 0,5 % azotanu(III) sodu) także w ilości 1,8 %. Oba zabiegi prowadzono w temp. 2 °C przez 48 h. Następnie dodawano glukozę – 0,5 %, serwatkę kwasową lub wodę – 1,3 % oraz przyprawy (pieprz, czosnek, majeranek) – 0,1 %. Wielkość dodatku serwatki kwasowej ustalono na podstawie wstępnych badań modelowych przeprowadzonych w skali półtechnicznej (niepublikowane wyniki badań). Przygotowano dwa warianty kielbas (tab. 1): próbę kontrolną peklowaną (C) oraz próbę z serwatką kwasową i solą morską (AW). Przygotowane próbki poddawano trzytygodniowemu dojrzewaniu w temp. $16 \div 18$ °C i wilgotności $70 \div 80$ %. Podczas dojrzewania kielbasy wędzono zimnym dymem (30 °C/30 min). Wyroby analizowano bezpośrednio po dojrzewaniu oraz po 7 i 14 dniach chłodniczego przechowywania (4 °C) w warunkach próżniowych. Wykonano dwie serie produktów, każdy wyróżnik analizowano w co najmniej dwóch powtórzeniach.

W kielbasach surowo dojrzewających oznaczano:

- potencjał oksydacyjno-redukcyjny (ORP) – określano przy użyciu elektrody InLab Redox Pro z zastosowaniem cyfrowego pH-konduktometru (Mettler, Toledo Seven Compact S220, Greifensee, Szwajcaria) metodą opisaną przez Ahn i wsp. [1];

Tabela 1. Warianty doświadczalne kielbas surowo dojrzewających

Table 1. Experimental variants of raw-ripening sausages

Próba Sample	Mieszanka pekłująca Curing salt [%]	Sól morską Sea salt [%]	Glukoza Glucose [%]	Serwatka kwasowa Acid whey [%]	Woda Water [%]	Przyprawy Spices [%]
C	1,8	-	0,5	-	1,3	0,1
AW	-	1,8	0,5	1,3	-	0,1

Objaśnienia / Explanatory notes:

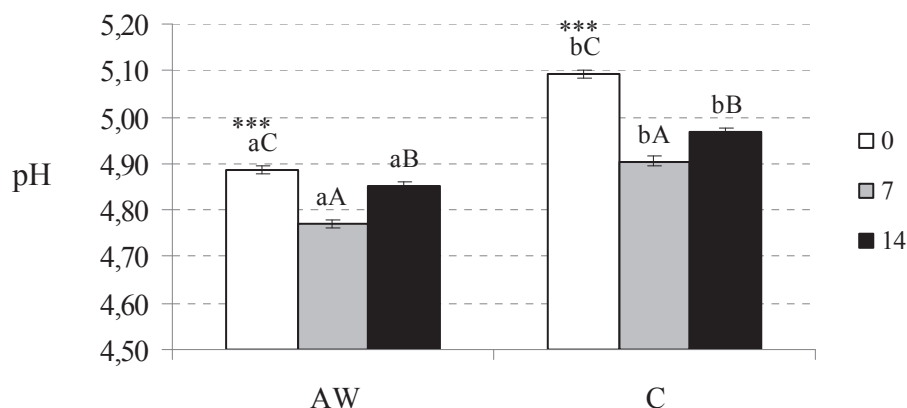
C – próba kontrolna z peklosolą / control sample with curing salt, AW – próba z serwatką kwasową / sample with acid whey.

- kwasowość ogólną – zgodnie z PN [22] pomiar wykonywano przy użyciu pH-metru cyfrowego (Mettler, Toledo, Greifensee, Szwajcaria) i elektrody InLab Cool (Mettler, Toledo Seven Compact S220, Greifensee, Szwajcaria) w wyciągu wodnym produktu; – wskaźnik TBARS oznaczano metodą podaną przez Pikula i wsp. [21];
- parametry barwy w systemie CIE L*a*b* mierzono przy użyciu spektrofotometru Chroma-Meter serii CR-300 (Minolta, Japonia). Oznaczenie wykonywano przy świetle rozproszonym pod kątem 0° i średnicy przesłony 8 mm. Kalibrację spektrofotometru przeprowadzono na wzorcu bieli, którego parametry stanowią punkt odniesienia wszystkich dokonywanych analiz. Na podstawie zmierzonych wartości parametrów L* a* b* poszczególnych próbek obliczano ich całkowitą zmianę zgodnie z równaniem: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5}$ względem próby odniesienia (wyroby przed przechowywaniem), gdzie: ΔL^* – różnica jasności barwy, Δa^* – różnica składowych czerwonych i Δb^* – różnica składowych żółtych barwy wyrobów przed przechowywaniem i po przechowywaniu.

Otrzymane wyniki poddano statystycznej analizie wariancji (ANOVA) – wykonano dwie niezależne jednoczynnikowe analizy wariancji. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem Tukeya przy $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$.

Wyniki i dyskusja

Stwierdzono statystycznie istotny wpływ serwatki kwasowej na kwasowość kielbas surowo dojrzewających (rys. 1). Kielbasa z dodatkiem serwatki kwasowej charakteryzowała się istotnie niższą wartością pH (4,89) w porównaniu z kielbasą peklowaną (5,09). Po 7 dniach chłodniczego przechowywania wyższą kwasowością charakteryzowały się próbki z serwatką kwasową (4,77) w porównaniu z próbkami peklowanymi (4,91). Obniżenie wartości pH w produktach mięsnych poddanych fermentacji mlekowej w pierwszych tygodniach przechowywania jest naturalnym zjawiskiem, które odnotowano także w innych badaniach [3, 29]. Wzrost kwasowości jest uzależniony od



Objaśnienia / Explanatory notes:

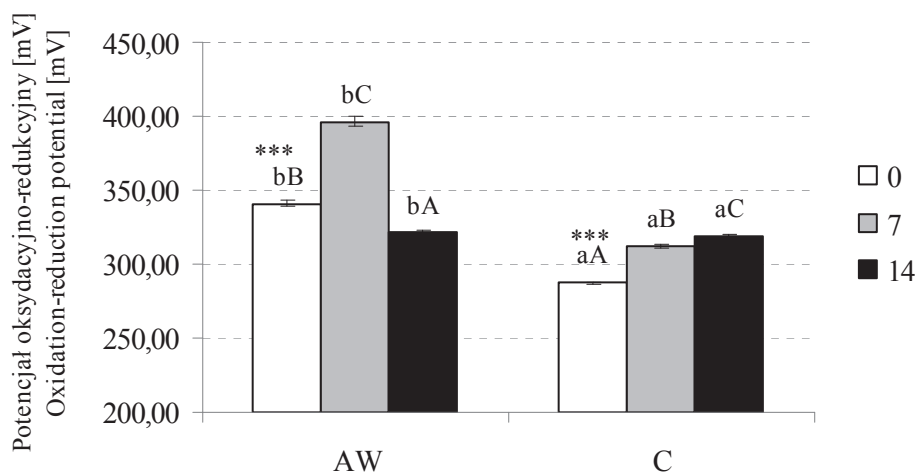
C – próba kontrolna peklowana / control cured sample; AW – próba z serwatką kwasową / sample with acid whey. Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments); a, b (A, B, C) – wartości średnie oznaczone tą samą małą literą w obrębie próbek o tym samym czasie przechowywania i dużymi literami w obrębie tej samej próbki w różnym czasie przechowywania nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$) / Mean values denoted by the same lowercase and referring to samples of the same storage time and by capital letters and referring to the same sample stored during different storage time periods are not significantly different ($p > 0.05$). Wartości średnie oznaczone asteriskiem w obrębie próby różnią się statystycznie istotnie: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ / Mean values denoted by asterisks and referring to the same sample differ statistically significantly: * – $p \leq 0.05$; ** – $p \leq 0.01$; *** – $p \leq 0.001$; N.S. – różnice statystycznie nieistotne / statistically insignificant differences; $n = 4$.

Rys. 1. Wartości pH kielbas surowo dojrzewających bezpośrednio po dojrzewaniu oraz po 7 i 14 dniach chłodniczego przechowywania

Fig. 1. pH value of dry-fermented sausage as analyzed immediately after ripening and after 7 and 14 days of refrigerated storage

dynamiki zmian procesu fermentacji oraz nagromadzenia się w produkcie związków zakwaszających (kwas mlekowy, octowy i inne). Rzepkowska i wsp. [25] zaobserwowali, że tradycyjnie otrzymywana serwatka kwasowa jest potencjalnym źródłem kultur starterowych. Wymienieni autorzy wykazali że, serwatka kwasowa pochodząca z Podkarpacia charakteryzowała się dużą zawartością LAB (*Lb. fermentum* sp. i *Lb. plantarum*). W niniejszych badaniach po czternastu dniach chłodniczego przechowywania nastąpił wzrost wartości pH w badanych kielbasach. Najwyższą wartość pH po 14 dniach przechowywania zaobserwowano w kielbasie kontrolnej peklowanej (4,85), natomiast najniższą – w próbkach z serwatką kwasową (4,97). Wzrost wartości pH po 14 dniach przechowywania może wynikać z rozkładu substancji białkowych na skutek aktywności enzymów własnych mięsa oraz enzymów pochodzenia bakteryjnego. Pep-

tydy, aminokwasy i aminy powstające z degradacji proteolitycznej białek mogą działać jako środek buforujący dla powstających kwasów organicznych wytwarzanych przez bakterie kwasu mlekowego podczas dojrzewania i chłodniczego przechowywania [17, 23]. W czasie całego okresu przechowywania próba AW charakteryzowała statystycznie istotnie niższą ($p \leq 0,001$) wartością pH w porównaniu z próbą kontrolną peklowaną.



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig.1.

Rys. 2. Potencjał oksydacyjno-redukcyjny kielbas surowo dojrzewających bezpośrednio po dojrzewaniu oraz po 7 i 14 dniach chłodniczego przechowywania

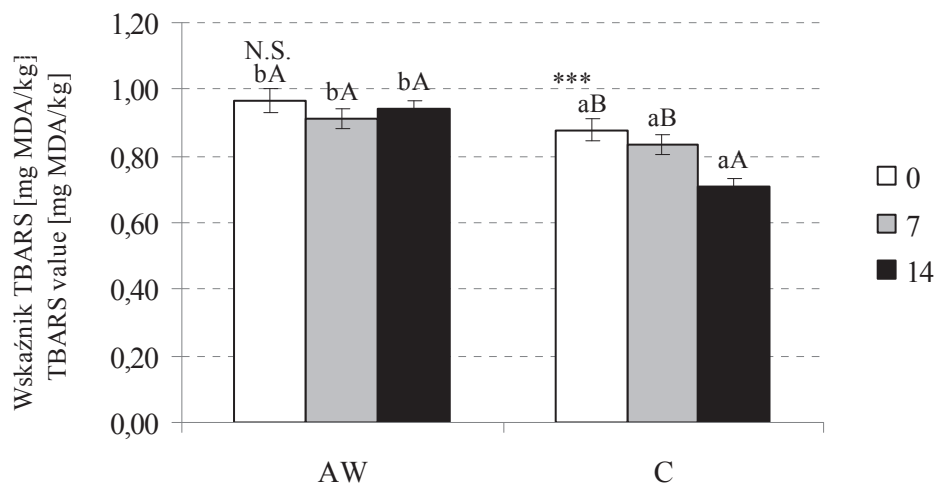
Fig. 2. Oxidation-reduction potential of dry-fermented sausage as analysed immediately after ripening and after 7 and 14 days of refrigerated storage

Procesy oksydacyjne w mięsie rozpoczynają się już po uboju zwierząt, a ich intensywność wzrasta w czasie przetwarzania surowca mięsnego i przechowywania produktu gotowego. Zarówno pierwotne, jak i wtórne produkty utleniania tłuszczu są bardzo reaktywne i łatwo wchodzą w reakcje ze składnikami żywności, wpływając na pogorszenie cech fizykochemicznych i walorów sensorycznych produktu [1, 10, 11]. Bezpośrednio po dojrzewaniu wyrobów próba AW osiągnęła istotnie ($p \leq 0,001$) wyższą wartość potencjału redox (340,73 mV) w porównaniu z próbą kontrolną (287,20 mV). Po 7 dniach chłodniczego przechowywania stwierdzono istotny wzrost wartości potencjału oksydacyjno-redukcyjnego wszystkich badanych kielbas. Obserwowano istotnie niższą wartość potencjału redox w próbce C (312,17 mV) w porównaniu z próbą z serwatką kwasową (396,57 mV). Wykazano, że serwatka kwasowa wywierała statystycznie istotny ($p \leq 0,001$) wpływ na zmiany potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w kielbasach surowo dojrzewających. Istotny wzrost wartości potencjału

redox po 7 dniach chłodniczego przechowywania w próbie AW mógł wynikać z obecności H_2O_2 (rys. 2). Mógł on powstać na skutek działalności mikroflory mięsa i serwatki, a następnie stać się katalizatorem reakcji oksydacji. Wzrost reakcji utleniających może również wynikać z utleniającego oddziaływania soli morskiej na składniki mięsa, co jest potwierdzeniem wyników innych autorów [26].

Po przeanalizowaniu wartości wskaźnika TBARS kielbas wykazano statystycznie istotny wpływ zastosowania serwatki kwasowej na uzyskane wartości (rys. 3). Wartość wskaźnika TBARS próby z dodatkiem serwatki (AW) w czasie całego okresu przechowywania kształtował się na wyższym poziomie (odpowiednio: 0,964, 0,913 i 0,941 mg MDA/kg) w porównaniu z próbą kontrolną peklowaną (odpowiednio: 0,877, 0,835 i 0,710 mg MDA/kg). Niższe wartości wskaźnika TBARS próby kontrolnej peklowanej potwierdzają właściwości przeciwutleniające azotanów(III) w produkcji [15, 27, 28]. Azotan(III) jest dodatkiem używanym w przemyśle mięsnym, spełniającym szereg ważnych aspektów technologicznych, zapewniającym odpowiednią barwę produktów, smak ale również jego bezpieczeństwo. Trudno znaleźć pojedynczy związek, który spełniałby tyle funkcji. Są jednak metody, które pozwalają na osiąganie podobnych skutków takie jak np. zastosowanie serwatki kwasowej i naturalnych przeciwutleniaczy roślinnych [14, 28]. Jednak ważne jest wyjaśnienie mechanizmów i skutków utleniania lipidów z użyciem kwaśnej serwatki w produktach mięsnych. Kielbasa z serwatką kwasową charakteryzowała się najbardziej stabilną wartością wskaźnika TBARS podczas chłodniczego przechowywania – średnio ok. 0,937 mg MDA/kg. Wskaźnik TBARS w czasie chłodniczego przechowywania nie przekraczał wartości 0,960 mg MDA/kg i wskazywała na wysoką jakość badanych kielbas.

Karwowska i Kononiuk [13] oraz Karwowska i wsp. [14] badali produkty mięsne surowo dojrzewające z użyciem serwatki kwasowej i również wykazali wyższe wartości współczynnika TBARS bezpośrednio po procesie dojrzewania (do ok. 2 mg MDA/kg). Kontrolowane zmiany oksydacyjne w produktach surowo dojrzewających mogą wpływać pozytywnie na tworzenie odpowiedniego bukietu smakowo-zapachowego akceptowanego przez konsumentów. Lorenzo i wsp. [17] oraz Qingfeng i wsp. [23] zaobserwowali, że czas przechowywania produktów surowo dojrzewających ma istotny wpływ na zachodzące w nich zmiany oksydacyjne. W pierwszych dwóch miesiącach przechowywania zaobserwowano wzrost wartości wskaźnika TBARS wynikający z nagromadzenia produktów degradacji tłuszczu. W kolejnych miesiącach obserwowali zmniejszenie wartości tego wskaźnika, co mogło być spowodowane tworzeniem stałych kompleksów z innymi składnikami produktu, np. z aminokwasami, cukrami i in. [17, 23].



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 3. Wskaźnik TBARS kielbas surowo dojrzewających bezpośrednio po dojrzewaniu oraz po 7 i 14 dniach chłodniczego przechowywania

Fig. 3. TBARS value of dry-fermented sausage as analysed immediately after ripening and after 7 and 14 days of refrigerated storage

Autooksydacja lipidów mięsa i produktów mięsnych ma niekorzystny wpływ na ich barwę, która jest jednym z najważniejszych wyróżników jakości mięsa i wyrobów mięsnych. Jeśli barwa produktów mięsnych nie będzie akceptowana przez nabywcę, wszystkie pozostałe cechy jakościowe oceniane wzrokowo stracą znaczenie [7, 15]. W subiektywnej ocenie barwy wyrobów mięsnych największe znaczenie przypisuje się jej jasności. Jasna barwa utożsamiana jest zwykle ze świeżością, natomiast ciemna budzi wątpliwości co do jakości produktu i zmniejsza jego pożądalność [4, 8].

W kielbasach bezpośrednio po dojrzewaniu nie wykazano statystycznie istotnych różnic parametrów barwy między badanymi próbkami (tab. 2). Najwyższą jasnością barwy – L^* po dojrzewaniu oraz po 7 dniach chłodniczego przechowywania charakteryzowała się próbka AW (odpowiednio: 52,79 i 53,89), niższą zaś stwierdzono w próbce C (odpowiednio: 52,03 i 53,29). Nie wykazano statystycznie istotnych różnic wartości składowej L^* pomiędzy próbkami wyrobów mięsnych podczas chłodniczego przechowywania. Zaobserwowano, że wartość parametru L^* kielbas podczas przechowywania uległa wzrostowi w obu próbkach, przejawiając się rozjaśnieniem barwy. Po 14 dniach chłodniczego przechowywania stwierdzono istotny wzrost ($p \leq 0,001$) wartości parametru L^* w badanych kielbasach: o 5,4 jednostki w próbce AW i 7,3 jednostki w próbce C. Po 14 dniach przechowywania wyrobów najwyższą wartość jasności osiągnęła próbka kontrolna C (60,59), niższą zaś – próbka AW (59,31). Fernandez-Lopez i wsp. [9]

wykazali, że peroksydacja lipidów wpływa na jasność barwy w mięsie, powodując obniżenie jej wartości w wyrobie. Nam i Ahn [19] również wykazali, że niski poziom potencjału oksydacyjno-redukcyjnego wpływa na większe zachowanie pożądanej barwy mięsa. Podobne tendencje zaobserwowano w badaniach własnych, co skutkowało stwierdzeniem, że stabilny potencjał redox oraz niski wskaźnik TBARS w próbie C wpływały korzystnie na wartości parametru L^* barwy kielbas.

Tabela 2. Wartości parametrów barwy L^* , a^* , b^* kielbas surowo dojrzewających bezpośrednio po dojrzewaniu oraz po 7 i 14 dniach chłodniczego przechowywania

Table 2. L^* , a^* , b^* values of raw-ripening pork sausage after ripening (0), 7 and 14 days cold storage

Czas przechowywania [dni] Storage time [days]		Próba / Sample	
		C	AW
L^*	0	52,03 ^{aA} ± 2,46	52,79 ^{aA} ± 2,34
	7	53,29 ^{aA} ± 2,02	53,89 ^{aA} ± 0,74
	14	60,59 ^{aB} ± 1,74	59,31 ^{aB} ± 2,08
a^*	0	10,23 ^{aA} ± 1,07	11,97 ^{aA} ± 1,55
	7	11,43 ^{aA} ± 1,03	11,52 ^{aA} ± 0,90
	14	10,64 ^{aA} ± 0,82	10,98 ^{aA} ± 0,71
b^*	0	10,01 ^{aA} ± 3,22	8,95 ^{aA} ± 1,20
	7	8,31 ^{aA} ± 1,38	8,57 ^{aA} ± 0,64
	14	8,61 ^{aA} ± 0,78	8,02 ^{aA} ± 0,42
ΔE^*		6,65	8,68

Objaśnienia / Explanatory notes:

C – próba kontrolna peklowana / control cured sample, AW – próba z serwatką kwasową / sample with acid whey. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; n = 6. Wartości średnie oznaczone tą samą małą literą w obrębie próbek w tym samym czasie przechowywania i dużą literą w obrębie tej samej próbki w różnym czasie przechowywania nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$) 0.05 / Mean values denoted by the same lowercase and referring to the samples of the same storage time and by capital letters and referring to the same sample stored during different storage time periods are not significantly different ($p > 0.05$).

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami parametru a^* (określającego udział barwy czerwonej) uzyskanymi w poszczególnych próbach w ciągu 14 dni chłodniczego przechowywania (tab. 2). Najniższy udział barwy czerwonej bezpośrednio po dojrzewaniu zanotowano w kielbasie kontrolnej peklowanej (10,23), wyższy natomiast w próbce AW (11,97). Najniższą wartość składowej a^* po 7 dniach chłodniczego przechowywania zanotowano w próbce kontrolnej peklowanej (11,43), wyższą zaś – w próbce AW (11,52). Wzrost wartości składowej czerwonej po 7 dniach chłodniczego przechowywania w próbce C może być przypisana wzrostowi zawartości powstałej nitrozylomioglobiny, która odpowiada za charakterystyczną czerwoną barwę mięsa. Obniżenie wartości parametru a^* w próbce AW po 7 dniach

chłodniczego przechowywania może być wynikiem działania kwasu mlekowego na różne stadia mioglobiny, który może częściowo lub całkowicie denaturować barwniki hemowe. Obniżenie to może również wynikać ze zmniejszenia zawartości nitrozylo-mioglobiny spowodowanego wyczerpaniem się resztkowej zawartości azotanów (III) i (V).

Nie stwierdzono statystycznie istotnego ($p \leq 0,05$) wpływu zastosowania serwatki kwasowej na zmiany parametru b^* , określającego udział barwy żółtej, bezpośrednio po dojrzewaniu oraz po 7 i 14 dniach chłodniczego przechowywania wyrobów. Kielbasa kontrolna peklowana charakteryzowała się nieistotnie wyższymi ($p > 0,05$) wartościami parametru b^* w porównaniu z wartościami tego parametru kielbasy AW, zarówno po produkcji (10,01), jak i po 14 dniach chłodniczego przechowywania (8,61). Najniższą wartość składowej żółtej po produkcji, jak i po 14 dniach chłodniczego przechowywania odnotowano w przypadku próby AW (odpowiednio: 8,95; 8,02). Zaobserwowano, że wartość parametru b^* barwy w próbce AW systematycznie zmniejszała się podczas chłodniczego przechowywania wyrobów. Johansson i wsp. [12] zauważyli, że obniżenie wartości parametru b^* może być spowodowane zmniejszeniem ilości oksymioglobiny w wyniku wzrostu bakterii zużywających tlen podczas dojrzewania wyrobów. W badaniach własnych wyższą intensywność barwy żółtej (o 0,59) w końcowym okresie badawczym (po 14 dniach) osiągnęła próba C (8,61) w porównaniu z próbą AW.

Wartości parametru ΔE^* barwy świadczącego o stabilności barwy produktu podczas przechowywania przedstawiono w tab. 2. Po przeanalizowaniu wartości ΔE^* stwierdzono wpływ serwatki kwasowej na trwałość barwy. Wykazano największą zmianę parametru ΔE^* barwy po 14 dniach chłodniczego przechowywania w próbce AW (8,68). Najbardziej stabilną barwą podczas przechowywania wyrobów odznaczała się próba kontrolna peklowana, której wartość ΔE^* kształtowała się na poziomie 6,65. Świadczy to o zahamowaniu zmian barwy w próbce C oraz wyższej jej trwałości. Można przypuszczać, że zmiany barwy wynikały z przemian barwników hemowych, głównie mioglobiny odpowiedzialnej za dominującą barwę czerwoną. Niższe wartości parametru ΔE^* można również wiązać ze zmniejszeniem zdolności wyrobów do utleniania. Przypuszcza się, że niższe wartości potencjału oksydacyjno-redukcyjnego mogły spowodować mniejsze zmiany barwy wyrobów.

Wnioski

1. Dodatek serwatki kwasowej miał wpływ na zwiększenie kwasowości kielbas surowo dojrzewających w porównaniu z kielbasą kontrolną peklowaną.
2. Wyższą stabilnością oksydacyjną charakteryzowały się kielbasy peklowane.
3. Nie stwierdzono istotnych zmian parametrów barwy wyprodukowanych kielbas. Kielbasa kontrolna charakteryzowała się zbliżonymi parametrami barwy do wyro-

bu z dodatkiem serwatki kwasowej, przy czym kielbasa kontrolna peklowana charakteryzowała się większą stabilnością barwy (ΔE^*) podczas chłodniczego przechowywania.

4. Wykazano, że możliwe jest zastosowanie serwatki kwasowej pochodzącej z województwa kujawsko-pomorskiego do produkcji kielbasy surowo dojrzewającej bez dodatku azotanu(III) sodu.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego Nr: HOR.re.027.27.2017 finansowanego przez Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Literatura

- [1] Ahn D.U., Nam K.C., Lee E.J.: Lipid oxidation and flavor. *Appl. Muscle Biology Meat Sci.*, 2009, 12, 227-246.
- [2] Bedale W., Sindelar J.J., Milkowski A.L.: Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. *Meat Sci.*, 2016, 120, 85-92.
- [3] Casaburi A., Aristoy M.C., Cavella S., Monaco R.D., Ercolini D., Toldrá F.: Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Sci.*, 2007, 76, 295-307.
- [4] Daszkiewicz T., Wajda S.: Selected parameters of pig carcasses of different weight groups. *Anim. Sci. Papers Rep.*, 2004, 22 (3), 219-227.
- [5] 2010/561/UE: Decyzja Komisji z dnia 25 maja 2010 r. dotycząca przepisów krajowych zgłoszonych przez Danię w sprawie dodawania azotynów do niektórych produktów mięsnych (notyfikowana jako dokument nr C(2010) 3301). *Dz. UE L 247*, ss. 55-65, z 21.09.2010.
- [6] Dyrektywa 2006/52/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 5 lipca 2006 r. zmieniająca dyrektywę 95/2/WE w sprawie dodatków do żywności innych niż barwniki i substancje słodzące oraz dyrektywę 94/35/WE w sprawie substancji słodzących używanych w środkach spożywczych. *Dz. UE L 204*, ss. 10-22, z 26.07.2006.
- [7] Faustman C., Cassens R.G.: The biochemical basis for meat discoloration in fresh meat: A review. *J. Muscle Foods.*, 1990, 1, 217-243.
- [8] Feldhusen F.: Einflüsse auf die postmortale Farbveränderung der Oberfläche von Schweinemuskulatur. *Fleischwirtsch.*, 1994, 74 (9), 989-991.
- [9] Fernández-López J., Sevilla L., Sayas-Barberá E., Navarro C., Marin F., Pérez-Alvarez J.A.: Evaluation of the antioxidant potential of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in cook pork meat. *J. Food Sci.*, 2003, 68 (2), 660.
- [10] Heś M., Korczak J.: Wpływ produktów utleniania lipidów na wartość odżywczą białka. *Nauka. Przyroda. Technologie*, 2007, 1 (1), 1-15.
- [11] Holck A., Axelsson L., McLeod A., Rode T.M., Heir E.: Health and safety considerations of fermented sausages. *J Food Qual.*, 2017, 3, 1-25.
- [12] Johansson G., Tornberg E., Londström K.: Meat colour in loin and ham muscles of normal meat quality from Hampshire, Swedish Landrace and Yorkshshire pigs. *Proc. 37th IcomMST Kulmbach Germany*, 1991, 37, pp. 394-397.
- [13] Karwowska M., Kononiuk A.: Addition of acid whey improves organic dry-fermented sausage without nitrite production and its nutritional value. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2018, 53, 246-253.
- [14] Karwowska M., Wójciak K.M., Dolatowski Z.J.: The influence of acid whey and mustard seed on lipid oxidation of organic fermented sausage without nitrite. *J. Sci. Food Agric.*, 2015, 95 (3), 628-634.

- [15] Krysztofiak K.: Proces tworzenia i modyfikowania barwy wyrobów mięsnych. W: Substancje dodatkowe w przetwórstwie mięsa. Red. W. Uchman. Wyd. AR, Poznań 2001.
- [16] Lievore P., Simões D.R.S., Silva K.M.: Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *J. Food Sci. Technol.*, 2015, 2052, 2083-2092.
- [17] Lorenzo J.M., Gómez M., Fonseca S.: Effect of commercial starter cultures on physicochemical characteristics, microbial counts and free fatty acid composition of dry-cured foal sausage. *Food Control*, 2014, 46, 382-389.
- [18] Miciński J., Zwierzchowski G., Kowalski I.M., Szarek J.: Health-promoting properties of selected milk components. *J. Elem.*, 2013, 18 (1), 165-186.
- [19] Nam K.C., Ahn D.U.: Effects of ascorbic acid and antioxidants on the color of irradiated ground beef. *J. Food Sci.*, 2003, 68 (5), 1686-1690.
- [20] Odila Pereira J., Soares J., Monteiro M.J.P., Gomes A., Pintado M.: Impact of whey protein coating incorporated with *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* on sliced ham properties. *Meat Sci.*, 2018, 139, 125-133.
- [21] Pikul J., Leszczyński D.E., Kummerow F.A.: Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, 1309.
- [22] PN-ISO 2917:2001. Mięso i przetwory mięsne. Pomiar pH. Metoda odwoławcza.
- [23] Ge Q., Pei H., Liu R., Chen L., Gao X., Gu Y., Hou Q., Yin Y., Yu H., Wu M., Zhang W., Zhou G.: Effects of *Lactobacillus plantarum* NJAU-01 from Jinhua ham on the quality of dry-cured fermented sausage. *LWT - Food Sci. Technol.*, 2019, 101, 513-518.
- [24] Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1129/2011 z dnia 11 listopada 2011r. zmieniające załącznik II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 poprzez ustalenie unijnego wykazu dodatków do żywności. Dz. U. L 295, ss. 1-177, z dnia 12.11.2011.
- [25] Rzepkowska A., Zielińska D., Ołdak A., Kołożyn-Krajewska D.: Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2017, 52 (9), 1983-1994.
- [26] Sebranek J.G., Jackson-Davis A.L., Myers K.L., Lavieri N.A.: Beyond celery and starter culture: Advances in natural/organic curing processes in the United States. *Meat Sci.*, 2012, 92, 267-273.
- [27] Wójciak K.M., Dolatowski Z.J.: Shelf life of organic roast pork enriched with acid whey-plant extracts combination. *J. Food Quality*, 2016, 39, 171-180.
- [28] Wójciak K.M., Karwowska M., Dolatowski Z.J.: Use of acid whey and mustard seed to replace nitrites during cooked sausage production. *Meat Sci.*, 2014, 96, 750-756.
- [29] Zhao L., Ye J., Ma C., Song H., Li H., Wang Z., Xiao S.: Physico-chemical characteristics and free fatty acid composition of dry fermented mutton sausages as affected by the use of various combinations of starter cultures and spices. *Meat Sci.*, 2011, 88, 761-766.

EFFECTS OF ACID WHEY ON PHYSICOCHEMICAL QUALITY AND COLOUR STABILITY OF FERMENTED ORGANIC SAUSAGE

S u m m a r y

The objective of the research study performed was to assess the effect of acid whey on the selected physicochemical properties and colour stability of the fermented pork sausage after ripening and after 7 and 14 days of refrigerated storage (4 °C).

The research material consisted of the ripening pork sausages with acid whey and sea salt added. Two variants of sausages were prepared: a cured control sample and a sample with acid whey and sea salt added. The assessment was performed immediately after ripening and after 7 and 14 days of refrigerated storage. During the tests, the following was determined: pH value, oxidation-reduction potential (ORP), TBARS index, and colour parameters in the CIE L * a * b * system after the ripening process (0) and after 7 and 14 days of refrigerated storage.

During the research study conducted, it was found that the acid whey added significantly affected the increase in the acidity of sausages during the 14-day refrigerated storage. The cured control sample was characterised by a more stable level of oxidation and reduction potential. The studies did not show any significant differences in the TBARS index during the storage of sausages with the acid whey added, and the mean value was about 0.937 mg MDA/kg. No significant differences were reported in the colour parameters of the products tested. The sausages with the acidic whey added had the similar values of the $L^* a^* b^*$ colour parameters; however, the cured sausage was characterised by a higher colour stability (ΔE^*) during the cold storage. Based on the results obtained, it has been concluded that it is possible to use acid whey derived from the Kuyavian-Pomeranian Voivodeship to produce the raw-ripening sausage without adding sodium nitrate(III).

Key words: raw-ripening sausage, acid whey, colour, TBARS 

DOROTA ZIELIŃSKA, ALEKSANDRA SZYDŁOWSKA, ANNA ŁEPECKA,
DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA

WPŁYW WYBRANYCH SKŁADNIKÓW ŻYWNOSCI NA ZACHOWANIE ŻYWOTNOŚCI BAKTERII *LACTOBACILLUS* SPP. W PRZEWODZIE POKARMOWYM – BADANIA *IN VITRO*

Streszczenie

Celem badań była ocena przeżywalności wybranych szczepów bakterii *Lactobacillus* wyizolowanych z sera osecypkowego i korycińskiego w warunkach *in vitro* modelu przewodu pokarmowego w zależności od zastosowanych dodatków żywnościowych. Zakres prac obejmował ocenę przeżywalności bakterii po 2 i 5 h inkubacji w modelowym układzie symulującym pasaż żołądkowo-jelitowy w zależności od zastosowanego dodatku ochronnego: mleka UHT (o zawartości tłuszczu 3,2 %), śmietanki (o zawartości tłuszczu 36 %), a także 10-procentowych roztworów inuliny i oligofruktozy. Wykazano, że badane szczepy były odporne na sok żołądkowy o pH = 2,5, natomiast model soku żołądkowego o pH = 2 powodował zmniejszenie żywotności bakterii średnio o ok. 5 rzędów logarytmicznych po 2 h inkubacji. Mleko UHT wykazało nieznaczne działanie ochronne na przeżywalność komórek bakterii, porównywalne do inuliny i oligofruktozy w środowisku obniżonego pH, przy zastosowanej metodzie badawczej. Istotny efekt ochronny na przeżywalność komórek bakterii badanych szczepów stwierdzono natomiast w przypadku zastosowania śmietanki, co najprawdopodobniej ma związek z większą zawartością tłuszczu w porównaniu z jego zawartością w mleku. Badane szczepy *Lb. plantarum* (Kor1 oraz Os1) wyizolowane z żywności charakteryzowały się podobnymi właściwościami jak szczep referencyjny *Lb. plantarum* 299v, co świadczyć może o potencjalnych właściwościach probiotycznych w tym zakresie. Przeprowadzone badania wskazują na zasadność dalszych badań potwierdzających probiotyczne właściwości i potencjalne zastosowanie jako probiotyków bakterii wyizolowanych z żywności fermentowanej.

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

Wprowadzenie

Sprawnie działający ekosystem jelitowy, tzw. mikrobiota (skład ilościowy i jakościowy różnych mikroorganizmów) ma duży wpływ na zachowanie zdrowia człowie-

Dr inż. D. Zielińska, dr inż. A. Szydłowska, dr inż. A. Łepecka, 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: dorota_zielinska@sggw.pl

ka. Mikrobiota jelit człowieka jest najbardziej zróżnicowanym gatunkowo ekosystemem na ziemi (100 - 1000 gatunków). Ze względu na rosnącą świadomość roli układu mikrobioty jelitowej dla zachowania zdrowia człowieka od ponad 20 lat na całym świecie prowadzone są prace badawcze związane z możliwościami pozytywnej modyfikacji lub wzbogacenia mikrobioty człowieka. Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem probiotyków i prebiotyków [14].

Najczęściej spotykanymi rodzajami probiotyków są *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus* spp. Za probiotyczne uważane są także wybrane szczepy drożdży *Saccharomyces boulardii*. Mikroorganizmy, aby mogły zostać zaklasyfikowane do szczepów probiotycznych, powinny zostać precyzyjnie zdefiniowane poprzez określenie odpowiednich kryteriów dotyczących bezpieczeństwa stosowania, cech funkcjonalnych oraz technologicznych. Mikroorganizmy – kandydaci do miana „probiotyku” – muszą spełnić trzy kluczowe wymagania: (1) muszą być żywe w momencie podania i muszą być mikroorganizmami, (2) muszą być podane w dawce wystarczająco wysokiej, aby wywołać efekt prozdrowotny, (3) muszą wywierać korzystny wpływ na gospodarza [6, 23]. Do niedawna szczepy bakterii probiotycznych izolowano jedynie z przewodu pokarmowego zdrowych ludzi. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie nowymi szczepami, wyizolowanymi z innych, niekonwencjonalnych źródeł, które także są w stanie przetrwać trudne warunki panujące w przewodzie pokarmowym człowieka [25]. Wśród najtrudniejszych barier do pokonania podczas trawienia pokarmu wyróżnia się niskie wartości pH panujące w żołądku, aktywność enzymów trawiennych, a także obecność soli kwasów żółciowych [3, 13, 22]. Czynniki, które mogą wpływać ochronnie na przeżywalność bakterii są składniki żywności, w tym prebiotyki, czyli składniki pokarmowe niezdolne do życia, wywierające pozytywny wpływ na zdrowie gospodarza, zważywszy na modulację zespołu mikroorganizmów w jelicie [7]. Prebiotyki nie są trawione przez enzymy endogenne przewodu pokarmowego człowieka, trafiają w stanie nienaruszonym do okrężnicy, gdzie ulegają fermentacji, stanowią pożywkę dla mikroorganizmów probiotycznych. Ponadto prebiotyki są rozkładane przez bakterie sacharolityczne obecne w dolnym odcinku przewodu pokarmowego i mają zdolność stymulacji ich wzrostu. Inulina i oligofruktoza są najczęściej stosowanymi i najbardziej efektywnymi prebiotykami [17].

Celem pracy była ocena przeżywalności wybranych szczepów bakterii *Lactobacillus plantarum* wyizolowanych z oscypka i sera korycińskiego w warunkach *in vitro* modelu przewodu pokarmowego, w zależności od zastosowanych dodatków żywnościowych, w tym prebiotyków.

Material i metody badań

Materiałem do badań były trzy szczepy bakterii fermentacji mlekowej gatunku *Lactobacillus plantarum*, które zostały wyizolowane z serów: oscypka (szczep Os1)

i korycińskiego (szczep Kor1) [20] oraz referencyjny szczep *Lactobacillus plantarum* 299v o potwierdzonych klinicznie właściwościach probiotycznych. Bakterie *Lactobacillus* hodowano na podłożu MRS (LabM, Wielka Brytania) i określano ich liczbę zgodnie z PN-ISO 15214:2002 [21]. Model trawienny *in vitro* symulujący pasaż żołądkowo-jelitowy wykonano z dwóch roztworów soków trawiennych, które stosowano sekwencyjnie. Czas trwania trawienia w soku żołądkowym wynosił 2 h, a w soku jelitowym – 3 h, w temp. 37 °C [22]. Skład soków żołądkowego i jelitowego podano w tab. 1.

Tabela 1. Składniki soków żołądkowego i jelitowego użytych w badaniu
Table 1. Composition of gastric and intestinal juices used in experiment

Rodzaj soku / Type of juice	Skład soku / Composition of juice
Sok żołądkowy / Gastric juice	0,5-procentowy roztwór NaCl / 0.5 % NaCl solution Lizozym (1 g/l) / Lisozyme (1 g/l) Pepsyna (0,3 g/l) / Pepsin (0.3 g/l) 5 M HCl (w celu uzyskania właściwego pH 2,5 lub 2,0) 5 M HCl (in order to obtain proper pH of 2.5 or of 2.0)
Sok jelitowy / Intestinal juice	Roztwór NaHCO ₃ (6,4 g/l) / NaHCO ₃ (6.4 g/l) solution KCl (0,239 g/l) / KCl (0.239 g/l) NaCl (1,28 g/l) / NaCl (1.28 g/l) Pankreatyna (1 g/l) / Pancreatin (1 g/l) Żółć wołowa (0,3 %) / Bovine bile (0.3 %)

Wszystkie odczynniki pochodziły z firmy Sigma Aldrich, Polska / All chemicals were from Sigma Aldrich Co, Poland.

W badaniach uwzględniono sześć wariantów doświadczalnych:

1. Warunki standardowe – pH soku żołądkowego wynosiło 2,5.
2. Warunki standardowe – pH soku żołądkowego obniżono do wartości 2,0.
3. Warunki standardowe (2) – z dodatkiem czynnika ochronnego w postaci mleka UHT 3,2 % (Mlekovita, Polska).
4. Warunki standardowe (2) – z dodatkiem czynnika ochronnego w postaci śmietanki UHT 36 % (Mlekovita, Polska).
5. Warunki standardowe (2) – z dodatkiem czynnika ochronnego w postaci 10-procentowego roztworu inuliny (Frutafit, Sensus, Holandia).
6. Warunki standardowe (2) – z dodatkiem czynnika ochronnego w postaci 10-procentowego roztworu oligofruktozy (Raftilose P95, Orafit, Belgia).

Każdorazowo po 1 ml hodowli *Lactobacillus* (gęstość populacji ok. 1×10^9 jtk/ml) odwirowywano ($6000 \times g$, 10 min), zlewano supernatant, płukano roztworem soli fizjologicznej PBS (Sigma Aldrich, Polska) i dodawano po 5 ml soku żołądkowego. W wariantach 3, 4, 5 i 6 dodawano po 50 µl czynnika ochronnego (mleko, śmietanki, inuliny lub oligofruktozy), a w wariantach 1 i 2 po 50 µl PBS i pipetowano

przez 3 min w celu wymieszania z komórkami bakterii przed zawieszeniem w soku żołądkowym. Następnie próbki poddawano inkubacji przez 2 h w temp. 37 °C, po czym odwirowywano ($6000 \times g$, 10 min), zlewano supernatant, dodawano po 10 ml soku jelitowego i inkubowano przez 3 h w temp. 37 °C. Badania mikrobiologiczne wykonywano w czasie 0, po 2 i 5 h inkubacji, w trzech powtórzeniach.

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 13 (StatSoft, Polska). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA (przy $p < 0,05$), a także analizę składowych głównych PCA (Principal Component Analysis).

Wyniki i dyskusja

W celu stwierdzenia, że dany szczep wykazuje korzystne działanie na zdrowie człowieka, trzeba w pierwszej kolejności stwierdzić, czy pokonuje barierę żołądkowo-jelitową. Czynniki, które ograniczają szanse przeżycia bakterii w trakcie trawienia, są: niskie pH, obecność soli kwasów żółciowych oraz enzymów. W tab. 2. przedstawiono wyniki badań przeżywalności bakterii *Lactobacillus* w układzie doświadczalnym.

Pierwszy model doświadczalny (1) został zaczerpnięty z badań przeprowadzonych przez Rzepkowską i wsp. [22]. Odczyn pH soku żołądkowego wynosił 2,5, natomiast stężenie soli żółciowych wynosiło 0,3 %. Ponadto do soków trawiennych zastosowano dodatek enzymów (tab. 1). W tych warunkach liczba komórek bakterii obniżyła się średnio o 1 log jtk/ml po 2 h inkubacji w soku żołądkowym, z wyjątkiem szczepu Os1, w przypadku którego redukcja liczby sięgała 0,4 log jtk/ml, a następnie o ok. 1 log jtk/ml po 3-godzinnej inkubacji w soku jelitowym. Zgodnie z tym można wnioskować, że dane szczepy wykazują dobrą oporność na zastosowane warunki panujące w modelowym układzie pokarmowym człowieka.

Stwierdzono, że obniżenie pH soku żołądkowego z 2,5 do 2,0 spowodowało istotną zmianę w przeżywalności bakterii *Lactobacillus* spp. w soku żołądkowym (o ok. 4 log jtk/ml), a następnie jelitowym (o ok. 1 log jtk/ml). Ponadto we wszystkich wariantach doświadczalnych, w których pH soku żołądkowego wynosiło 2,0, odnotowano istotne obniżenie liczby bakterii po 2 h inkubacji, natomiast w przypadku zastosowania soku żołądkowego o pH = 2,5 efekt ten obserwowany był dopiero po 5 h inkubacji. Uważa się, że gatunek *Lb. plantarum* jest odporny na niskie pH soku żołądkowego i sole kwasów żółciowych [4]. Podobne wyniki otrzymali wcześniej inni autorzy [1, 12], którzy podkreślali kluczowy wpływ kwasowości na przeżywalność bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Z drugiej strony stabilizacja żywotności, którą obserwowano w warunkach soku jelitowego, wskazuje na to, że testowane szczepy *Lb. plantarum* mogą dotrzeć do okrężnicy w odpowiedniej liczbie żywych komórek (ok. 6 log jtk/ml), nawet po ekspozycji na działanie szkodliwego czynnika w postaci kwasu o pH = 2,0.

Tabela 2. Przeżywalność bakterii *Lactobacillus plantarum* [log jtk/ml] w modelu trawiennym *in vitro*, w zależności od zastosowanych czynników ochronnych

Table 2. The effect of applied protective factors on the survival of *Lactobacillus plantarum* [log CFU/ml] in the *in vitro* digestive model

Szczep Strain	Czas Time [h]	Czynnik / Factor					
		1	2	3	4	5	6
Os1	0	9,01 ± 0,37	9,34 ± 0,19	8,75 ± 0,45	8,92 ± 0,08	8,56 ± 0,47	8,68 ± 0,47
	2	8,61 ^{**} ± 0,34	5,05 [*] ± 0,08	5,10 ± 0,97 [*]	6,37 ^{***} ± 0,09	5,60 [*] ± 0,52	5,79 [*] ± 0,11
	5	7,75 ^{*,*} ± 0,30	4,30 [*] ± 0,63	4,89 ± 0,19 [*]	6,48 ^{*,*} ± 0,07	4,99 [*] ± 0,90	4,20 [*] ± 0,69
Kor1	0	9,10 ± 0,22	9,23 ± 0,38	8,81 ± 0,33	9,15 ± 0,08	8,79 ± 0,13	8,82 ± 0,13
	2	8,04 ^{**} ± 0,56	4,18 [*] ± 0,17	5,53 ^{*,*} ± 0,42	6,26 ^{*,*} ± 0,03	6,20 ^{*,*} ± 0,15	5,28 [*] ± 0,63
	5	7,31 ^{***} ± 0,71	3,91 [*] ± 0,04	4,87 [*] ± 0,41	6,55 ^{***} ± 0,23	4,88 [*] ± 0,96	3,87 [*] ± 0,81
299v	0	9,14 ± 0,20	9,38 ± 0,19	9,12 ± 0,19	9,10 ± 0,01	8,78 ± 0,16	8,75 ± 0,16
	2	8,14 ^{**} ± 0,38	4,61 [*] ± 0,75	5,90 [*] ± 0,17	6,21 ^{*,*} ± 0,17	6,24 [*] ± 0,11	5,93 [*] ± 0,11
	5	7,36 ^{***} ± 0,16	4,09 [*] ± 0,29	4,29 [*] ± 0,21	6,37 ^{*,*} ± 0,18	5,30 [*] ± 0,50	5,60 [*] ± 0,91

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviation;

* – wartości średnie w kolumnach różnią się statystycznie istotnie (p < 0,05) w obrębie szczepu w porównaniu z czasem 0 / mean values in columns differ statistically significantly (p < 0.05) within strain and compared to time '0'; ** – wartości średnie w wierszach różnią się statystycznie istotnie (p < 0,05) w odniesieniu do próby z czynnikiem 2 / mean values in lines differ statistically significantly (p < 0.05) as regards the sample with factor 2.

Uważa się, że bakterie fermentacji mlekowej wzrastają i pozostają żywe przy pH w zakresie $4,5 \div 7,0$ [10]. Jednakże przy obniżonym pH środowiska uruchamiane zostają mechanizmy, dzięki którym pH cytoplazmatyczne komórek pozostaje bardziej alkaliczne niż środowiska. Bakterie fermentacji mlekowej szybko wydzielają kwas z komórek za pośrednictwem pomp protonowych F1F0-ATPaza oraz systemów: deiminazy argininy ADI (ang. *arginine deiminase*), dekarboksylazy glutaminianu GAD (ang. *glutamate de carboxylase*) i zdolności do wytwarzania chaperonów. Ponadto błony biologiczne są względnie nieprzepuszczalne dla protonów oraz cząsteczek kwasu. W ten sposób tworzy się gradient pH pomiędzy cytoplazmą a środowiskiem ich bytowania [3, 10]. W wielu badaniach wykazano, że oporność na niskie pH jest szczepozależna [2, 18, 26], co potwierdzono także w badaniach własnych.

W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano ochronny wpływ czynników żywieniowych na przeżywalność *Lb. plantarum* podczas modelowego pasażu żołądkowo-jelitowego. W celu wykazania efektu ochronnego zastosowano warunki badań (2) z obniżonym pH soku żołądkowego do wartości 2,0. Statystycznie istotny ($p < 0,05$) wpływ zaobserwowano w wariancie 4 doświadczenia, w którym zastosowano śmietankę o zawartości tłuszczu 36 %. Dodatkowo w wariancie tym zaobserwowano wyższą liczbę bakterii po 5 h niż po 2 h inkubacji, niezależnie od zastosowanego szczepu bakterii, co dowodzi, że komórki były w stanie rozpocząć proces regeneracji i rozmnażać się w soku jelitowym. W przypadku zastosowania mleka (3) o zawartości tłuszczu 3,2 % efekt ochronny był istotny jedynie w przypadku szczepu Kor1 po pasażu żołądkowym. Tłuszcz mleczny zawarty w śmietance i mleku wpłynął ochronnie na komórki bakterii. Z publikacji Klewickiej i wsp. [15] wiadomo, że tłuszcz zawarty w żywności przyczynia się do spowolnienia ruchów jelit, a tym samym do dłuższego pasażu i nawet namnażania się bakterii [15]. Ponadto białka mleka mają właściwości buforujące, co sprzyja podwyższaniu pH w soku żołądkowym i może przyczyniać się do lepszej przeżywalności bakterii w trakcie trawienia [8]. Uważa się, że mleko i produkty mleczne należą do grupy najlepszych nośników bakterii probiotycznych ze względu na przytoczone właściwości [9]. Horáčková i wsp. [13] potwierdzili to w swoim badaniu, w którym wykazali, że liczba komórek bakterii *Lactobacillus* po inkubacji w sokach trawiennych z dodatkiem mleka uległa obniżeniu o $1 \div 3$ jednostek logarytmicznych w porównaniu z próbą kontrolną bez dodatku mleka, w której liczba komórek bakterii obniżyła się o $3 \div 5$ jednostek logarytmicznych. Również Klewicka i wsp. [15] analizowali przeżywalność bakterii *Lactobacillus* w preparacie probiotycznym w modelowym przewodzie pokarmowym człowieka przy udziale dodatku żywności. Autorki stwierdziły, że matryca żywieniowa ma korzystny wpływ na przeżywalność bakterii, gdyż tworzy warunki ochronne dla komórek bakterii. Najlepszy efekt ochronny wykazał preparat mlekozastępczy, co wynikało z jego składu, który tworzyły: oleje roślinne, syrop glukozowy, hydrolizat kazeiny, witaminy oraz składniki mineralne. Z

kolei Rzepkowska i wsp. [22] w badaniach nad przeżywalnością szczepów *Lactobacillus* spp. wyizolowanych z żywności w warunkach modelowego przewodu pokarmowego, z zastosowaniem medium żywnościowego w postaci mleka w proszku, mleka UHT o zawartości tłuszczu 3,2 %, bulionu wołowego oraz bulionu MRS wykazali, że najlepszy efekt ochronny uzyskano w przypadku mleka UHT. Powyższa obserwacja ma związek z pozytywnym działaniem składników mleka (głównie białka, w tym białka serwatkowego) na żywotność komórek bakterii mlekowych.

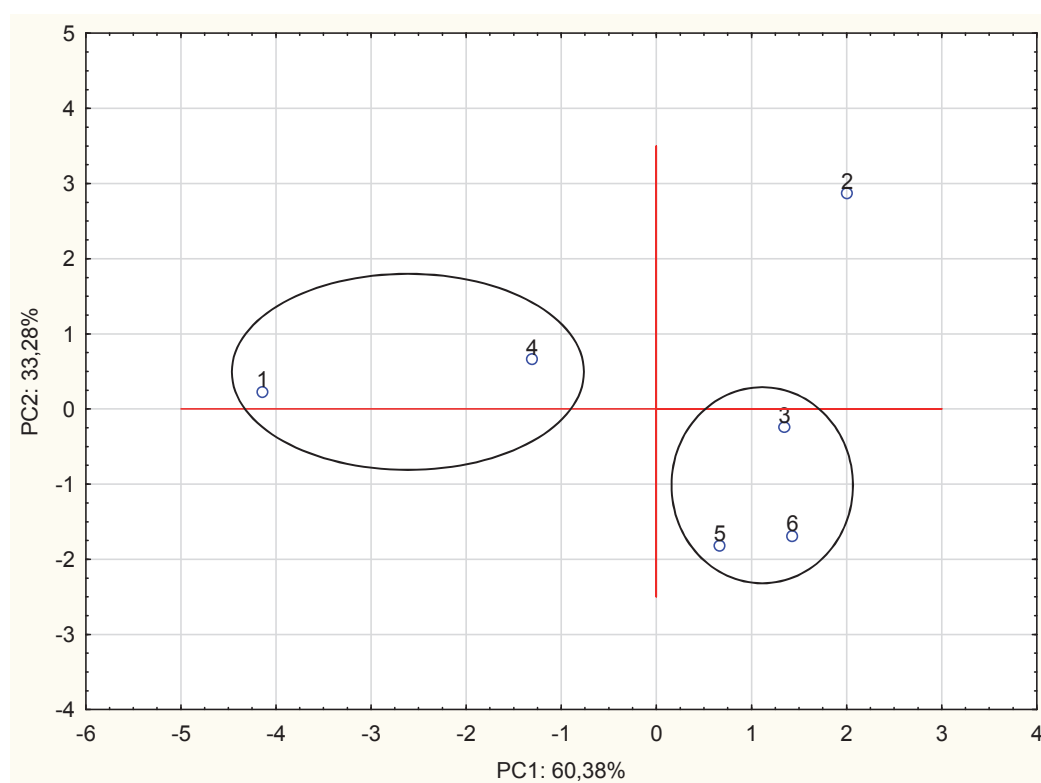
Zastosowanie prebiotyków – warianty 5 i 6, również wpłynęło na poprawę przeżywalności bakterii w trakcie pasaży żołądkowo-jelitowego. Istotny wpływ zaobserwowano w przypadku szczepu Kor1, przy zastosowaniu inuliny jako czynnika ochronnego po pasaży żołądkowym. Zaobserwowano, że liczba komórek bakterii *Lb. plantarum* Kor 1, które zawieszono w 10-procentowym roztworze inuliny, obniżyła się o 2,6 log jtk/ml, natomiast komórki tych samych bakterii bez dodatku czynnika ochronnego (2) obniżyły swoją liczbę o 5,0 log jtk/ml po 2 h inkubacji w soku żołądkowym. Podobny efekt obserwowano w przypadku zastosowania 10-procentowego roztworu oligofruktozy jako czynnika ochronnego. Liczba komórek bakterii ulegała redukcji średnio o $2,8 \div 3,5$ log jtk/ml po pasaży żołądkowym i kolejno o średnio $0,3 \div 1,6$ log jtk/ml po pasaży jelitowym, w zależności od zastosowanego szczepu (tab. 2).

Inulina jest polisacharydem zapasowym, który zawiera cząsteczki glukozy i fruktozy. Oligofruktoza zaś jest związkiem, który składa się z dwóch do pięciu cząsteczek fruktozy. Są one połączone wiązaniem glikozydowym i powstają wskutek częściowej hydrolizy inuliny przy użyciu enzymu endonukleazy. Oligofruktoza, dzięki krótszemu w porównaniu z inuliną łańcuchowi fruktozowemu, ma właściwości technologiczne porównywalne do tych, które charakteryzują cukier i syrop glukozowy. Inulina z kolei, dzięki swoim właściwościom, pełni technologicznie rolę zamiennika tłuszczu i cukru [5]. Właściwości chemiczne roztworów prebiotyków mogą także działać ochronnie na komórki bakterii probiotycznych. Krasaekoopt i Watcharapoka [16] wykazali, że dodatek galaktooligosacharydów (0,3 %) stanowił ochronę w przypadku mikrokapsułkowania bakterii *Lb. acidophilus* 5 i *Lb. casei* 01, powodując redukcję jedynie o 3,1 i 2,9 log jtk/ml po inkubacji w symulowanym soku żołądkowym (pH 1,55), a następnie jelitowym, zawierającym 0,6 % soli kwasów żółciowych. Z kolei Gandomi i wsp. [11] stwierdzili, że kapsułkowanie *Lb. rhamnosus* poprawiło żywotność bakterii (27,7 % populacji bakterii przeżyło modelowy pasaż żołądkowo-jelitowy), a ponadto wykazali, że dodatek inuliny znacząco wpłynął ($p < 0,05$) na poprawę żywotności bakterii kapsułkowanych [11].

Analiza składowych głównych zastosowana do danych uzyskanych w niniejszym badaniu pozwoliła na zidentyfikowanie 6 składowych głównych, z których dwie pierwsze tłumaczą 87,21 % zmienności zmiennych. Projekcję dwóch pierwszych skła-

dowych na płaszczyznę czynników przedstawiono na rys. 1. Z kolei na rys. 2. przedstawiono wyniki analizy skupień.

Na wykresie można zaobserwować dwie wyraźnie jednorodne grupy. Przypadki reprezentujące czynniki ochronne 3, 5 i 6 są położone blisko siebie, co świadczy o ich silnym związku i podobnym efekcie działania ochronnego mleka UHT 3,2 %, 10-procentowych roztworów inuliny i oligofruktozy. Analiza skupień (rys. 2) również potwierdza silny związek pomiędzy tymi czynnikami. Z kolei zastosowanie śmietanki 36 % (4) miało podobny wpływ jak podwyższenie pH o 0,5 wartości (1). Należy także



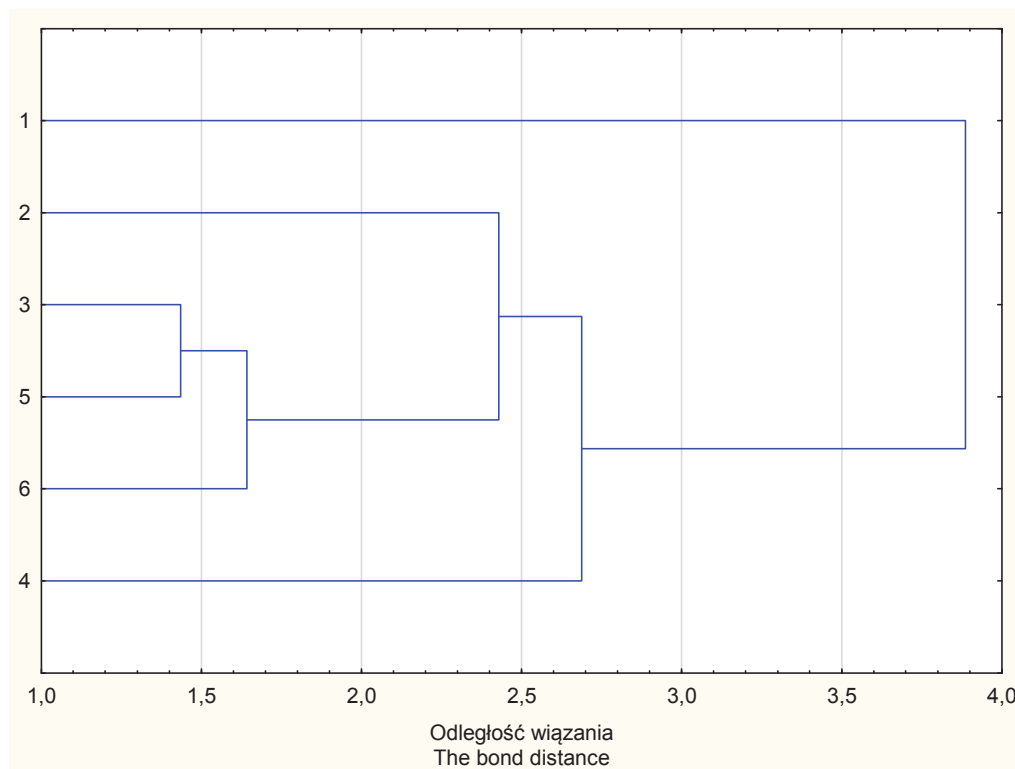
Objaśnienia / Explanatory notes:

- 1 – warunki standardowe, sok żołądkowy o pH = 2,5 / standard conditions, gastric juice with pH = 2.5;
- 2 – warunki standardowe, sok żołądkowy o pH = 2,0 / standard conditions, gastric juice with pH = 2.0;
- 3 – warunki standardowe (2) z dodatkiem mleka / standard conditions (2) with milk added;
- 4 – warunki standardowe (2) z dodatkiem śmietanki / standard conditions (2) with cream added;
- 5 – warunki standardowe (2) z dodatkiem inuliny / standard conditions (2) with inulin added;
- 6 – warunki standardowe (2) z dodatkiem oligofruktozy / standard conditions (2) with oligofructose added.

Rys. 1. Rozkład PCA przypadków na płaszczyznę czynników

Fig. 1. Distribution of PCA cases onto plane of principal components

zauważyć, że warunki (2) o obniżonym pH soku żołądkowego do wartości 2,0 całkiem odstają od pozostałych przypadków, co wskazuje, że warunki te były w silnym stopniu inaktywujące dla komórek bakterii i nie chroniły ich przed szkodliwym działaniem czynników środowiskowych.



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 2. Analiza skupień zastosowanych w badaniach czynników ochronnych w porównaniu z warunkami referencyjnymi

Fig. 2. Cluster analysis of protective factors used in the study compared to the reference conditions

Podsumowując, można stwierdzić, że bakterie z gatunku *Lactobacillus plantarum* zastosowane w badaniach wykazują znaczną oporność na warunki panujące w modelowym przewodzie pokarmowym. Nie wykazano różnic pomiędzy bakteriami wyizolowanymi z żywności (Os1 i Kor1) a szczepem bakterii probiotycznych pochodzenia ludzkiego (299v). Świadczy to o potencjalnych właściwościach tych szczepów i weryfikuje negatywnie tezę, że szczepy bakterii kandydujące do miana probiotyku powinny być izolowane wyłącznie z przewodu pokarmowego człowieka, m.in. ze względu na „wrodzoną” oporność na warunki panujące w przewodzie pokarmowym, co było podnoszone w publikacjach [19, 24]. W ostatnich latach, wobec nowych dowodów nau-

kowych odchodzi się od tej wyłączności i dopuszcza do badań szczepy izolowane z innych, niekonwencjonalnych źródeł [25].

Wykazano także, że projektowanie żywności probiotycznej powinno uwzględniać takie czynniki, jak właściwy nośnik żywnościowy. Uważa się, że mleko i produkty mleczne są najlepszym nośnikiem bakterii probiotycznych ze względu na właściwości buforujące białek mleka i zawartość tłuszczu, jednak zastosowanie prebiotyków umożliwia uzyskanie porównywalnych efektów. Inulina i oligofruktoza mogą także pełnić funkcję ochronną dla bakterii probiotycznych w żywności.

Wnioski

1. Najsilniejszy efekt ochronny na przeżywalność badanych komórek bakterii *Lactobacillus plantarum* wykazał tłuszcz mleczny w postaci śmietanki (36 %) oraz w stopniu średnim polisacharydy (10-procentowy roztwory inuliny i oligofruktozy) oraz mleko (3,2 %).
2. Badane szczepy wyizolowane z żywności (Kor1 oraz Os1) charakteryzowały się podobnymi właściwościami co szczep referencyjny *Lb. plantarum* 299v, co może świadczyć o potencjalnych właściwościach probiotycznych w tym zakresie.
3. Przeprowadzone badania wskazują na zasadność dalszych badań potwierdzających probiotyczne właściwości i potencjalne zastosowanie jako probiotyków bakterii wyizolowanych z żywności fermentowanej.

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach środków na utrzymanie potencjału badawczego Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie.

Literatura

- [1] Arena M.P., Caggianiello G., Fiocco D., Russo P., Torelli M., Spano G., Capozzi V.: Barley β -glucans-containing food enhances probiotic performances of beneficial bacteria. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, 15, 3026-3039.
- [2] Caggia C., De Angelis M., Pitino I., Pino A., Randazzo C.L.: Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. *Food Microbiol.*, 2015, 50, 109-117.
- [3] Cotter P.D., Hill C.: Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, 2003, 67 (3), 429-453.
- [4] De Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M., de Vos W.M.: *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int. Dairy J.*, 2006, 16 (9), 1018-1028.
- [5] Drabińska N., Zieliński H., Krupa-Kozak U.: Technological benefits of inulin-type fructans application in gluten-free products – A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 2016, 56, 149-157.
- [6] FAO/WHO.: Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO, Rome 2002.

- [7] FAO: FAO Technical Meeting on Prebiotics. FAO, Rome 2007.
- [8] Fox P.F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P.L.H., O'Mahony J.A.: Physical properties of milk. In: Dairy Chemistry and Biochemistry. 2nd ed. Springer International Publishing, Cham 2015, pp. 321-343.
- [9] Gahrue H.H.: Yogurt. The most suitable carrier for increasing bioavailability of minerals. Progress Nutr., 2018, 20 (2-S), 294-296.
- [10] Gajewska J., Błaszczyk M.K.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). Post. Mikrobiol. 2012, 51(1), 55-65.
- [11] Gandomi H., Abbaszadeh S., Misaghi A., Bokaie S., Noori N.: Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. LWT – Food Sci. Technol., 2016, 69, 365-371.
- [12] Ghezzi C., Russo P., Arena M.P., Spano G., Ouzari H.I., Kheroua O., Saidi D., Fiocco D., Kaddouri H., Capozzi V.: Evaluating the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains from Algerian infant feces: Towards the design of probiotic starter cultures tailored for developing countries. Probiotics Antimicrob. Proteins, 2019, 11(1), 113-123.
- [13] Horáčková S., Žaludová K., Plocková M.: Stability of selected *Lactobacilli* in the conditions simulating those in the gastrointestinal tract. Czech J. Food Sci., 2011, 29, 30-35.
- [14] Kerry R.G., Patra J.K., Gouda S., Park Y., Shin H.S., Das G.: Benefaction of probiotics for human health: A review. J. Food Drug Analysis, 2018, 26 (3), 927-939.
- [15] Klewicka E., Śliżewska K., Nowak A.: Ocena przeżywalności bakterii *Lactobacillus* zawartych w preparacie probiotycznym podczas pasażu w symulowanym przewodzie pokarmowym. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2014, 6 (97), 170-181.
- [16] Krasakoopt W., Watcharapoka S.: Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. LWT – Food Sci. Technol., 2014, 57 (2), 761-766.
- [17] Markowiak P., Śliżewska K.: Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. Nutrients, 2017, 9 (9), #1021. DOI: 10.3390/nu9091021.
- [18] 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.
- [19] Nowak A., Śliżewska K., Libudysz Z.: Probiotyki – historia i mechanizmy działania. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2010, 4 (71), 5-19.
- [20] Oldak A., Zielińska D., Rzepkowska A., Kołożyn-Krajewska D.: Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and korycinski cheese. BioMed. Res. Int., 2017, #6820369. DOI: 10.1155/2017/6820369.
- [21] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.
- [22] 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.
- [23] Sanders M.E.: Probiotics: The concept. In: WGO Handbook on Gut Microbes. The WGO Foundation, Milwaukee, USA, 2014, pp. 39-42.
- [24] Sanders M.E.: Probiotics: Definition, sources, selection, and uses. Clin. Infectious Diseases, 2008, 46(Suppl. 2), S58-S61.
- [25] Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D.: Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties. Biomed Res. Int., 2018, #5063185. DOI: 10.1155/2018/5063185.

- [26] Zielińska D., Rzepkowska A., Radawska A., Zieliński K.: *In vitro* screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. Curr. Microbiol., 2015, 70 (2), 183-194.

EFFECT OF SELECTED FOOD INGREDIENTS ON BEHAVIOUR OF *LACTOBACILLUS* BACTERIA IN GASTRO-INTESTINAL TRACT – *IN VITRO* STUDY

S u m m a r y

The objective of the research study was to assess the survival of selected *Lactobacillus* bacteria strains isolated from oscypek and korycin cheese under the *in vitro* conditions of a gastrointestinal tract model and depending on the food additives used. The scope of the research study included the assessment of bacterial survival after 2 and 5 h incubation in a model system that simulated the gastrointestinal tract and depending on the protective additive used: UHT milk (3.2 % of fat), cream (36 % of fat), 10 % solutions of inulin and oligofructose. It was shown that the strains tested were resistant to the gastric juice with a pH value of 2.5, whereas the gastric juice model with pH of 2.0 caused the viability of those bacteria to decrease by ca. 5 logarithmic units on average after 2 h incubation in the gastric juice. The UHT milk showed a slight protective effect on the survival of bacterial cells, which could be compared to the effect of inulin and oligofructose in a low pH environment, with the applied research method. In contrast, a significant protective effect was reported on the survival of bacterial cells of the tested strains in the case of using 36 % cream; this is most likely related to a higher fat content compared to its content in the milk. Test strains, *Lb. plantarum* (Kor1 and Os1) isolated from food, were characterised by the properties similar to those of the reference *Lb. plantarum* 299v strain; this may indicate potential probiotic properties in this area. The conducted studies indicate the validity of further studies to confirm the probiotic properties of bacteria isolated from fermented foods and their potential use as probiotics.

Key words: probiotics, *Lactobacillus*, *in vitro* tests, gastrointestinal tract, survival ☒

ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS, ALICJA DŁUBAŁA, JUSTYNA MALEC

WIĄZANIE CHOLESTEROLU PRZEZ BAKTERIE FERMENTACJI MLEKOWEJ IZOLOWANE OD DZIECI

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było określenie zdolności *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, *Lactobacillus casei* ATCC 334 oraz szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z kału zdrowych dzieci do wiązania cholesterolu w środowisku modelowego soku jelitowego i podłoża MRS Bulion. Do oznaczenia pozostałości cholesterolu w próbkach zastosowano diagnostyczny zestaw enzymatyczny Cholesterol RTU. Hodowle prowadzono w 24-dółkowych płytkach titracyjnych. Pomiar absorpcji przy oznaczaniu stopnia wiązania cholesterolu oraz OD₆₀₀ wykonano przy użyciu czytnika mikropłytek Spark 10M. Szczepy wykazujące największy stopień wiązania cholesterolu oceniono pod względem zdolności wzrostu oraz wiązania cholesterolu ze środowiska przy zwiększającym się obciążeniu cholesterolem [g/dm³]: 1,66, 2,85 i 3,75. *L. rhamnosus* i *L. casei* wykazywały zdolność do wiązania cholesterolu z podłoża MRS Bulion odpowiednio w 68,18 i 83,6 %, natomiast w modelowym soku jelitowym osiągały odpowiednio 60 i 50 %. Szczepy wyizolowane z kału dzieci charakteryzowały się dużą zmiennością w stopniu wiązania cholesterolu ze środowiska, przy czym lepsze rezultaty osiągnięto w przypadku modelowego soku jelitowego (1,81 ÷ 77,99 %) niż podłoża MRS Bulion (0,49 ÷ 33,14 %). Przy zwiększającej się zawartości cholesterolu w środowisku badane szczepy wykazywały zmniejszony przyrost biomasy, co korelowało ze zmniejszonym stopniem wiązania tego związku. Największą redukcję cholesterolu z modelowego soku jelitowego uzyskano przy jego stężeniu – 1,66 g/dm³. Stężenie cholesterolu 3,75 g/dm³ skutkowało zahamowaniem przyrostu biomasy, a tym samym najmniejszym ubytkiem tego związku ze środowiska.

Słowa kluczowe: LAB, cholesterol, efekt hipocholesterolemiczny, modelowy sok jelitowy

Wprowadzenie

Hipercholesterolemia (podwyższony poziom cholesterolu we krwi) jest uważana za główny czynnik ryzyka rozwoju miażdżycy tętnic, choroby wieńcowej serca, udaru mózgu. Mimo że istnieją środki farmakologiczne do leczenia tego stanu (np. statyny), ich działanie jest często nieoptymalne, a one same są kosztowne i mogą wywoływać

Dr hab. inż. E. Bogusławska-Wąs, dr inż. A. Dłubała, Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej, Wydz. Nauk o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, al. Piastów 17, 70-310 Szczecin, mgr inż. J. Malec. Kontakt: alicja.dlubala@zut.edu.pl

niepożądane skutki uboczne [16]. Wykazano, że doustne podawanie probiotyków może obniżyć poziom cholesterolu o $22 \div 33$ % [13]. Działanie hipocholesterolemiczne przypisuje się bakteriom z rodzaju: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Leuconostoc* [3, 5, 14].

Właściwości bakterii jelitowych i ich zdolność do obniżania poziomu cholesterolu wchłanianego do krwiobiegu wzbudzają zainteresowanie naukowców [11, 12, 15]. Proponowanych jest kilka mechanizmów redukcji poziomu cholesterolu przez drobnoustroje. Jednym z najlepiej poznanych jest dekoniugacja kwasów żółciowych przez enzym BSH (ang. *Bile Salts Hydrolase*) wytwarzany przez wiele LAB (ang. *Lactic Acid Bacteria*), w szczególności bakterii izolowanych z przewodu pokarmowego z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* [19]. Zdekoniugowane kwasy żółciowe są mniej rozpuszczalne w wodzie, co prowadzi do ich eliminacji wraz z kałem. Cholesterol natomiast jest używany do produkcji nowych kwasów żółciowych, co w efekcie obniża jego stężenie w surowicy [4]. Cholesterol może ulegać koprecypitacji ze zhydrolizowanymi kwasami żółciowymi [8].

Bakterie fermentacji mlekowej mogą także asymilować cholesterol do błony komórkowej, co powoduje zmianę rozkładu nasyconych i nienasyconych błonowych kwasów tłuszczowych, w szczególności kwasu mirystynowego, palmitynowego, stearynowego, stearooleinowego i oleinowego [11]. Usman [22] uważa, że w przypadku szczepu *Lactobacillus gasseri* zmniejszenie ilości cholesterolu w środowisku zachodzi na drodze wiązania go ze ścianą komórkową.

Cholesterol może być także przekształcany w jelitach w koprostanol, który jest bezpośrednio wydalany z kałem. Powoduje to zmniejszenie ilości cholesterolu wchłanianego w jelitach, a tym samym prowadzi do zmniejszenia stężenia fizjologicznej puli tego związku [2]. Chiang i wsp. [2] stwierdzili, że dehydrogenaza/izomeraza produkowana przez bakterie, takie jak *Sterolibacterium denitrificans* jest odpowiedzialna za katalizowanie przemian cholesterolu do cholest-4-en-3-onu, kofaktora w przemianach cholesterolu w koprostanol. Redukcja poziomu cholesterolu może mieć też związek z przekształcaniem go przez szczepy probiotyczne w krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) wykorzystywane do syntezy błony komórkowej podczas fazy wzrostu [10].

Celem niniejszej pracy było określenie zdolności *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, *Lactobacillus casei* ATCC 334 oraz szczepów bakterii fermentacji mlekowej izolowanych z kału dzieci do obniżania poziomu cholesterolu w środowisku modelowego soku jelitowego i podłoża MRS Bulion.

Material i metody badań

W badaniach wykorzystano 53 szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z kału zdrowych dzieci oraz dwa szczepy wzorcowe: *Lactobacillus rhamnosus*

ATCC 9595 i *Lactobacillus casei* ATCC 334. Do ożywania i namnażania szczepów używano podłoża MRS Bulion (Scharlab, Hiszpania). Hodowle kultur prowadzono w temp. 30 °C przez 24 h.

Oznaczanie zdolności do wiązania cholesterolu prowadzono w warunkach modelowych. Jako próby kontrolnej używano podłoża MRS Bulion (Scharlab, Hiszpania), natomiast w celu symulowania warunków panujących w przewodzie pokarmowym przygotowano modelowy sok jelitowy zgodnie z Tomaro-Duchesneau i wsp. [21]. Przed sterylizacją wartość pH soku modelowego doprowadzano do 6,5 za pomocą 2 M NaOH. Po sterylizacji do soku jelitowego wprowadzano pankreatynę w formie preparatu enzymatycznego Kreon Travix 10 000 (Mylan Pharmaceuticals Sp. z o.o., Polska) – jedna kapsułka zawierała 10 000 jednostek FIP lipazy, 8 000 jednostek FIP amylazy, 600 jednostek FIP proteazy. Enzym był dodawany w ilości równej zawartości dwóch kapsułek preparatu na 25 ml podłoża. Źródłem cholesterolu w próbach był krystaliczny związek o czystości chemicznej > 99 % (Sigma-Aldrich, Polska) rozpuszczany na gorąco w 96-procentowym alkoholu etylowym. Każdorazowo przed doświadczeniem sporządzano nową porcję roztworu cholesterolu.

W pierwszym etapie doświadczenia oceniano zdolność badanych szczepów do przyrostu biomasy oraz wiązania cholesterolu w środowisku MRS Bulion i w modelowym soku jelitowym. W tym celu przygotowano 3 warianty doświadczenia:

- wariant 1 (W1) – MRS Bulion (próba kontrolna),
- wariant 2 (W2) – MRS Bulion + 1-procentowy roztwór cholesterolu (ostateczna ilość cholesterolu w podłożu wynosiła 1,66 g/dm³),
- wariant 3 (W3) – modelowy sok jelitowy + 1-procentowy roztwór cholesterolu (ostateczna ilość cholesterolu w podłożu wynosiła 1,66 g/dm³).

Do podłoży wprowadzano zawiesinę badanych szczepów o gęstości 4 w skali McFarlanda ($1,2 \times 10^9$ jtk/ml). Hodowlę prowadzono w 24-dołkowych płytkach titracyjnych. Z każdego wariantu doświadczenia pobierano materiał do pomiaru wartości OD₆₀₀ (Spark 10M, Tecan, Szwajcaria). Wszystkie próbki inkubowano w temp. 30 °C przez 18 h. Po inkubacji ponownie dokonywano pomiarów OD₆₀₀ (Spark 10M, Tecan) oraz oceniano stopień wiązania cholesterolu w próbach W2 i W3.

Do oznaczenia pozostałości cholesterolu w próbkach zastosowano diagnostyczny zestaw enzymatyczny Cholesterol RTU (BioMerieux, Polska). Przed przystąpieniem do oznaczania hodowle wirowano (7500 rpm/10 min, 4 °C) w celu wydzielenia płynu pohodowlanego. Pomiar absorbancji wykonywano przy długości fali $\lambda = 500$ nm czytelnikiem mikropłytek Spark 10M (Tecan, Szwajcaria).

Ilość cholesterolu [%] związanego ze środowiska obliczano z równania:

$$U = [(A - B) \times 100] / A$$

gdzie:

U – ubytek cholesterolu [%], A – absorbancja próbki z dodatkiem cholesterolu przed inkubacją, B – absorbancja próbki z dodatkiem cholesterolu po 18 h hodowli w 30 °C.

W drugim etapie doświadczenia oceniano wpływ obciążenia cholesterolem na przyrost biomasy i jego wiązanie ze środowiska. Analizę prowadzono na sześciu szczepach środowiskowych wykazujących największą zdolność do wiązania cholesterolu (> 70 %) oraz na szczepie wzorcowym *L. rhamnosus*. Oznaczenia prowadzono w modelowym soku jelitowym w trzech wariantach doświadczalnych [g/dm³]: 1,66 (I), 2,85 (II) i 3,75 (III). Przygotowanie zawiesiny szczepów, warunki hodowli oraz ocena stopnia związania cholesterolu zostały utrzymane i przeprowadzone według schematu opisanego powyżej.

Oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Obliczono wartości średnie oraz współczynniki korelacji. Istotność różnic weryfikowano testem t-Studenta przy $p = 0,05$. Obliczenia wykonano przy użyciu programu Statistica 13 (StatSoft, Polska).

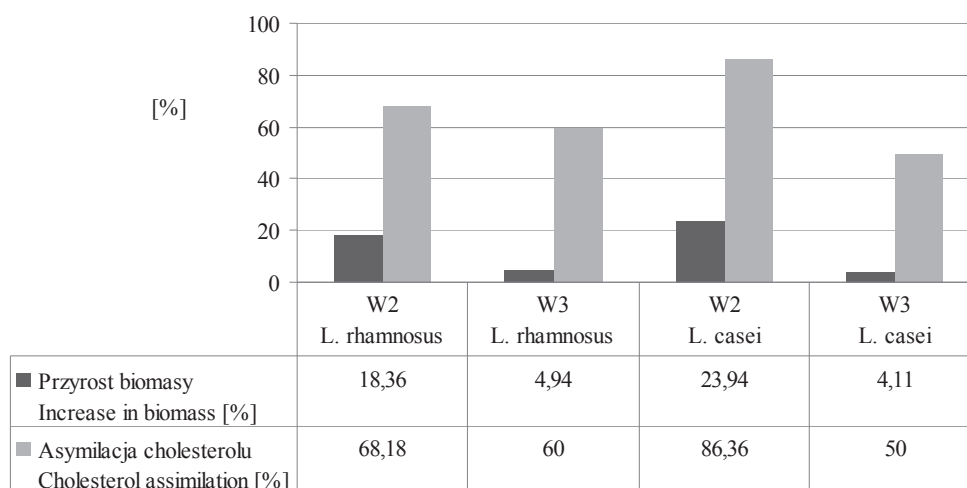
Wyniki i dyskusja

W badaniach przeprowadzonych na szczepach wzorcowych *L. rhamnosus* i *L. casei* wykazano, że charakteryzowały się one większym wzrostem na podłożu MRS Bulion, na którym przyrost biomasy szczepu *L. rhamnosus* wynosił 227,27 %, a szczepu *L. casei* – 683,3 %. Dodatek cholesterolu do podłoża spowodował zmniejszenie przyrostu biomasy odpowiednio do: 18,36 i 23,94 %. Środowiskiem najmniej korzystnym do wzrostu badanych szczepów był modelowy sok jelitowy z dodatkiem cholesterolu, w którym uzyskano przyrost biomasy odpowiednio: 4,94 % i 4,11 %. Wyniki te nie potwierdzają wniosków z badań, które przeprowadzili Kimoto i wsp. [6]. Wykazali oni bowiem korzystny wpływ cholesterolu na wzrost komórek *Lactobacillus* sp. W badaniach własnych szczepy wzorcowe wykazywały większy stopień wiązania cholesterolu w środowisku podłoża MRS niż modelowego soku jelitowego. Ubytek cholesterolu z podłoża MRS Bulion zawierającego *L. rhamnosus* wynosił 68,18 %, natomiast z modelowego soku jelitowego – 60 %. W przypadku *L. casei* wartości te wynosiły odpowiednio: 83,36 i 50 % (rys. 1).

Niekorzystny wpływ na przyrost biomasy szczepów wzorcowych w soku jelitowym mogła wykazywać obecność kwasów żółciowych zawartych w preparacie Difco Oxgall (VWR, USA) (skoniugowany kwas taurocholowy i glikocholowy). Żółć i sole żółci wywierają niekorzystny wpływ na przeżywalność bakterii, w tym także należących do *Lactobacillus* [8]. Podobne wyniki uzyskali Raghavan i wsp. [14], którzy wykazali najwyższą redukcję poziomu cholesterolu na podłożu bez dodatku kwasów żółciowych.

Stwierdzono statycznie istotną zależność ($p \leq 0,05$) pomiędzy wzrostem liczby komórek *L. rhamnosus* i *L. casei* a zmniejszeniem ilości cholesterolu w podłożu MRS Bulion. Eliminacji cholesterolu w soku jelitowym nie towarzyszył wzrost biomasy

badanych szczepów. Zaobserwowano, że przy utrzymaniu na stałym poziomie liczby bakterii doszło również do zmniejszenia ilości cholesterolu, jednak uzyskane wyniki korelacji ($r = 0,3$) nie są statystycznie istotne ($p > 0,05$). Różnice te mogą wynikać z mniejszego przyrostu biomasy podczas inkubacji w soku jelitowym.



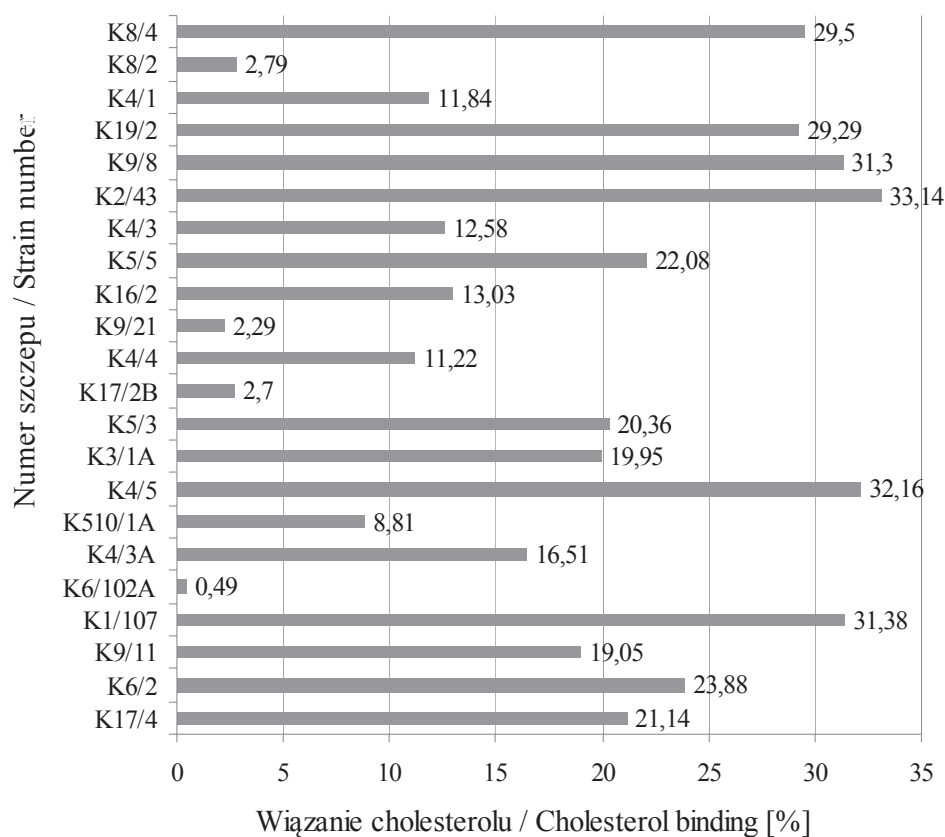
Rys. 1. Wpływ przyrostu biomasy na stopień związania cholesterolu w podłożu

Fig. 1. Effect of increase in biomass on degree of cholesterol binding in medium

W kolejnym etapie badań tożsame analizy przeprowadzono na szczepach LAB wyizolowanych z kału dzieci. Szczepy te lepiej namnażały się w modelowym soku jelitowym niż w podłożu MRS Bulion, a przyrost biomasy wynosił odpowiednio: $12,2 \div 295,5$ % oraz $3,2 \div 152,4$ %.

Wyniki stopnia wiązania cholesterolu przedstawiono na rys. 2 i 3. W przypadku izolatów od dzieci zaobserwowano większą zdolność wiązania cholesterolu w warunkach imitujących przewód pokarmowy, czego nie stwierdzono we wcześniejszym doświadczeniu w przypadku szczepów wzorcowych. W warunkach modelowego soku jelitowego 44 spośród badanych szczepów wykazywało zdolność wiązania cholesterolu w zakresie $1,81 \div 77,99$ % (rys. 3), natomiast w podłożu MRS Bulion tę cechę wykazywały 22 szczepy w zakresie $0,49 \div 33,14$ % (rys. 2). W przypadku 6 szczepów stopień wiązania cholesterolu w modelowym soku jelitowym przekraczał 70 %, a w podłożu MRS Bulion z udziałem tych samych szczepów nie przekraczał 34 %. Można przypuszczać, że najistotniejszą przyczyną różnic w zachowaniu badanych szczepów wzorcowych i środowiskowych jest ich środowisko izolacji. Szczepy wyizolowane z przewodu pokarmowego wykazywały naturalną oporność na warunki w nim panujące, w tym na obecność soli kwasów żółciowych. Oporność ta może wynikać

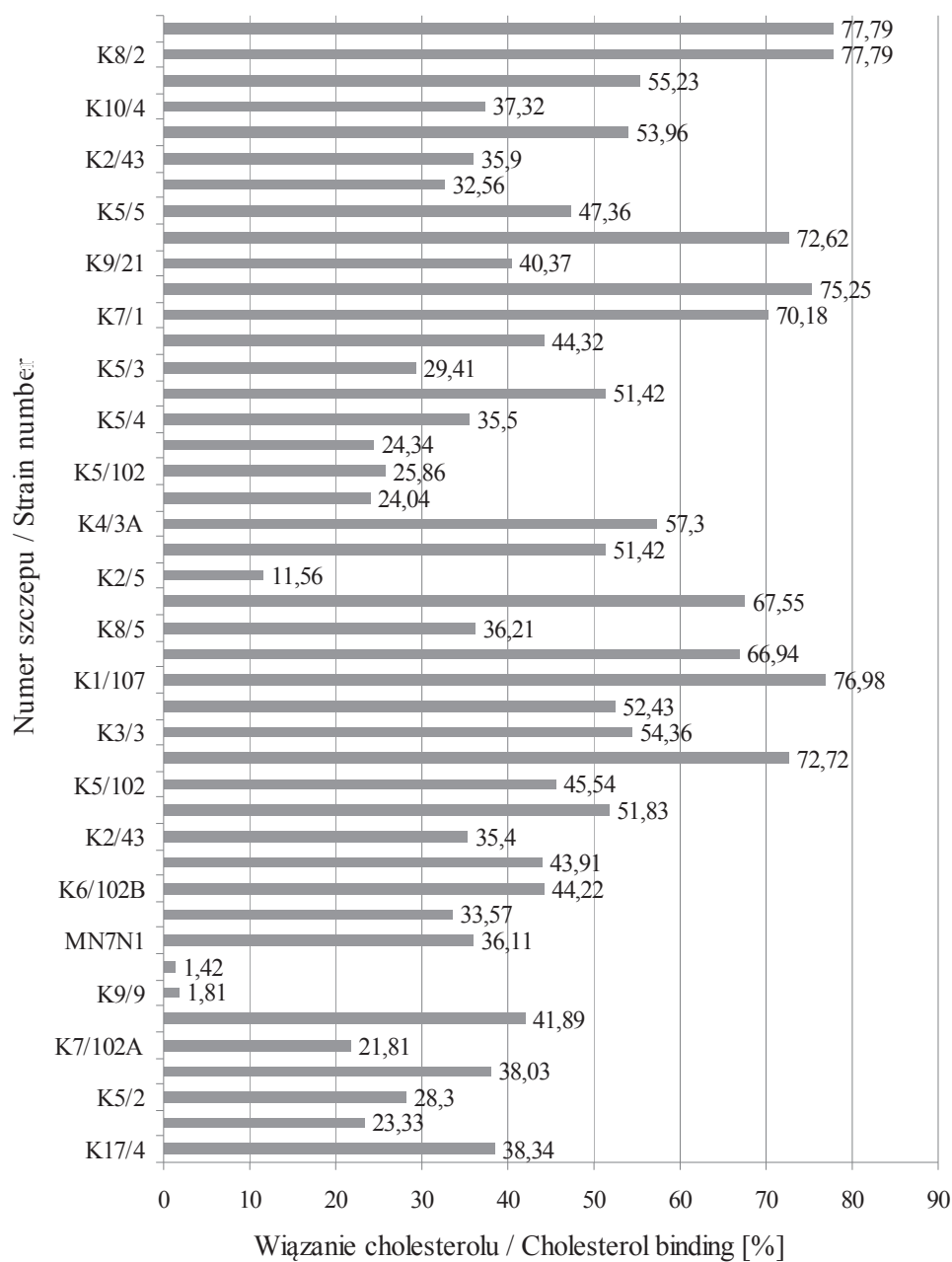
z obecności aktywnego enzymu BSH. Liong i Shah [9] badali szczepy pochodzenia ludzkiego i także uzyskali wyższe wyniki przyswajania cholesterolu w środowisku z dodatkiem Oxygall. Żółć, a w szczególności rodzaj kwasów żółciowych, ma wpływ na wiązanie cholesterolu przez drobnoustroje. Proces ten efektywniej przebiega w obecności kwasów koniugowanych [18]. Podobnie Kimoto i wsp. [6] w badaniach szczepu z rodzaju *Lactococcus* uzyskali wyższe wyniki redukcji cholesterolu w podłożu suplementowanym 0,2-procentowym taurocholanem sodu.



Rys. 2. Wiązanie cholesterolu z podłoża MRS Bulion przez szczepy wyizolowane z kału zdrowych dzieci

Fig. 2. Cholesterol binding in MRS Broth medium by strains isolated from faeces of healthy children

Dla siedmiu szczepów wykazujących największy stopień wiązania cholesterolu przeprowadzono ocenę obciążenia cholesterolem. Analizy prowadzono w modelowym soku jelitowym – środowisku, w którym szczepy wykazały największy stopień wiąża-



Rys. 3. Wiązania cholesterolu z modelowego soku jelitowego przez szczepy wyizolowane z kału zdrowych dzieci

Fig. 3. Cholesterol binding in model intestinal juice by strains isolated from faeces of healthy children

nia cholesterolu. Badano warianty o stężeniu cholesterolu w środowisku [g/dm^3]: 1,66, 2,85 oraz 3,75. Stwierdzono, że przy zwiększającej się ilości cholesterolu wszystkie szczepy, z wyjątkiem K8/2 i K10/2 (tab. 1), wykazywały mniejszy przyrost biomasy. Stężenie cholesterolu $3,75 \text{ g/dm}^3$ nie wpłynęło hamująco na szczepy K8/2 i K8/4, których przyrost wyniósł odpowiednio: 2,36 i 1,06 %. Nie wykazano statystycznej istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi jedynie przy stężeniu cholesterolu $3,75 \text{ g/dm}^3$ ($p > 0,05$).

Wraz ze wzrastającym stężeniem cholesterolu zaobserwowano jego zmniejszający się ubytek ze środowiska, co miało związek ze słabszym wzrostem komórek. Wykazano statystycznie istotną korelację ($r = -0,72$, $p \leq 0,05$) pomiędzy przyrostem biomasy a zmniejszeniem ilości cholesterolu w środowisku przy jego stężeniu wynoszącym $1,66 \text{ g/dm}^3$. Zwiększenie stężenia cholesterolu do $2,85 \text{ g/dm}^3$ skutkowało zmniejszeniem ubytku tego związku ze środowiska, a współczynnik korelacji wynosił $r = -0,68$ ($p \leq 0,05$). Przy obciążeniu cholesterolem wynoszącym $3,75 \text{ g/dm}^3$ zauważono zahamowanie wzrostu komórek i brak statystycznie istotnej korelacji pomiędzy wartością OD_{600} a redukcją cholesterolu ($r = 0,21$, $p \leq 0,05$).

Tabela 1. Wiązanie cholesterolu z modelowego soku jelitowego przez szczepy wyizolowane z kału zdrowych dzieci oraz przyrost ich biomasy w zależności od ilości cholesterolu w środowisku

Table 1. Cholesterol binding in model intestinal juice by strains isolated from faeces of healthy children and increase in their biomass depending on amount of cholesterol in environment

Szczep Strain	Cholesterol – $1,66 \text{ g/dm}^3$		Cholesterol – $2,85 \text{ g/dm}^3$		Cholesterol – $3,75 \text{ g/dm}^3$	
	Przyrost biomasy Biomass growth	Ubytek cholesterolu Cholesterol loss	Przyrost biomasy Biomass growth	Ubytek cholesterolu Cholesterol loss	Przyrost biomasy Biomass growth	Ubytek cholesterolu Cholesterol loss
	[%]					
K1/107	17,65	61,67	13,31	59,93	-3,01	49,25
K8/2	14,33	66,67	18,29	54,96	2,36	50,75
K8/4	29,5	62,3	15,85	61,91	1,06	55,22
K4/4	22,8	59,02	18,81	57,78	-0,56	56,72
K10/2	22,99	62,3	32,47	54,48	-6,01	46,27
K9/4	18,43	63,44	15,16	58,47	-11,73	52,24
<i>L. rhamnosus</i>	40,74	68,34	20,78	67,69	-16,73	44,78
p	0,0004	0,000001	0,000051	0,000001	0,09	0,000001

W badaniach własnych stwierdzono ścisłą korelację pomiędzy przyrostem biomasy a ilością usuniętego cholesterolu. Zależność tę uzyskano zarówno w przypadku szczepów wzorcowych w podłożu MRS Bulion, jak i szczepów wyizolowanych od dzieci w modelowym soku jelitowym. Potwierdza to wyniki badań przeprowadzonych

przez Kimoto i wsp. [7] oraz Taranto i wsp. [20]. Autorzy ci stwierdzili jednak, że niezależnie od liczby komórek korzystniejsze wyniki wiązania cholesterolu osiągnięto podczas inkubacji na podłożu MRS Bulion z dodatkiem cholesterolu w porównaniu z modelowym sokiem jelitowym.

Uzyskane w pracy wyniki potwierdzają doniesienia innych naukowców o znacznym zróżnicowaniu wiązania cholesterolu przez drobnoustroje w obrębie gatunku, a także pomiędzy szczepami tego samego gatunku [11, 17]. Mniejsza zdolność wiązania cholesterolu przez niektóre szczepy może wynikać z różnic w budowie ściany komórkowej i mniejszej tolerancji na sole żółci obecne w modelowym soku jelitowym [7].

Przebadane w niniejszej pracy szczepy wyizolowane z przewodu pokarmowego dzieci były zdolne do wywołania efektu hipocholesterolemicznego. Konieczne są dalsze badania *in vitro* wskazujące na molekularne podstawy tego mechanizmu.

Wnioski

1. Szczepy wyizolowane z przewodu pokarmowego zdrowych dzieci wykazują zdolność do wywołania efektu hipocholesterolemicznego. Spośród badanych 53 szczepów 44 eliminowały cholesterol ze środowiska modelowego soku jelitowego, a 22 – z podłoża MRS Bulion.
2. Stężenie cholesterolu 3,75 g/dm³ w środowisku modelowego soku jelitowego działa hamująco na wzrost mikroorganizmów.
3. Szczepy wyizolowane z kału, w przeciwieństwie do szczepów wzorcowych *L. rhamnosus* ATCC 9595 oraz *L. casei* ATCC 334, lepiej namnażają się oraz wykazują większą zdolność wiązania cholesterolu w warunkach modelowego soku jelitowego niż w podłożu MRS Bulion.
4. Zwiększenie stężenia cholesterolu w środowisku skutkuje osłabieniem przyrostu biomasy, co koreluje ze zmniejszoną eliminacją tego związku ze środowiska.

Literatura

- [1] Cheng-Chin T., Pei-Pei L., You-Miin., Zi-Yi Z., Hui-Ching W., Chun-Chih H.: Cholesterol lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile salts hydrolase activity and effect of potential strains on cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo*. Sci. World J., 2014, #690752. DOI: 10.1155/2014/690752.
- [2] Chiang Y.R., Ismail W., Heintz C., Schaeffer C., van Dorsselaer A., Fuchs G.: Study of anoxic cholesterol metabolism by *Sterolibacterium denitrificans*. J. Bact., 2008, 190 (3), 905-914.
- [3] Guo L., Li T., Tang Y., Yang L., Hou G.: Probiotic properties of *Enterococcus* strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. Microb. Biotechnol., 2016, 9 (6), 737-745.
- [4] Hosono A., Otani H., Yasui H., Watanuki M.: Impact of fermented milk on human health: Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk. Anim. Sci. J., 2002, 73, 241-256.

- [5] Jones M.L., Chen H., Ouyang W., Metz T., Prakash S.: Microencapsulated genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2004 1 (6), 61-69.
- [6] Kimoto H., Ohmomo S., Okamoto T.: Cholesterol removal from media by lactocci. *J. Dairy Sci.*, 2002, 8 (5), 3182-3188.
- [7] Kimoto H., Nomura M., Kobayashi M., Mizumachi K., Okamoto T.: Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract. *Can. J. Microbiol.*, 2003, 49 (11), 707-711.
- [8] Kurdi P., Kawanishi K., Mizutani K., Yokota A.: Mechanisms of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *J. Bacteriol.*, 2006, 188, 1979-1986.
- [9] Liong M.-T., Shah N.P.: Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. *Food Res. Int.*, 2005, 38, 135-142.
- [10] Michael D.R., Davies T.S., Moss J.W.E., Calvente D.L., Ramji D.P., Marchesi J.R., Pechlivanis A., Plummer S.F., Hughes T.S.: The anti-cholesterolaemic effect of a consortium of probiotics: An acute study in C57BL/6J mice. *Sci. Rep.*, 2017, 7 (1), 2883-2886.
- [11] Miremadi F., Ayyash M., Sherkat F., Stojanovska L.: Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *J. Funct. Foods.*, 2014, 9, 295-305.
- [12] Noh D.O., Kim S.H., Gilliland S.E.: Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80, 3107-3113.
- [13] Pereira D.I.A., Gibson G.R.: Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2002, 37 (4), 259-281.
- [14] Raghavan C.M., Nanda A., Yuvaraj R., Mukesh Kumar D.J., Senthil Murugan A., Nalaji Raja R.: Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* species as probiotics. *World Appl. Sci. J.*, 2011, 14 (4), 552-560.
- [15] Razin S.: Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *J. Bacteriol.*, 1975, 124, 570-572.
- [16] Schuster H.: Improving lipid management – To titrate, combine or switch. *Int. J. Clin. Pract.*, 2004, 58 (7), 689-694.
- [17] Shehata G., El Sohaimey S.A., Malak A., El-Sahn A., Youssef M.M.: Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Ans. Agric. Sci.*, 2016, 61 (1), 65-75.
- [18] Tahri H., Grill J.P., Schneider F.: Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria. *Curr. Microbiol.*, 1997, 34 (2), 79-84.
- [19] Tanaka H., Hashiba H., Kok J., Mierau I.: Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum* biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66 (6), 2502-2512.
- [20] Taranto M.P., Fernandez Murga M.L., Lorca G., de Valdez G.F.: Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, 95, 86-91.
- [21] Tomaro-Duchesneau C.L., Jones M., Shah D., Jain P., Saha S., Prakash S.: Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: An *in vivo* investigation. *Biomed. Res. Int.*, 2014, #380316. DOI: 10.1155/2014/380316.
- [22] Usman H.A.: Bile tolerance, taurocholate deconjugation and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *J. Dairy Sci.*, 1999, 82 (2), 243-248.

CHOLESTEROL BINDING BY LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM CHILDREN**S u m m a r y**

The objective of the research study was to determine the ability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, *Lactobacillus casei* ATCC 334 and strains of lactic acid bacteria isolated from faeces of healthy children to bind cholesterol in the environment of model intestinal juice and MRS Broth medium. A cholesterol RTU enzymatic kit was used to determine the cholesterol residue in samples. The cultures were grown in 24-well titration plates. In order to determine the degree of cholesterol binding and OD₆₀₀, the absorbance was measured using a Spark 10M microplate reader. The strains with the highest degree of cholesterol binding were evaluated for their ability to grow and bind cholesterol from the environment with the increasing cholesterol load (1.66 g/dm³, 2.85 g/dm³, 3.75 g/dm³). *L. rhamnosus* and *L. casei* were able to bind 68.18 % and 83.6 % of cholesterol from the MRS Broth medium, respectively, while in the model intestinal juice those values were 60 % and 50 %, respectively. The strains isolated from the faeces of children were characterised by a high variability as regards the degree of binding cholesterol from the environment, whereas better results were achieved for the model intestinal juice (1.81 ÷ 77.99 %) than for the MRS Broth medium (0.49 ÷ 33.14 %). With the increasing amount of cholesterol in the environment, the strains tested showed a reduced increase in the biomass and this was correlated with the reduced degree of binding of that compound. As regards the model intestinal juice, the highest reduction in the level of cholesterol contained therein was obtained at its concentration of 1.66 g/dm³. The cholesterol concentration of 3.75 g/dm³ caused the increase in the biomass to be inhibited and thus the lowest quantity of this compound was removed from the environment.

Key words: LAB, cholesterol, hypocholesterolemic effect, model intestinal juice ☒

PAULINA MARKOWIAK-KOPEĆ, KATARZYNA ŚLIŻEWSKA

PRZEŻYWALNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW PROBIOTYCZNYCH W MODELU *IN VITRO* UKŁADU POKARMOWEGO DROBIU

Streszczenie

Celem pracy była ocena przeżywalności probiotycznych szczepów bakterii *Lactobacillus* spp. i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* podawanych bez dodatku paszy lub z jej udziałem w warunkach modelowych, symulujących wybrane odcinki przewodu pokarmowego drobiu. Mikroorganizmy te wchodziły w skład nowo opracowanych mieszanek probiotycznych (A, B i C). Przeżywalność badanych bakterii i drożdży w symulowanych warunkach wola, żołądka i jelita cienkiego oznaczano metodą hodowlaną. Początkowo średnia liczba bakterii *Lactobacillus* spp. wynosiła $(1,00 \div 1,95) \times 10^9$ jtk/ml, natomiast drożdży – $(1,04 \div 3,00) \times 10^7$ jtk/ml. W wyniku pasażu próbek bez dodatku paszy liczba bakterii oraz drożdży ulegała obniżeniu w kolejnych odcinkach symulowanego przewodu pokarmowego i w jelicie cienkim była niższa średnio o 2 rzędy wielkości. W obecności paszy natomiast liczba bakterii *Lactobacillus* spp. w jelicie cienkim była wyższa średnio o 1 rząd wielkości, a drożdży – średnio o 1,5 rzędu wielkości w porównaniu z mieszanekami bez dodatku paszy. Dodatek paszy stanowił zatem czynnik ochronny przed niekorzystnymi warunkami środowiska układu pokarmowego w badaniach modelowych. Na podstawie uzyskanych wyników można wskazać na potencjalne zastosowanie mieszanek probiotycznych jako dodatku do pasz dla drobiu.

Słowa kluczowe: probiotyki, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, układ pokarmowy, drób

Wprowadzenie

Trawienie pokarmu u drobiu odbywa się w układzie pokarmowym, który składa się z przełyku, wola, żołądka gruczołowego, żołądka mięśniowego, jelita cienkiego (dwunastnica, jelito czcze i biodrowe), jelita grubego (ślepe i proste) oraz kloaki [3]. Ptaki nie mają uzębienia, dlatego pokarm połykany jest w całości. Zostaje on zwilżony śliną w dziobie i przesuwany do przełyku, gdzie jest rozmiękczone i rozpuszczane przez enzymy i śluz [4, 20]. W żołądku gruczołowym następuje przygotowanie pokarmu do procesu trawienia. Na tym etapie wydzielany jest kwas solny. Następuje tu tak-

Mgr inż. P. Markowiak-Kopeć, dr hab. inż. K. Śliżewska, prof. nadzw., Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź. Kontakt: paulina.markowiak@edu.p.lodz.pl; katarzyna.slizewska@p.lodz.pl

że rozpuszczanie soli mineralnych oraz jonizacja elektrolitów. W żołądku mięśniowym dochodzi do roztarcia i wymieszania pokarmu z enzymami trawiennymi pochodzącymi z żołądka gruczołowego. Całkowita długość przewodu pokarmowego ptaków nie przekracza 5-krotnej długości ich ciała [2]. W skład jelita cienkiego drobiu wchodzi: dwunastnica, jelito czcze oraz jelito biodrowe. Dwunastnica łączy żołądek mięśniowy z jelitem czczym. Końcowy proces trawienia oraz absorpcja składników pokarmowych odbywa się w jelicie czczym i biodrowym.

Mikrobiota przewodu pokarmowego drobiu stanowi złożony ekosystem, a jego równowaga jest niezwykle ważna dla zachodzących procesów trawienia oraz wchłaniania pokarmów, a więc dla zdrowia i prawidłowego funkcjonowania ptaków [10]. W składzie mikrobioty przewodu pokarmowego zdrowego ptaka znajdują się głównie bakterie z rodzajów: *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* oraz paciorkowce i enterobakterie [10]. Jednym z wielu czynników mających wpływ na skład mikrobioty układu pokarmowego drobiu jest rodzaj podawanej paszy, jak również dodatków paszowych. Probiotyki, czyli żywe mikroorganizmy, które po podaniu w odpowiedniej ilości wywołują korzyści zdrowotne w organizmie gospodarza, są przykładem dodatków paszowych dla drobiu [7]. W procesie selekcji szczepy probiotyczne muszą jednak spełniać wiele kryteriów, m.in. wykazywać zdolność do przetrwania i utrzymania aktywności metabolicznej oraz wzrostu w układzie pokarmowym [5, 6].

Celem pracy była ocena przeżywalności probiotycznych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z dodatkiem paszy lub bez jej udziału w warunkach modelowych, symulujących wybrane odcinki przewodu pokarmowego drobiu (wole, żołądek, jelito cienkie).

Material i metody badań

Materiał biologiczny stanowiły szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, które wchodziły w skład trzech nowo opracowanych preparatów probiotycznych A, B i C (tab. 1).

Tabela 1. Skład preparatów probiotycznych A, B i C

Table 1. Composition of A, B and C probiotic preparations

A	B	C
<i>Lb. pentosus</i> ŁOCK 1094	<i>Lb. pentosus</i> ŁOCK 1094	<i>Lb. paracasei</i> ŁOCK 1091
<i>Lb. plantarum</i> ŁOCK 0860	<i>Lb. plantarum</i> ŁOCK 0860	<i>Lb. pentosus</i> ŁOCK 1094
<i>Lb. reuteri</i> ŁOCK 1092	<i>Lb. reuteri</i> ŁOCK 1092	<i>Lb. plantarum</i> ŁOCK 0860
<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0119	<i>Lb. rhamnosus</i> ŁOCK 1087	<i>Lb. reuteri</i> ŁOCK 1092
	<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0119	<i>Lb. rhamnosus</i> ŁOCK 1087
		<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0119

Szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* zostały wyizolowane z kiszzonek roślinnych (*Lb. plantarum* ŁOCK 0860) i treści jelitowej zwierząt monogastrycznych (*Lb. pentosus* ŁOCK 1094, *Lb. reuteri* ŁOCK 1092, *Lb. rhamnosus* ŁOCK 1087, *Lb. paracasei* ŁOCK 1091), natomiast drożdże *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 pochodziły ze środowiska gorzelniczego. Wszystkie użyte w badaniach szczepy probiotyczne zostały zdeponowane w Łódzkiej Kolekcji Czystych Kultur (ŁOCK 105) Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechniki Łódzkiej. Właściwości probiotyczne tych szczepów zostały opisane w zgłoszeniach [13 - 17] i opisie patentowym [18]. Skład poszczególnych preparatów ustalono na podstawie wyników badań dotyczących właściwości probiotycznych każdego z użytych mikroorganizmów. Zastosowanie odpowiednio: 3, 4 i 5 szczepów bakterii *Lactobacillus* w składzie mieszanek miało na celu sprawdzenie, która z kombinacji pozwoli na uzyskanie największej sumarycznej przeżywalności probiotyków w układzie pokarmowym drobiu.

W celu określenia przeżywalności bakterii *Lactobacillus* spp. i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w trakcie procesu trawienia zastosowano model *in vitro* układu pokarmowego drobiu, za pomocą którego odzwierciedlano warunki wola, żołądka (gruczołowego i mięśniowego) oraz jelita cienkiego (tab. 2).

Tabela 2. Model *in vitro* układu pokarmowego drobiuTable 2. *In vitro* model of the digestive tract of poultry

Odcinek przewodu pokarmowego Section of digestion tract	Roztwór symulujący Simulating solution	Ilość roztworu Quantity of solution [ml]	Czas zalegania pokarmu Time of gastric content being retained [min]
Wole Crop	50 mM bufor octanowy 50 mM acetate buffer	15,00	30
Żołądek Gizzard	1 M roztwór kwasu solnego 1 M solution of hydrochloric acid roztwór pepsyny w buforze octanowym solution of pepsin in acetate buffer	1,40 2,60	45
Jelito cienkie Small intestine	roztwór wodny pankreatyny aqueous solution of pancreatin 1 M roztwór wodorowęglanu sodu 1 M solution of sodium bicarbonate	3,25 3,25	60

Objaśnienia / Explanatory notes:

Wartość pH matrycy w poszczególnych etapach badań ustalano roztworami 1 M wodorotlenku sodu oraz 1 M kwasu solnego / pH of matrix at individual test stages was determined using solutions of 1M sodium hydroxide and 1 M hydrochloric acid.

Źródło / Source: opracowanie własne na podstawie [9, 11, 19] / the authors' own study based on [9, 11, 19].

Szczepy probiotyczne bakterii *Lactobacillus* i drożdży aktywowane w podłożach płynnych (odpowiednio MRS i YPG) bez dodatków paszowych (próby A, B i C) oraz z dodatkiem standardowej paszy dla drobiu (próby A+pasza, B+pasza i C+pasza) poddawano pasażowi w warunkach symulujących przewód pokarmowy drobiu. Trawienie treści pokarmowej inicjowano przez mieszanie badanych prób z buforem octanowym w ciągu 30 min (wole). Następnie dodawano kolejno soki żołądkowe i jelitowe w celu symulowania procesów trawienia odpowiednio w żołądku (45 min) i w jelicie cienkim (60 min). W każdym etapie badaną mieszaninę inkubowano w temp. 37 °C w warunkach ciągłego mieszania (150 obr./min) na wytrząsarce obrotowej w celu zapewnienia jednorodnego rozkładu wszystkich składników. Na początku każdego z odcinków przewodu pokarmowego oraz po upływie czasu zalegania pokarmu pobierano próbki do badań mikrobiologicznych. Metodą hodowlaną, w trzech powtórzeniach, wykonywano posiewy ilościowe z odpowiednich rozcieńczeń. W analizie zastosowano selektywne podłoża mikrobiologiczne i warunki inkubacji odpowiednie dla bakterii (MRS z nystatyną, temp. 37 °C, 2 dni) oraz drożdży (YPG z chloramfenikolem, temp. 30 °C, 5 dni). Po zakończonej inkubacji zliczano kolonie wyrosłe na płytkach i oceniano przeżywalność badanych mikroorganizmów probiotycznych w modelowym układzie pokarmowym drobiu.

Wyniki badań poddano analizie statystycznej. Normalność rozkładu zmiennych analizowano testem Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji testem Bartletta. Po potwierdzeniu rozkładu normalnego i jednorodności wariancji wyniki dotyczące liczby mikroorganizmów probiotycznych analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (One-Way ANOVA) w zależności od sposobu podania odpowiedniej mieszaniny probiotycznej. Natomiast procentową przeżywalność mikroorganizmów w modelowym układzie pokarmowym drobiu analizowano wieloczynnikową analizą wariancji (Multi-Way ANOVA) w zależności od rodzaju i sposobu podania mieszanki probiotycznej oraz etapu transferu. Istotność różnic między wartościami średnimi weryfikowano testem Tukeya ($p < 0,05$). Analizę statystyczną przeprowadzono w programie XLSTAT (Addinsoft SARL, Paryż, Francja).

Wyniki i dyskusja

Przeżywalność bakterii z rodzaju Lactobacillus spp.

Początkowa liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* spp. w badanych próbkach wynosiła $1,00 \times 10^9 \div 1,95 \times 10^9$ jtk/ml (rys. 1).

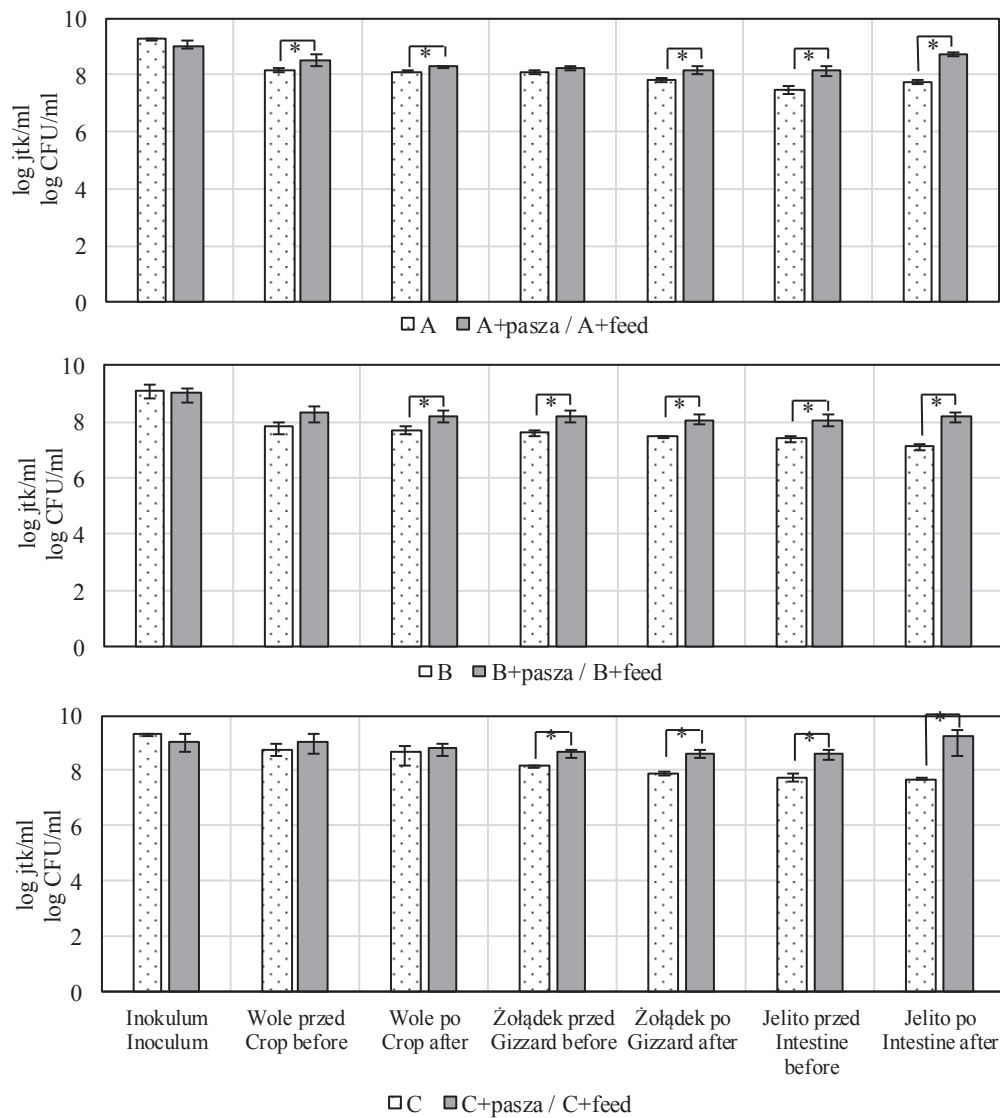
Pierwszym badanym odcinkiem przewodu pokarmowego w warunkach modelowych było wole, w którym czas zalegania pokarmu był najkrótszy i wynosił 30 min. W przypadku mieszanki C obniżenie liczby bakterii po inkubacji było nieznaczne (do $4,83 \times 10^8$ i $6,74 \times 10^8$ jtk/ml odpowiednio: bez dodatku paszy oraz z jej udziałem).

Natomiast w przypadku próby A bez dodatku paszy, jak i z jej dodatkiem, liczba ta obniżyła się średnio o 1 rząd wielkości (do $1,30$ i $2,06 \times 10^8$ jtk/ml). Znaczne obniżenie liczby bakterii *Lactobacillus* spp. (o 1,5 i 1 rząd wielkości) zaobserwowano w przypadku mieszanki B bez dodatku paszy, jak i z jej dodatkiem (do $5,13 \times 10^7$ i $1,52 \times 10^8$ jtk/ml) – rys. 1.

Pomimo niekorzystnych warunków panujących w żołądku w przypadku zastosowania mieszanki A liczba bakterii po 45 min nie obniżyła się znacząco w stosunku do poprzedniego odcinka pokarmowego. Stwierdzono ponadto, że liczba bakterii *Lactobacillus* spp. była statystycznie istotnie wyższa w przypadku dodatku paszy ($1,50 \times 10^8$ jtk/ml) w porównaniu z samą mieszanką bakterii ($7,00 \times 10^7$ jtk/ml). Po zastosowaniu mieszanki C nastąpiło obniżenie liczby bakterii do poziomu $8,16 \times 10^7$ jtk/ml, natomiast najbardziej znaczące obniżenie, do $2,99 \times 10^7$ jtk/ml, odnotowano w przypadku mieszanki B. Podobnie jak poprzednio, dodatek paszy wpłynął na statystycznie istotnie wyższą (średnio o 0,7 rzędu wielkości) liczbę bakterii w mieszance C oraz o 0,5 rzędu wielkości – w mieszance B (rys. 1).

Po 60 min zalegania pokarmu w warunkach symulujących jelito cienkie stwierdzono obniżenie liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus* do poziomu $5,05 \times 10^7$ jtk/ml i $1,29 \times 10^7$ jtk/ml w przypadku odpowiednio: mieszanki C i B. W wyniku trawienia mieszanki A odnotowano natomiast wzrost liczby tych bakterii średnio o 3,8 % (do $6,00 \times 10^7$ jtk/ml), co jest pozytywnym zjawiskiem (rys. 1, tab. 3). Dodatek paszy spowodował, że liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* po trawieniu w warunkach symulujących układ pokarmowy drobiu wzrosła statystycznie istotnie do poziomu $1,55 \times 10^8$ jtk/ml (B+pasza), $5,13 \times 10^8$ jtk/ml (A+pasza) i $1,72 \times 10^9$ jtk/ml (C+pasza) w porównaniu z próbą bez paszy (rys. 1). Udział bakterii *Lactobacillus* spp. na tym etapie wzrósł odpowiednio o: 8 % (A+pasza), 3 % (B+pasza) i 25 % (C+pasza) w porównaniu z próbami bez dodatku paszy (tab. 3).

W przypadku mieszanek A i B poddanych trawieniu w warunkach symulujących układ pokarmowy drobiu przeżywalność bakterii *Lactobacillus* spp. po zakończeniu pasaży wynosiła odpowiednio: 84,2 i 78,0 %. Dodatek paszy spowodował wzrost przeżywalności bakterii odpowiednio o 14,1 i 13,1 % (tab. 3). W przypadku mieszanki C, zawierającej w swoim składzie największą liczbę szczepów probiotycznych, stwierdzono najwyższą przeżywalność tych bakterii wynoszącą na koniec pasaży nawet 107,3 % w przypadku dodatku paszy, która stymulowała wzrost bakterii. Dodatek czynnika ochronnego, jaki stanowiła pasza, miał zatem statystycznie istotny wpływ na wzrost przeżywalności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w warunkach symulujących odcinki przewodu pokarmowego (rys. 1, tab. 3).



Objaśnienia / Explanatory notes:

przed i po – oznacza poszczególne odcinki układu pokarmowego przed inkubacją i po niej / before and after – means individual section of digestive tract before and after incubation. Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments); * – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) / statistically significant differences ($p < 0.05$).

Rys. 1. Przeżywalność bakterii *Lactobacillus* spp. w modelu *in vitro* układu pokarmowego drobiu

Fig. 1. Survivability of *Lactobacillus* spp. in *in vitro* model of digestive tract of poultry

Tabela 3. Udział bakterii *Lactobacillus* spp. w modelowym układzie pokarmowym drobiu przed trawieniem i po nimTable 3. Content of *Lactobacillus* spp. in model digestive tract of poultry before and after digestion

Etap Step		Udział bakterii <i>Lactobacillus</i> spp. / Content of <i>Lactobacillus</i> spp. [%]					
		A	A+pasza A+feed	B	B+pasza B+feed	C	C+pasza C+feed
Inokulum Inoculum		100,0 ± 0,0 B					
Wole Crop	przed before	88,2 ± 0,2 FGHIJKL	94,0 ± 1,6 ABCDEF	88,6 ± 2,2 FGHIJKL	92,1 ± 0,1 DEFGH	92,7 ± 1,1 CDEFGH	99,3 ± 0,6 B
	po after	87,5 ± 0,7 GHIJKLM	93,1 ± 2,3 CDEFG	86,8 ± 3,9 HIJKLMN	90,2 ± 1,5 FGHIJ	89,7 ± 3,3 FGHIJK	97,1 ± 2,4 BCDE
Żołądek Gizzard	przed before	87,0 ± 0,7 GHIJKLMN	91,9 ± 1,8 DEFGH	85,1 ± 3,5 IJKLMNOP	89,9 ± 1,8 FGHIJK	87,6 ± 0,2 GHIJKLM	98,2 ± 0,2 BC
	po after	84,3 ± 0,2 JKLMNOP	90,5 ± 1,1 FGHI	82,7 ± 2,9 LMNOP	88,4 ± 2,6 FGHIJKL	84,0 ± 0,4 KLMNOP	98,0 ± 0,1 BCD
Jelito cienkie Small intestine	przed before	80,4 ± 0,3 OP	90,3 ± 1,1 FGHIJ	81,1 ± 1,5 NOP	88,1 ± 2,4 FGHIJKL	83,3 ± 0,7 LMNOP	97,7 ± 0,3 BCD
	po after	84,2 ± 0,2 JKLMNOP	98,3 ± 2,3 BC	78,0 ± 4,4 P	91,1 ± 4,1 EFGHI	81,9 ± 0,5 MNOP	107,3 ± 2,6 A

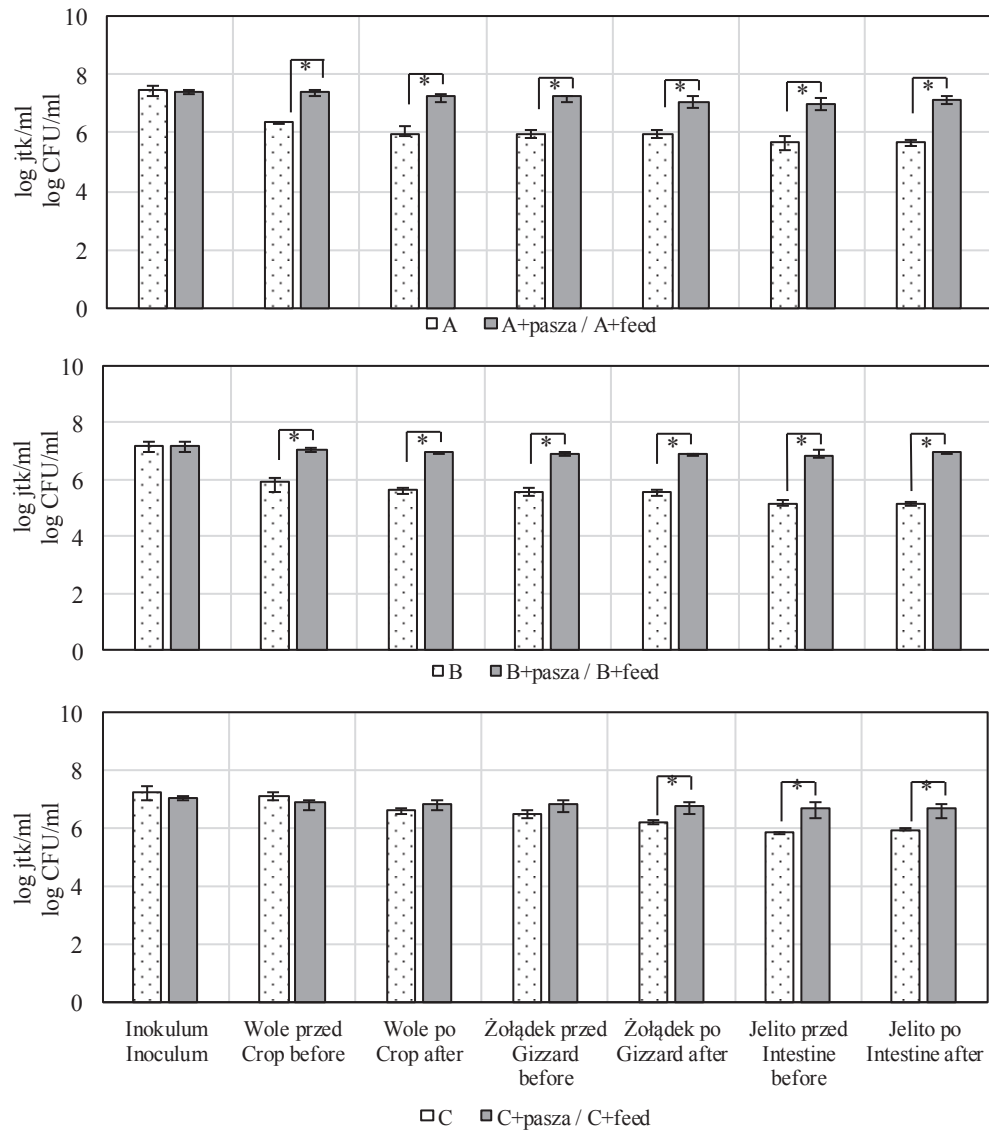
Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations. Wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie w zależności od rodzaju i sposobu podania mieszanki probiotycznej oraz etapu transferu ($p < 0,05$) / Mean values denoted by different letters differ statistically significantly depending on type and way of administering probiotic mixture and on transfer step ($p < 0.05$).

Warto zaznaczyć, że każda z badanych mieszanek probiotycznych początkowo charakteryzowała się taką samą liczbą bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Różnice dotyczyły liczby szczepów bakterii *Lactobacillus* spp. Otrzymane wyniki wskazują na najwyższą przeżywalność mieszanki C, zawierającej w składzie 5 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (np. szczep *Lb. paracasei* ŁOCK 1091 nieobecny w składzie pozostałych mieszanek). Korzystny efekt obserwowany był szczególnie w przypadku podania mieszanek probiotycznych wraz z paszą. Prawdopodobnie za takie działanie może odpowiadać zastosowanie największej liczby różnych szczepów i efekt synergistyczny pomiędzy nimi. Dokładne wyjaśnienie mechanizmów zachodzących pomiędzy poszczególnymi szczepami jest jednak bardzo trudne i wymaga dalszych badań.

Przeżywalność drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Początkowa liczba drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wynosiła $1,04 \times 10^7 \div 2,61 \times 10^7$ jtk/ml (rys. 2).



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 2. Przeżywalność drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelu *in vitro* układu pokarmowego drobiu

Fig. 2. Survivability of *Saccharomyces cerevisiae* in *in vitro* model of digestive tract of poultry

Po 30 min inkubacji mieszanki C w warunkach symulujących wole liczba drożdży uległa obniżeniu do poziomu odpowiednio: $4,00 \times 10^6$ i $7,40 \times 10^6$ jtk/ml w przypadku braku paszy bądź jej dodatku. W mieszankach A i B zaobserwowano natomiast

obniżenie liczby drożdży o 1,5 rzędu wielkości. Dodatek paszy spowodował natomiast statystycznie istotny wzrost liczby drożdży do poziomu $1,76 \times 10^7$ jtk/ml (mieszanka A) oraz $9,80 \times 10^6$ jtk/ml (mieszanka B) – rys. 2.

Pomimo niekorzystnych warunków panujących w żołądku, również liczba drożdży nie uległa znaczącemu obniżeniu i wynosiła: $3,61 \times 10^5$ jtk/ml (mieszanka B), $9,00 \times 10^5$ jtk/ml (mieszanka A) i $1,71 \times 10^6$ jtk/ml (mieszanka C). Dodatek paszy spowodował, że liczba drożdży *S. cerevisiae* była statystycznie istotnie wyższa i wynosiła: $5,54 \times 10^6$ jtk/ml (C+pasza), $7,80 \times 10^6$ jtk/ml (B+pasza) i $1,15 \times 10^7$ jtk/ml (A+pasza) – rys. 2.

Zarówno w przypadku mieszanki A, B, jak i C obserwowano wzrost liczby drożdży o: 5,1 i 1,9 % (odpowiednio: mieszanka A+pasza, mieszanka A), 3,4 i 1,3 % (odpowiednio: mieszanka B+pasza, mieszanka B) oraz 1,7 % (mieszanka C) podczas inkubacji w warunkach symulujących jelito cienkie (tab. 4).

W przypadku mieszanek probiotycznych poddanych trawieniu bez paszy udział drożdży po zakończeniu pasażu wynosił średnio 69,4 % (mieszanka B), 72,7 % (mieszanka A) i 80,5 % (mieszanka C). Dodatek paszy miał natomiast statystycznie istotny wpływ na zwiększenie przeżywalności drożdży (tab. 4).

Tabela 4. Udział drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelowym układzie pokarmowym drobiu
Table 4. Content of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in model digestive tract of poultry

Etap Step		Udział drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Content of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast [%]					
		A	A+pasza A+feed	B	B+pasza B+feed	C	C+pasza C+feed
Inokulum Inoculum		100,0 ± 0,0 A					
Wole Crop	przed before	85,0 ± 1,4 DEFG	99,3 ± 1,0 A	83,1 ± 3,3 FG	99,1 ± 1,6 A	98,4 ± 1,4 AB	96,3 ± 2,2 ABC
	po after	78,6 ± 1,2 GHIJ	97,5 ± 0,7 AB	78,5 ± 2,7 GHIJ	98,6 ± 2,4 AB	89,7 ± 5,2 BCDEF	95,8 ± 2,7 ABC
Żołądek Gizzard	przed before	78,3 ± 0,6 GHIJ	95,6 ± 1,8 ABC	77,0 ± 3,6 GHIJK	97,4 ± 1,7 ABC	88,2 ± 5,3 CDEF	95,3 ± 3,0 ABC
	po after	77,2 ± 1,5 GHIJK	93,6 ± 0,0 ABCDE	76,6 ± 3,3 GHIJK	96,8 ± 2,1 ABC	84,3 ± 4,7 EFG	94,2 ± 3,2 ABCD
Jelito cienkie Small intestine	przed before	70,8 ± 5,2 IJK	92,9 ± 0,2 ABCDE	68,2 ± 4,9 K	95,0 ± 3,6 ABC	78,8 ± 3,6 GHI	93,2 ± 4,0 ABCDE
	po after	72,7 ± 4,5 HIJK	97,9 ± 3,8 AB	69,4 ± 1,0 JK	98,4 ± 2,0 AB	80,5 ± 3,5 FGH	92,5 ± 2,8 ABCDE

Objaśnienia jak pod tab. 3. / Explanatory notes as in Tab. 3.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono nieznaczne zmniejszenie przeżywalności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* spp. i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* obecnych w mieszankach A, B i C podczas pasażu w warunkach symulujących żołądek. Wyniki te wskazują na wysoką tolerancję tych mikroorganizmów na sok żołądkowy i niskie pH, co jest zjawiskiem bardzo korzystnym. Wyniki badań *in vitro* przeprowadzonych wcześniej w celu określenia właściwości probiotycznych zastosowanych szczepów potwierdziły ich odporność na niskie pH i sole żółci. Tolerancja szczepów na warunki panujące w żołądku stwierdzona natomiast w niniejszych badaniach pozwala na dodatkowe potwierdzenie kluczowych właściwości probiotycznych badanych szczepów.

Warto zaznaczyć, że liczba bakterii *Lactobacillus* spp. wzrastała podczas inkubacji w warunkach jelita cienkiego mieszanki A (zarówno bez dodatku paszy, jak i z jej udziałem), natomiast w przypadku mieszanek B i C – tylko z dodatkiem paszy. Również w przypadku drożdży na tym etapie transferu obserwowano zwiększenie ich liczby.

Podobne obserwacje opisano w badaniu przeżywalności przetrwalników bakterii *Bacillus* spp. DFM (ang. *as directfed microbials*) w warunkach symulujących przewód pokarmowy drobiu. Niezależnie od składu paszy zaobserwowano obniżenie liczby przetrwalników bakterii w żołądku oraz ich wzrost (nawet o 2 rzędy wielkości) w części jelitowej [9].

Przeżywalność mikroorganizmów probiotycznych może również zależeć od postaci, w jakiej są podawane (forma utrwalenia oraz rodzaj matrycy) [9]. Musikasang i wsp. [12] wykazali ochronny wpływ mikrokapsułkowania szczepu bakterii *Enterococcus durans* KT3L20 w modelu *in vitro* układu pokarmowego drobiu. Stwierdzili, że metoda ta powoduje zwiększenie przeżywalności tego szczepu średnio o 1 rząd wielkości [12]. Przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej w żołądku może wzrosnąć w obecności produktów żywnościowych lub paszowych, które mają wpływ na wartość pH i mogą chronić komórki przed wpływem pepsyny i kwasu żołądkowego [1]. W badaniach własnych wykazano ochronny wpływ paszy na przeżywalność bakterii *Lactobacillus* spp. i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach symulujących przewód pokarmowy drobiu.

Wnioski

1. Stwierdzono, że szczepy bakterii *Lactobacillus* spp. oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae* zastosowane w mieszankach probiotycznych A, B i C wykazują wysoką przeżywalność w symulowanym układzie pokarmowym drobiu.
2. Dodatek paszy stanowi czynnik ochronny i ma korzystny wpływ na zwiększenie przeżywalności bakterii, zwłaszcza w warunkach jelita cienkiego.

3. Wysoka przeżywalność mikroorganizmów *Lactobacillus* spp. oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelu *in vitro* układu pokarmowego może wskazywać na ich potencjalne zastosowanie jako komponentów preparatów probiotycznych i umożliwia kontynuację badań w warunkach *in vivo*.

Projekt został częściowo sfinansowany ze środków Funduszu Młodych Liderów Nauki, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej oraz grantu NCBIR o numerze PBS3/A8/32/2015.

Literatura

- [1] Bergamini C.V., Hynes E.R., Quiberoni A., Suarez V.B., Zalazar C.A.: Probiotic bacteria as adjunct starters: Influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Res Int.*, 2005, 38, 597-604.
- [2] Biavati B., Mattarelli P.: *Bifidobacterium*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Hoboken 2015. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm00019.
- [3] Burni D., Hoare B., DiCostanzo J., BirdLife International, Benstead P. (Red.): *Ptaki. Encyklopedia*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2009.
- [4] Denbow M.D.: Gastrointestinal anatomy and physiology. Chapter 12. In: *Sturkie's Avian Physiology*. 5th ed. Ed. G. C. Whittow. Academic Press, San Diego 2000, pp. 299-324.
- [5] European Food Safety Authority (EFSA): Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.*, 2005, 226, 1-12.
- [6] FAO/WHO: *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. FAO/WHO, London, Canada, 2002.
- [7] Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C., Sanders M.E.: Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11, 506-514.
- [8] Klingberg T.D., Budde B.B.: The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, 109, 157-159.
- [9] Latorre J.D., Hernandez-Velasco X., Kuttappan V.A., Wolfenden R.E., Vicente J.L., Wolfenden A.D., Bielke L.R., Prado-Rebolledo O.F., Morales E., Hargis B.M., Tellez G.: Selection of *Bacillus* spp. for cellulase and xylanase production as direct-fed microbials to reduce digesta viscosity and *Clostridium perfringens* proliferation using an *in vitro* digestive model in different poultry diets. *Front. Vet. Sci.*, 2015, 2, #25. DOI: 10.3389/fvets.2015.00025.
- [10] Lu I., Idris U., Hormon B.: Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 6816-6824.
- [11] Menezes-Blackburn D., Gabler S., Greiner R.: Performance of seven commercial phytases in an *in vitro* simulation of poultry digestive tract. *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63 (27), 6142-6149.
- [12] Musikasang H., Tani E.A., H-kittikun A., Maneerat S.: Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 25, 1337-1345.

- [13] Śliżewska K., Chlebicz A.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus paracasei*. Zgłoszenie patentowe nr 422603, 2017.
- [14] Śliżewska K.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus pentosus*. Zgłoszenie patentowe nr 422589, 2017.
- [15] Śliżewska K.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus reuteri*. Zgłoszenie patentowe nr 422593, 2017.
- [16] Śliżewska K.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus rhamnosus*. Zgłoszenie patentowe nr 422602, 2017.
- [17] Śliżewska K.: Szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Zgłoszenie patentowe nr 422709.
- [18] Śliżewska K., Motyl I., Libudziński Z., Otlewska A., Burchardt H., Klecha J., Henzler J.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus plantarum*. Zgłoszenie patentowe nr 401554. Opis patentowy nr PL 221 959 B1, 2012.
- [19] Versantvoort C.H., Oomen A.G., Van de Kamp E., Rempelberg C.J., Sips A.J.: Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. Food Chem. Toxicol., 2005, 43 (1), 31-40.
- [20] Zawadzki W., Króliczewska B.: Specyfika pobierania, trawienia i metabolizmu składników pokarmowych u ptaków. W: Choroby drobiu. Red. M. Mazurkiewicz. Wyd. UP we Wrocławiu, Wrocław 2011, ss. 40-59.

SURVIVABILITY OF PROBIOTIC MICROORGANISMS IN *IN VITRO* MODEL OF POULTRY DIGESTIVE TRACT

S u m m a r y

The objective of the research study was to assess the survivability of probiotic strains of *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae* under the model conditions that simulated selected sections of the digestive tract of poultry. The strains tested were administered to the animals without feed or with feed. The microorganisms as named above are included in the newly developed probiotic mixtures (A, B and C). The survivability of the bacteria and yeasts tested under the simulated conditions of the crop, gizzard and small intestine was determined using a culture method. Initially the average count of *Lactobacillus* spp. was $1.00 - 1.95 \times 10^9$ CFU/ml, while the average count of yeast was $1.04 - 3.00 \times 10^7$ CFU/ml. As a result of the passage of samples without feed, the count of bacteria and yeast was reduced in the subsequent sections of the simulated digestive tract; in the small intestine it was, on average, 2 orders of magnitude lower. However in the case of the feed with probiotic mixtures, the count of *Lactobacillus* spp. in the small intestine was, on average, 1 order of magnitude higher and that of yeast, on average, 1.5 orders of magnitude higher compared to the mixtures without feed. Thus, the added feed constituted a protective factor against the adverse conditions of the environment of digestive tract under the model study. Based on the results obtained, it is concluded that probiotic mixtures may be potentially applied as an additive in feeds intended for poultry.

Key words: probiotics, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, digestive tract, poultry 

KATARZYNA NEFFE-SKOCIŃSKA, KATARZYNA DYBKA-STĘPIEŃ,
HUBERT ANTOLAK

IZOLACJA I IDENTYFIKACJA SZCZEPÓW BAKTERII KWASU OCTOWEGO O POTENCJALNYCH WŁAŚCIWOŚCIACH PROZDROWOTNYCH

Streszczenie

Celem pracy była izolacja i identyfikacja szczepów bakterii kwasu octowego (AAB) w systemie polifazowym oraz wstępne zdefiniowanie *in vitro* ich potencjalnych właściwości probiotycznych w warunkach laboratoryjnych.

Materiał do izolacji bakterii kwasu octowego stanowiły owoce sezonowe pochodzące z lokalnych upraw z województwa mazowieckiego i łódzkiego oraz kultura startowa do produkcji Kombuchy. Identyfikację szczepów przeprowadzono z zastosowaniem systemu polifazowego bazującego na charakterystyce morfologicznej, uzdolnieniach biochemicznych i identyfikacji genetycznej. Na podstawie otrzymanych wyników utworzono kolekcję szczepów AAB bezpiecznych dla zdrowia ludzi, następnie określono antybiotykowrażliwość na 12 wybranych substancji bakteriobójczych i wykonano testy *in vitro* przeżywalności wyselekcjonowanych szczepów w warunkach modelowego przewodu pokarmowego człowieka. Na podstawie analizy fenotypu i sekwencjonowania genu 16S rRNA spośród 9 izolatów bakterii kwasu octowego do badań wybrano 3 szczepy należące do gatunku *Gluconobacter oxydans*: H31 wyizolowany z czarnej porzeczki oraz H30 i H32 – z kultury startowej do produkcji herbaty Kombucha. Stwierdzono, że 2 szczepy: *G. oxydans* H30 wyizolowany z Kombuchy i *G. oxydans* H31 pochodzący z czarnej porzeczki charakteryzują się dobrą przeżywalnością średnio na poziomie 6 log jtk/ml podczas pasaży przez modelowy układ pokarmowy człowieka i tym samym spełniają jedno z podstawowych kryteriów dla bakterii potencjalnie probiotycznych. Wszystkie badane szczepy wykazywały zbliżoną antybiotykowrażliwość. Przeprowadzona diagnostyka wyselekcjonowanych szczepów bakterii kwasu octowego stanowi podstawę do dalszych badań tych mikroorganizmów w kierunku potwierdzenia pozostałych cech probiotycznych.

Słowa kluczowe: bakterie kwasu octowego (AAB), probiotyki, przeżywalność *in vitro*, owoce, Kombucha

Dr inż. K. Neffe-Skocińska, 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, dr inż. K. Dybka-Stępień, dr inż. H. Antolak, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź. Kontakt: katarzyna_neffe_skocinska@sggw.pl

Wprowadzenie

Bakterie kwasu octowego (ang. *Acetic Acid Bacteria*, AAB) są to tlenowe, Gram-ujemne pałeczki należące do bardzo zróżnicowanej grupy mikroorganizmów szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie. Źródłem ich izolacji są przede wszystkim środowiska pochodzenia roślinnego, w tym kwiaty, owoce, ale również żywność naturalnie fermentowana, octy, napój herbaciany Kombucha, fermentowany napój na bazie ziaren kakaowca oraz mikrobiologicznie zanieczyszczone wina, piwa i miody pitne [1, 2, 6, 8, 13]. Rodzaje *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* i *Komagataeibacter* od tysiącleci mają znaczący udział w życiu i działalności człowieka. Są one wykorzystywane zarówno w przemyśle spożywczym, jak i w biotechnologii. W literaturze przedmiotu znajdują się doniesienia na temat prozdrowotnego działania metabolitów syntezowanych przez bakterie AAB [10, 12, 17]. Wybrane szczepy AAB charakteryzują się szeregiem właściwości prozdrowotnych, w tym zdolnością do produkcji kwasu glukonowego, glukuronowego i syntezy witaminy C [10, 12, 14]. Mimo wielu korzyści zdrowotnych nie są one uznawane jako potencjalnie probiotyczne. Dlatego zbadanie tej grupy mikroorganizmów pod względem ich właściwości probiotycznych, a tym samym pozytywnego oddziaływania na ludzi, może stanowić dobrą alternatywę dla konwencjonalnych probiotyków.

Celem pracy była izolacja i identyfikacja bakterii kwasu octowego w systemie polifazowym z surowców pochodzenia roślinnego oraz wstępne zdefiniowanie potencjalnych właściwości probiotycznych *in vitro* otrzymanych szczepów.

Materiał i metody badań

Materiał do izolacji bakterii kwasu octowego stanowiły owoce sezonowe pochodzące z lokalnych upraw z województwa mazowieckiego i łódzkiego: maliny (*Rubus idaeus* L.), mirabelki (*Prunus domestica* L.), jabłka (*Malus domestica* L.), poziomki (*Fragaria vesca* L.), czarne porzeczki (*Ribes nigrum* L.) i czerwone porzeczki (*Ribes rubrum* L.). W celu wyizolowania szczepów bakterii AAB materiał roślinny poddawano fermentacji. Surowiec o masie 50 g zalewano 100 ml jałowego roztworu soli fizjologicznej z 2-procentowym dodatkiem etanolu. Proces fermentacji prowadzono na wytrząsarce przez 96 h w temp. 28 °C.

Izolację szczepów bakterii AAB prowadzono metodą posiewu powierzchniowego z wykorzystaniem modyfikowanego podłoża stałego GCA (ang. *Glucose Calcium Carbonate and Agar*) zawierającego składniki wymagane do wzrostu bakterii (2 % glukozy, 0,3 % peptonu K, 0,3 % ekstraktu drożdżowego, 0,7 % węglanu wapnia). Podłoża uzupełniano 2-procentowym dodatkiem alkoholu etylowego, który stanowi podstawowy substrat do tworzenia kwasu octowego. Do pożywki dodawano także

nystatynę hamującą wzrost drożdży i pleśni. Zaszczepione podłoża inkubowano przez 72 h w temp. 28 °C, systematycznie oceniając wzrost mikrobioty.

Jako źródło izolacji AAB stosowano również kulturę startową fermentowanego napoju herbacianego Kombucha (ang. *Symbiotic Cultures of Bacteria and Yeast*, SCOBY). W celu wyizolowania monokultur bakterii kwasu octowego kulturę startową wykorzystywano do zaszczepiania naparu z czarnej herbaty, który sporządzano według Neffe-Skocińskiej i wsp. [12]. Z tak przygotowanego napoju fermentowanego prowadzono izolację czystych kultur AAB. Wykonywano szereg 10-krotnych rozcieńczeń, przenosząc 1 ml napoju do 9 ml soli fizjologicznej, następnie wykonywano posiew powierzchniowy napoju na podłoże GCA. Zaszczepione pożywki inkubowano przez 72 h w temp. 28 °C.

Selekcja kultur bakterii kwasu octowego polegała na ocenie makroskopowych cech wzrostu mikroorganizmów, obserwacjach mikroskopowych oraz podstawowych testach biochemicznych. Po inkubacji posiewów na podłożu GCA, białe, kremowe, brązowe i różowe kolonie charakteryzujące się zdolnością tworzenia kwasów organicznych (powstanie stref przejaśnienia podłoża na skutek rozpuszczenia węglanu wapnia) przesiewano na nową agarową pożywkę GCA techniką posiewu redukcyjnego. Otrzymane monokultury oceniano mikroskopowo z zastosowaniem mikroskopu OLYMPUS BX41 (Olympus, Japonia) wyposażonego w wysokorozdzielczą kamerę cyfrową DP72. Podstawowe testy biochemiczne obejmowały określenie aktywności oksydazy cytochromowej IV (Merck, Niemcy), katalazy (Merck, Niemcy) i aminopeptydazy L-alaniny (Merck, Niemcy).

W kolejnym etapie dokonywano genetycznej identyfikacji wybranych monokultur szczepów AAB. Izolację genomowego DNA przeprowadzano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology, Polska), postępując zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta. W celu amplifikacji genu 16S rRNA przeprowadzano reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR) z użyciem termocyklera MJ Mini (Bio-Rad Hercules, CA, USA) zgodnie z metodyką Kręgiel i wsp. [11], wykorzystując startery o sekwencjach nukleotydowych 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAT-3' i 5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3'). Mieszanina reakcyjna zawierała 24 µl polimerazy REDTaq ReadyMix (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 24 µl wody o czystości przeznaczonej do reakcji PCR, 1 µl matrycy DNA (50 ng) i po 0,4 µl starterów (100 µM). Protokół amplifikacji obejmował wstępną denaturację (94 °C, 2 min) i 39 cykli składających się z etapu denaturacji (94 °C, 1 min), hybrydyzacji (55 °C, 1 min), elongacji (72 °C, 3 min) oraz końcową elongację w temp. 72 °C w ciągu 2 min. Następnie produkty reakcji PCR poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu w 1-procentowym żelu agarozowym w buforze 0,5×TBE z dodatkiem barwnika SimplySafe (EURx, Polska). Trzeci etap identyfikacji genetycznej obejmował sekwencjonowanie produktów PCR. W tym celu używano terminatora BigDye Terminator Ready Reaction Cycle

Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) oraz sekwenatora Applied Biosystems model 3730 (Genomed, Polska). Otrzymane sekwencje nukleotydowe porównywano z sekwencjami genu 16S rRNA bakterii kwasu octowego, zdeponowanymi w bazie The National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA), przy użyciu programu BLASTN 2.2.27+ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Etap izolacji i identyfikacji szczepów AAB przeprowadzano w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej.

Drugi etap badań prowadzono w Zakładzie Higieny i Zarządzania Jakością Żywności SGGW w Warszawie, a dotyczył on oceny wrażliwości na wybrane antybiotyki oraz przeżywalności wyselekcjonowanych szczepów AAB w warunkach modelowego przewodu pokarmowego człowieka (testy *in vitro*).

Testy wrażliwości badanych szczepów AAB na wybrane antybiotyki wykonywano za pomocą pasków gradientowych MIC Strip (Liofilchem Diagnostici, Włochy). Metoda polega na oznaczeniu minimalnego stężenia hamującego (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) antybiotyku przeciwko mikroorganizmom na impregnowanym pasku papierowym o zdefiniowanym gradiencie stężenia danej substancji bakteriobójczej ($\mu\text{g/ml}$).

Ostatnim etapem zaplanowanych badań było określenie przeżywalności szczepów AAB w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego. Skład i sposób przygotowania soków trawiennych wykonywano na podstawie publikacji Rzepkowskiej i wsp. [13]. Przygotowane roztwory elektrolitów poddawano sterylizacji w temp. 121 °C przez 15 min. Enzymy (Sigma Aldrich, Niemcy), takie jak lizozym (1 g/l), pepsynę (0,3 g/l) i pankreatynę (1 g/l) dodawano bezpośrednio przed rozpoczęciem doświadczenia. Analizowano dwa poziomy pH soku żołądkowego: 2,0 i 2,5. Przeżywalność bakterii oznaczano przed upływem 120 min trawienia w soku żołądkowym oraz po tym czasie. Podobnie postępowano w przypadku soku jelitowego. Prowadzono analizy przed upływem 180 min trawienia szczepów w żółci o stężeniu 0,3 % oraz po tym czasie. Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach, niezależnie dla każdego zakresu pH soku żołądkowego przy stałym pH soku jelitowego i stężeniu żółci. Proces inkubacji soków trawiennych z dodatkiem badanych szczepów bakterii AAB prowadzono w temp. 37 °C. Do badań przygotowywano 24-godzinne hodowle szczepów AAB w płynnej pożywce GCA. Początkowa liczba komórek bakterii w inokulum wynosiła średnio ok. 7 log jtk/ml. Posiewy mikrobiologiczne w kierunku określenia przeżywalności badanych bakterii wykonywano metodą kropelkową przed inkubacją w odpowiednim soku trawiennym i po niej. W tym celu pobierano po 100 μl zawiesiny i posiewano po 5 kropel o objętości 20 μl na powierzchnię płytek z zastygniętym podłożem GCA. Po wchłonięciu zawiesiny płytki inkubowano przez 48 h w temp. 25 °C.

Analizę wyników przeprowadzono w programie Statistica (wersja 13, Statsoft, Polska). Wykonano test T dla prób zależnych przy $p \leq 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Bakterie kwasu octowego należą do bardzo zróżnicowanej grupy mikroorganizmów zarówno pod względem morfologicznym jak i biochemicznym. Cechą charakterystyczną wszystkich bakterii AAB jest aktywność katalazy i aminopeptydazy L-alaniny przy jednoczesnym braku aktywności oksydazy cytochromowej IV, co m.in. pozwala odróżnić omawiane mikroorganizmy od pozostałej mikroflory badanych surowców, w tym od bakterii fermentacji mlekowej. Otrzymane szczepy AAB na podłożu GCA rosły w postaci kremowych lub jasnobrązowych kolonii z wyraźnymi strefami przejaśnienia, które powstały w wyniku rozpuszczenia węglanu wapnia przez syntezowane kwasy organiczne. Niektóre z otrzymanych szczepów AAB charakteryzowały się zdolnością syntezy barwnych metabolitów do środowiska, o czym świadczyła brązowa barwa pożywki hodowlanej. Wszystkie wyizolowane i wybrane do dalszych badań szczepy AAB wykazywały charakterystyczne dla tej grupy właściwości biochemiczne. W związku z powyższym już po pierwszym etapie identyfikacji fenotypowej dokonano selekcji otrzymanych szczepów i wybrano szczepy bakterii pochodzące z malin, mirabelek, czarnej i czerwonej porzeczki oraz z Kombuchy. Na tym etapie wyselekcjonowano łącznie 9 szczepów AAB. Z uwagi na otrzymane wyniki testów biochemicznych, jak również zdolność do tworzenia brązowego barwnika, wyizolowane szczepy wstępnie zaklasyfikowano do rodzajów *Gluconobacter* i *Komagataeibacter* (tab. 1).

Do dalszych badań dotyczących przeżywalności w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego i oporności na wybrane antybiotyki wybrano 3 szczepy należące do gatunku *Gluconobacter oxydans* – H30, H31 i H32 (tab. 2). Szczepy wybrano na podstawie otrzymanych wyników identyfikacji genotypowej z wykorzystaniem sekwencjonowania genu 16S rRNA. Podczas wyboru kierowano się właściwościami rodzaju *Gluconobacter*, który nie wykazuje patogenności w stosunku do ludzi i zwierząt. Dodatkowo bakterie z tego rodzaju są szeroko stosowane w przemyśle, zarówno spożywczym, biotechnologicznym, jak i do produkcji biosensorów [9, 16, 17]. *Gluconobacter* sp. są szczególnie wartościowe ze względu na zdolność do produkcji prozdrowotnego kwasu glukonowego i glukuronowego. Wichienchot i wsp. [16] zaobserwowali, że glukooligosacharydy produkowane przez szczep *G. oxydans* NCIMB 4943 wykazują właściwości prebiotyczne w stosunku do mikroflory jelitowej człowieka. Dodatkowo bakterie AAB, w tym *Gluconobacter* sp. cechuje oporność na niskie pH środowiska [8, 9].

Liczba bakterii AAB w hodowlach wyjściowych użytych do badań *in vitro* wynosiła dla wszystkich badanych szczepów średnio 7 log jtk/ml. Przedstawiono wyniki przy dwóch wartościach pH soku żołądkowego (2 i 2,5) oraz pH soku jelitowego 7,8 (rys. 1 i 2). Wykazano, że sok żołądkowy o pH 2 z dodatkiem pepsyny i lizozymu wpłynął istotnie na liczbę komórek AAB. Zaobserwowano, że szczep *G. oxydans* H30

Tabela 1. Wyniki podstawowych testów biochemicznych izolatów AAB

Table 1. Results of basic biochemical tests for AAB isolates

Symbol szczepu Symbol of strain	Źródło izolacji Source of isolation	Aktywność katalazy Catalase activity	Aktywność oksydazy Oxidase activity	Aktywność aminopeptydazy Aminopeptidase activity	Klasyfikacja wstępna Preliminary classification
H19	Malina Raspberry	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H21	Mirabelka Mirabelle	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H23	Malina Raspberry	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H24	Czerwona porzeczka Red currant	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H28	Czarna porzeczka Black currant	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H29	Malina Raspberry	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H30	Kombucha	+	-	+	<i>Komagataeibacter</i> sp.
H31	Czarna porzeczka Black currant	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H32	Kombucha	+	-	+	<i>Komagataeibacter</i> sp.

Objaśnienia / Explanatory notes:

„+” – wykazuje aktywność wybranego enzymu / shows activity of selected enzyme; „-” – brak aktywności wybranego enzymu / no activity of the selected enzyme.

wyizolowany z Kombuchy i szczep *G. oxydans* H31 pochodzący z czarnej porzeczki charakteryzują się stosunkowo małą wrażliwością na modelowe warunki układu pokarmowego człowieka, a tym samym spełniają wymagania stawiane bakteriom potencjalnie probiotycznym. Największą wrażliwością charakteryzował się szczep H32 pochodzący z kultury startowej Kombuchy. Zmniejszenie liczby bakterii obserwowano również w środowisku o pH 2,5. W tym przypadku zmniejszenie wynosiło jeden rząd logarytmiczny po 2 h inkubacji w soku żołądkowym (6,68 log jtk/ml) i dwa rzędy po 3-godzinnej inkubacji w soku jelitowym (5,07 log jtk/ml). Dla porównania w soku żołądkowym o pH 2 liczba bakterii szczepu H32 kształtowała się na poziomie 3,35 log jtk/ml.

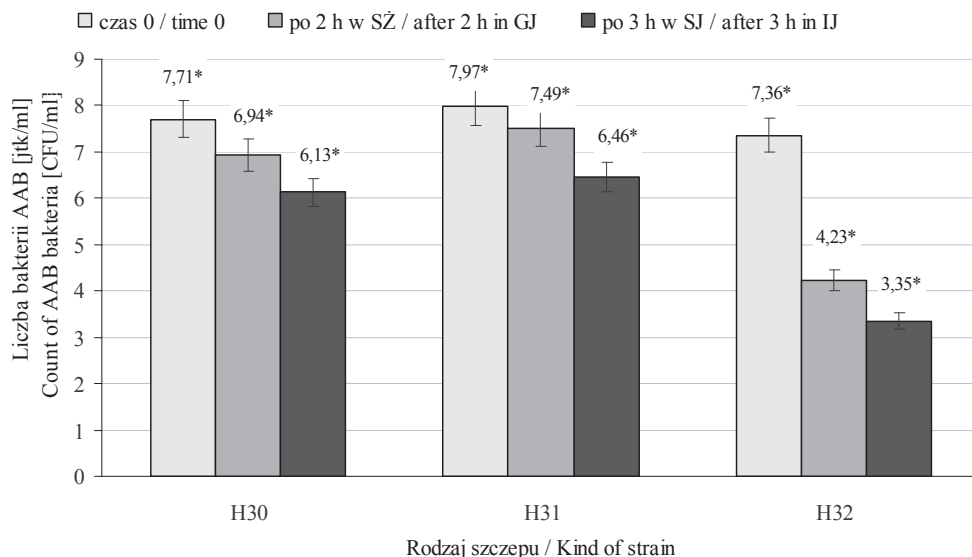
Tabela 2. Klasyfikacja taksonomiczna izolatów na podstawie sekwencji genu 16S rRNA

Table 2. Taxonomic classification of isolates based on the 16S rRNA gene sequence

Symbol szczepu Symbol of strain	Źródło izolacji Source of isolation	Klasyfikacja wstępna (cechy fenotypowe) Preliminary classification (phenotypic features)	Klasyfikacja na podstawie sekwencjonowania Classification based on sequencing	Wybór do dalszych badań Selection for further testing
H19	Malina Raspberry	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Asaia</i> sp.	nie / no
H21	Mirabelka Mirabelle	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.	
H23	Malina Raspberry	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Gluconobacter cerinus</i>	
H24	Czerwona porzeczka Red currant	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Gluconobacter cerinus</i>	
H28	Czarna porzeczka Black currant	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Gluconobacter cerinus</i>	
H29	Malina Raspberry	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Gluconobacter cerinus</i>	
H30	Kombucha	<i>Komagataeibacter</i> sp.	<i>Gluconobacter oxydans</i>	tak / yes
H31	Czarna porzeczka Black currant	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Gluconobacter oxydans</i>	
H32	Kombucha	<i>Komagataeibacter</i> sp.	<i>Gluconobacter oxydans</i>	

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że szczep *G. oxydans* H30 wyizolowany z Kombuchy i szczep *G. oxydans* H31 pochodzący z czarnej porzeczki wykazały stosunkowo małą wrażliwość na warunki modelowego układu pokarmowego człowieka i osiągnęły ostatecznie wartość 6 log jtk/ml. Bhardwaj i wsp. [3] oraz Haghshenas i wsp. [10] podkreślają, że bakterie probiotyczne są dostarczane do organizmu głównie za pośrednictwem żywności. Pomijając jamę ustną, pierwszą i jednocześnie największą barierą dla ich przeżywalności są warunki panujące w żołądku, które probiotyki powinny tolerować minimum przez 90 min, zanim będą mogły skolonizować dalsze części układu pokarmowego i wywołać efekt prozdrowotny. W jamie ustnej czynnikiem niekorzystnym jest obecność lizozymu. W żołądku, obok niskiego pH, czynnikiem niszczącym komórki bakteryjne jest pepsyna. Zaprojektowany w niniejszych badaniach sok żołądkowy zawierał w swoim składzie obydwie substancje. Kolejną barierą dla probiotyków są sole żółci, których fizjologiczne stężenie w organizmie człowieka wynosi $0,15 \div 0,5$ % (średnio 0,3 %). Do zaprojektowanego soku jelitowego dodano też pankreatynę, która fizjologicznie jest wydzielana przez zewnątrzwydzielnicze komórki trzustki jako mieszanina enzymów: proteazy, amylazy, lipazy [13]. Wymienione składniki soku jelitowego charakteryzują się negatywnym działaniem w stosunku do

komórek bakteryjnych, m.in. przez zwiększanie przepuszczalności błon komórkowych [12, 18].



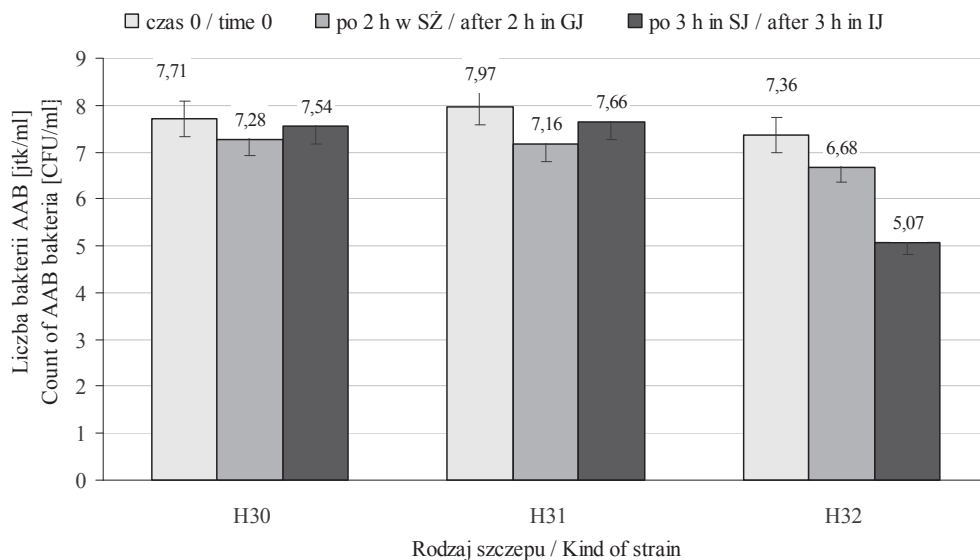
Objaśnienia / Explanatory notes:

SŻ – sok żołądkowy / GJ – gastric juice; SJ – sok jelitowy / IJ – intestinal juice. Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments); * – wartości statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) / statistically significant values ($p \leq 0.05$).

Rys. 1. Przeżywalność szczepów AAB w modelowych warunkach przewodu pokarmowego człowieka po trawieniu w soku żołądkowym o pH 2,0 i soku jelitowym o pH 7,8.

Fig. 1. Survival of AAB strains under model conditions of human gastrointestinal tract after digestion in gastric juice of pH 2.0 and in intestinal juice of pH 7.8.

Wynik oznaczania lekowrażliwości jest interpretowany z zastosowaniem odpowiednich wartości granicznych, tzw. rekomendacji amerykańskich CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) lub europejskich EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Na podstawie tych wytycznych kwalifikuje się dany mikroorganizm do kategorii „wrażliwy” (S), „średniowrażliwy” (I) lub „oporny” (R) na dany antybiotyk [7]. Specyficzne wartości graniczne są opracowane w szczególności dla mikroorganizmów patogennych. Brakuje szczegółowych wytycznych dla bakterii niechorobotwórczych, w tym dla bakterii kwasu octowego. W tab. 3. przedstawiono wyniki oznaczania minimalnych stężeń hamujących (MIC) wybranych antybiotyków przeciwko trzem wyselekcjonowanym szczepom *G. oxydans* (H30, H31 i H32). Na 12 badanych antybiotyków szczepy wykazały całkowitą oporność



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 2. Przeżywalność badanych szczepów AAB w modelowych warunkach przewodu pokarmowego po trawieniu w soku żołądkowym o pH 2,5 i soku jelitowym o pH 7,8.

Fig. 2. Survival of AAB strains under model conditions of human gastrointestinal tract after digestion in gastric juice of pH 2.5 and in intestinal juice of pH 7.8.

Tabela 3. Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost szczepów AAB na wybrane antybiotyki

Table 3. Minimum concentration values inhibiting the growth of AAB strains on selected antibiotics

Szczep Strain	Antybiotyk / Antibiotic											
	AMP	C	CD	CN	E	K	P	S	TE	VA	SMX	CIP
	Stężenie / Concentration [$\mu\text{g/ml}$]											
	MIC 0 ÷ 256										MIC 0 ÷ 1024	MIC 0 ÷ 32
H30	32	24	R	0,75	96	1	R	1,5	4	96	R	0,12
H31	64	48	R	0,75	96	1	R	0,5	1	64	96	0,19
H32	32	24	R	0,75	96	1	R	1,5	4	96	R	0,12

Objaśnienia / Explanatory notes:

AMP – ampicylina / ampicillin, C – chloramfenikol / chloramphenicol, CD – klindamycyna / clindamycin, CN – gentamycyna / gentamicin, E – erytromycyna / erythromycin, K – kanamycyna / kanamycin, P – penicylina / penicillin, S – streptomycyna / streptomycin, SMX – sulfametoksazol / sulfamethoxazole, TE – tetracyklina / tetracycline, VA – wankomycyna / vancomycin, CIP – cyprofloksacyna / ciprofloxacin; MIC – minimalne stężenie hamujące / minimum inhibitory concentration; R – całkowita oporność szczepu na dany antybiotyk / total resistance of strain to given antibiotic.

w stosunku do klindamycyny (CD) i penicyliny (P). Szczep *G. oxydans* H31 wyizolowany z czarnej porzeczeki jako jedyny wykazał wrażliwość na działanie sulfametoksazolu (SMX). W tym przypadku minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii wynosiło 96 µg/ml. Szczepy wyizolowane z Kombuchy *G. oxydans* H30 i H32 wykazywały natomiast brak wrażliwości w stosunku do SMX. Dodatkowo w przeprowadzonym doświadczeniu wykazano, że wszystkie badane szczepy AAB wykazywały bardzo zbliżoną wrażliwość na większość spośród 12 zastosowanych antybiotyków, w tym na wankomycynę, która jest jednym z tzw. antybiotyków o wysokiej efektywności hamowania rozwoju infekcji bakteryjnych [5, 7]. Oporność mikroorganizmów probiotycznych, bądź potencjalnie probiotycznych, na ten lek jest dlatego jednym z ważniejszych kryteriów podczas selekcji i wyboru szczepów [10]. Na uwagę zasługuje też to, że spośród trzech badanych szczepów tylko bakterie wyizolowane z czarnej porzeczeki (H31) były wrażliwe na sulfametoksazol, czyli lek należący do sulfonamidów o działaniu bakteriostatycznym. Całkowitą oporność wszystkich badanych szczepów odnotowano natomiast tylko w przypadku klindamycyny i penicyliny. W chwili obecnej EUCAST [7] definiuje jedynie wartości graniczne dotyczące trzech antybiotyków, ale bez wskazania konkretnych gatunków drobnoustrojów (penicylina: $S \leq 250$ i $R > 2000$, ampicylina: $S \leq 200$ i $R > 8000$, ciprofloksacyna: $S \leq 250$ i $R > 500$ µg/l), stąd brakuje odniesienia do uzyskanych wyników. Przeprowadzone badania szczepów *G. oxydans* H30, H31 i H32 mogą stanowić istotną podstawę do diagnozowania antybiotykooporności nowych potencjalnie probiotycznych szczepów bakterii kwasu octowego.

Aktualna definicja drobnoustrojów o właściwościach prozdrowotnych, probiotycznych została opublikowana w 2002 roku przez zespół ekspertów FAO/WHO. Zgodnie z nią drobnoustroje probiotyczne są to żywe mikroorganizmy, które, podawane w odpowiedniej liczbie, wywierają korzystny wpływ na zdrowie człowieka lub zwierząt, w tym głównie na mikroflorę jelitową. Dodatkowo tylko te drobnoustroje mogą być uznane za probiotyczne, którym podczas badań *in vitro* oraz *in vivo* nadano status GRAS oraz udowodniono korzystne efekty dla zdrowia. Określenie „drobnoustroje” w wyżej wymienionej definicji dotyczy zarówno wyselekcjonowanych szczepów bakterii, jak i drożdży. Najczęściej jednak, zarówno w sferze nauki, jak i przemysłu, określenie to zawężane jest do grupy bakterii kwasu mlekowego (ang. *Lactic Acid Bacteria*, LAB). Większość badań *in vitro* czy *in vivo* dotyczy szczepów bakterii LAB pochodzących z przewodu pokarmowego człowieka. W najnowszych doniesieniach naukowych znajdują się jednak informacje na temat pozyskiwania nowych szczepów o właściwościach prozdrowotnych, probiotycznych z żywności fermentowanej spontanicznie [13]. Drugą nową koncepcją jest zwrócenie uwagi na inne rodzaje drobnoustrojów niż bakterie LAB, m.in. na drożdże czy bakterie kwasu octowego. AAB wykazują dużą zdolność adaptacji do panujących warunków środowiskowych, w przeciwień-

stwie do większości znanych szczepów probiotycznych należących do bakterii fermentacji mlekowej, co jest ważną cechą technologiczną w produkcji żywności.

Kolejnym ważnym problemem jest nadużywanie antybiotyków, co skutkuje rozprzestrzenianiem się genów oporności na antybiotyki pomiędzy innymi populacjami mikroorganizmów, dlatego wrażliwość probiotyków na konwencjonalne antybiotyki zaczyna stanowić jedną z podstawowych cech prozdrowotnych takiego szczepu. Najbardziej popularne szczepy probiotyczne należące głównie do grupy LAB mogą nabywać bądź przekazywać geny oporności na antybiotyki innym szczepom probiotycznym lub bakteriom patogennym [4, 10, 15].

Przedstawione wyniki badań mają charakter nowatorski i są pierwszą próbą charakterystyki wybranych szczepów bakterii kwasu octowego jako mikroorganizmów probiotycznych. Na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych stwierdzono, że wykazują one pożądane cechy bakterii probiotycznych. Udowodniono, że wyselekcjonowane szczepy AAB mają zdolność przeżywania w modelowym przewodzie pokarmowym człowieka. Aktualnie za wywołującą efekt probiotyczny uznaje się liczbę mikroorganizmów na poziomie minimum 10^6 jtk znajdujących się w gramie/mililitrze produktu żywnościowego lub preparatu farmaceutycznego. W przedstawionych badaniach taki wynik uzyskano po 2 h trawienia hodowli monokultur AAB w soku żołądkowym, co jest dodatkowym potwierdzeniem słuszności wybrania tej grupy bakterii do badań w kierunku ich potencjalnych właściwości probiotycznych. Podsumowując, można stwierdzić, że odpowiednio opracowana i prowadzona diagnostyka w grupie bakterii kwasu octowego może być istotnym wkładem naukowym w rozszerzanie wiedzy na temat potencjalnie prozdrowotnych właściwości tych drobnoustrojów.

Wnioski

1. Na podstawie analizy fenotypu i sekwencjonowania genu 16S rRNA spośród dziewięciu izolatów bakterii kwasu octowego, do badań w kierunku określenia potencjalnych cech probiotycznych wybrano trzy szczepy należące do gatunku *G. oxydans*: H31 wyizolowany z czarnej porzeczki oraz H30 i H32 – z kultury startowej do produkcji herbaty Kombucha.
2. Stwierdzono, że dwa szczepy *G. oxydans*: H30 wyizolowany z Kombuchy i *G. oxydans* H31 pochodzący z czarnej porzeczki charakteryzują się dobrą przeżywalnością, średnio na poziomie 6 log jtk/ml, podczas pasażu przez modelowy układ pokarmowy człowieka i tym samym spełniają jedno z podstawowych kryteriów bakterii potencjalnie probiotycznych.
3. Wszystkie badane szczepy wykazywały zbliżoną antybiotykooporność. Stwierdzono, że otrzymane wyniki mogą stanowić istotną podstawę do diagnozowania antybiotykooporności nowych szczepów potencjalnie probiotycznych, dotyczących bakterii kwasu octowego.

4. Przeprowadzona diagnostyka wyselekcjonowanych szczepów bakterii kwasu octowego stanowi podstawę do dalszych badań tych mikroorganizmów w kierunku innych cech potencjalnie probiotycznych.

Badania wykonano w ramach wewnętrznego trybu konkursowego dla młodego pracownika nauki SGGW w Warszawie.

Literatura

- [1] Antolak H., Kręgiel D.: Bakterie kwasu octowego – taksonomia, ekologia oraz wykorzystanie przemysłowe. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, 4 (101), 21-35.
- [2] Antolak H., Kręgiel D.: Bakterie kwasu octowego – istotne zagrożenie w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.*, 2014, 68, 12-16.
- [3] Bhardwaj A., Gupta H., Kapila S., Kaur G., Vij S., Malik R.K.: Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, 141, 156-164.
- [4] Biradar S.S., Bahagvati S.T., Shegunshi B.: Probiotics and antibiotics: A brief overview. *The Internet J. Nutr. Welln.*, 2004, 2 (1), 1-6.
- [5] Blaskovich M.A.T., Hansford K.A., Butler M.S., Jia Z., Mark A.E., Cooper M.: Developments in glycopeptide antibiotics. *ACS Infect. Dis.*, 2018, 4, 715-735.
- [6] Crotti E., Rizzi A., Chouaia B., Ricci I., Favia G., Alma A., Sacchi L., Bourtzis K., Mandrioli M., Cherif A., Bandi C., Daffonchio D.: Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *App. Envir. Microbiol.*, 2010, 6963-6970.
- [7] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zones diameters. Version 8.1, 2018. [on line]. Dostęp w Internecie [20.05.2019]: <http://www.eucast.org>
- [8] Gonzalez A., Mas A.: Differentiation of acetic acid bacteria based on sequence analysis of 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 147, 217-222.
- [9] Gupta A., Singh V.K., Qazi G.N., Kumar A.: *Gluconobacter oxydans*: It's biotechnological applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 3 (3), 445-456.
- [10] Haghshenas B., Nami Y., Abdullah N., Radiah D., Rosli R., Barzegari A., Khosroushahi A.Y.: Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2015, 50, 1056-1064.
- [11] Kręgiel D., Otlewska A., Antolak H.: Attachment of *Asaia bogorensis* originating in fruit-flavored water to packaging materials. *BioMed Res. Int.*, 2014, #514190. DOI: 10.1155/2014/514190.
- [12] Neffe-Skocińska K., Sionek B., Ścibisz I., Kołożyn-Krajewska D.: Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA – J. Food*, 2017, 15 (4), 601-607.
- [13] 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.
- [14] Sainz F., Mas A., Torija M.J.: Effect of ammonium and amino acids on the growth of selected strains of *Gluconobacter* and *Acetobacter*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2017, 242, 45-52.
- [15] Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J.: Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, 81, 1-10.

- [16] Wichienchot S., Prasertsan P., Hongpattarakere T., Gibson G.R., Rastall R.A.: *In vitro* fermentation of mixed linkage glucooligosaccharides produced by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 by the human colonic microflora. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.*, 2005, 7, 7-12.
- [17] Yamada Y., Yukphan P.: Genera and species in acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, 125, 15-24.
- [18] Zaręba D.: Przeżywalność probiotycznego szczepu *Lactobacillus acidophilus* w mleku niefermentowanym i fermentowanym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, 5 (60), 189-196.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACETIC ACID BACTERIA WITH POTENTIAL PROHEALTH PROPERTIES

S u m m a r y

The objective of the research study was to isolate and identify acetic acid strains (AAB) in the polyphasic system and to *in vitro* predefine their potential probiotic properties under the laboratory conditions.

The material for the isolation of acetic acid strains were seasonal fruits from local crops in the Mazovian and Łódź provinces and a starter culture for the production of Kombucha. The strain identification was carried out using a polyphasic system based on the morphological profile, biochemical abilities and genetic identification. Based on the results obtained, an AAB strain collection was created that were safe for the human health. Next, there was determined the antibiotic susceptibility to 12 selected bacteria killing substances and the tests were performed of *in vitro* survival of selected strains under the conditions of a model human gastrointestinal tract. Based on the phenotype analysis and the sequencing of the 16S rRNA gene from among 9 isolates of AAB, 3 strains belonging to *Gluconobacter oxydans* species were selected: H31 isolated from black currant, and H30 and H32 from the starter culture for the production of Kombucha tea. It was found that two strains, *G. oxydans* H30 isolated from Kombucha and *G. oxydans* H31 from black currant, were characterized by a good survival rate at a level of 6 log CFU/ml while passing through the model human digestive system and thus they met one of the basic criteria for potentially probiotic bacteria. All the strains analysed showed the similar antibiotic susceptibility. The conducted diagnostics of selected acetic acid bacterial strains constitutes a basis for further studies of those microorganisms for the purpose of confirming other probiotic features.

Key words: acetic acid bacteria (AAB), probiotics, *in vitro* survival, fruits, Kombucha ☒

AGNIESZKA CHLEBICZ-WÓJCIK, KATARZYNA ŚLIŻEWSKA,
ADRIANA NOWAK

PROBIOTIC PROPERTIES OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* LOCK 0119 YEAST

S u m m a r y

Probiotics including their combinations with prebiotics known as synbiotics have been extensively studied as an alternatives to antibiotic growth promoters commonly used in livestock breeding. Among many microorganisms that may be useful for their host, the *Saccharomyces cerevisiae* yeast exhibits probiotic potential.

The objective of the research study was to select a *S. cerevisiae* strain suitable for use as a probiotic in newly developed synbiotic preparations for monogastric animals (poultry, swine). The survivability of yeast strains in the presence of bile salts and under low-pH conditions varied and after 4 h of incubation it ranged from 66 to 94 % and from 68 to 97 %, respectively. The *S. cerevisiae* LOCK 0119 strain was characterised by the highest survival rate; the number of live cells of this strain was reduced not more than 9 % after 4 h of incubation under the fixed conditions. Also, this strain exhibited hydrophilic properties and a strong auto- and co-aggregation potential. The selected yeast strain aggregated with pathogenic bacteria (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*) to a varying degree ranging between 40 and 75 %. The *S. cerevisiae* LOCK 0119 strain inhibited the adhesion of pathogens to the Caco-2 cells, whereby the adhesion of moribific bacteria attachment was reduced to a varying degree (15 ÷ 37 %). Based on the results obtained, it was concluded that the selected *S. cerevisiae* yeast strain had beneficial properties since it was able to survive during gastrointestinal passage, to colonize the intestines and to reduce the growth of pathogenic microbiota.

Key words: probiotics, *S. cerevisiae* yeast, hydrophobicity, aggregation, adherence

Introduction

Probiotics are known as live microorganisms, which when administrated in the proper amount confer a health benefit on the host [10, 14]. Those beneficial microorganisms belong mostly to the bacterial species, namely *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*,

Mgr inż. A. Chlebicz-Wójcik, dr hab. inż. K. Śliżewska, prof. nadzw., dr hab. A. Nowak, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź. Kontakt: agnieszka.chlebicz-wojcik@edu.p.lodz.pl; katarzyna.slizewska@p.lodz.pl

Bacillus or *Enterococcus*; nonetheless yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae*, are also known for their probiotic properties [23]. The positive effect of probiotics can be accomplished by modulating the intestinal microbiota and maintaining its balance, inhibiting the growth of pathogenic bacteria, increasing the resistance to infections, stimulating the immune system and what is more, supporting the digestion along with enhancing the bioavailability of nutrients [15].

The usefulness of probiotics in livestock breeding has been extensively studied since they improve the performance and health of animals; also because they are an alternative to antibiotic growth promoters (AGPs) [4, 16]. Since the 1940s AGPs have been extensively administered to animals in order to reduce infections; in this way the growth of animals and the production efficiency have been enhanced. Nevertheless, the overuse of chemotherapeutics caused an issue to appear – the accumulation of drugs residues in animal food products, which could be also a transmission route of resistance genes to human pathogenic microbiota [26]. The documented negative consequences of using antibiotic growth promoters (AGPs) in livestock breeding led to taking legislative steps towards reducing the use of antibiotics in the European Union Member States as per 1st of January 2006 [9]. Furthermore, prebiotics and synbiotics were proposed as the substitutes for AGPs; the first are selectively fermented food ingredients, which contribute to health benefit of the host by stimulating the activity and growth of GIT microbiota while the synbiotics constitute a combination of pro- and prebiotics [12].

The objective of the research study was to select an *S. cerevisiae* yeast strain, which would possess probiotic features and would be included in the newly designed synbiotic preparations intended for use in monogastric animals, such as poultry and swine.

Materials and methods

Microorganisms, mediums and propagation

Of a group of 20 *S. cerevisiae* strains, 6 strains with amylolytic activity were screened for their probiotic properties. Their ability to degrade starch was analysed with the use of Waksman agar (distilled water 500 ml, potassium hydrogen phosphate 1.0 g/l, sodium chloride 1.0 g/l, ammonium sulphate 2.0 g/l, calcium carbonate 5.0 g/l, agar 20 g/l, 2 % w/v aqueous solution of potato starch 500 ml), on which the strains were inoculated by a streak technique and incubated (30 °C, 24 h). A positive result was visible as a clear hydrolysis zone. The selected strains with amylolytic activity were taken from the Lodz Collection of Pure Cultures (ŁOCK 105) in the Institute of Fermentation Technology and Microbiology, the Lodz University of Technology (Tab. 1).

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains under analysisTabela 1. Analizowane szczepy *Saccharomyces cerevisiae*

Strain / Szczep	Source of isolation / Źródło izolacji
<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0068	Forage / Pasza
<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0113	Distiller's yeast / Drożdże gorzelnicze
<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0119	Distiller's yeast / Drożdże gorzelnicze
<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0137	Baker's yeast / Drożdże piekarskie
<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0140	Baker's yeast / Drożdże piekarskie
<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0142	Baker's yeast / Drożdże piekarskie

Moreover, the four pathogenic strains were used: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis PCM 2565 and *Listeria monocytogenes* ATCC 13932. Those strains were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) or from the Polish Collection of Microorganisms (PCM, Wrocław, Poland).

Prior to the conducted analyses, the strains were stored at a temperature of -22 °C with the use of Cryobanks™ (Copan Diagnostics Inc., Murrieta, USA). The microorganisms were activated before each and every analysis. Both the yeast and the pathogenic strains passed twice through a yeast-peptone-glucose broth (YPG, BTL, Łódź, Poland) at 30 °C for 24 h and through a nutrient broth (Millipore, Darmstadt, Germany) at 37 °C for 24 h, respectively, without oxygen limitation.

Resistance to bile salts and acidic conditions

The resistance to bile salts (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 1 % and 2 % w/v concentration) and acidic conditions (pH 2 and pH 3) were analysed based on a method by Zielińska et al. with modifications [27].

The *S. cerevisiae* strains were incubated at 30 °C for 24 h without oxygen limitation; then they were centrifuged at a relative centrifugal force (RCF) $3468 \times g$ for 10 min (Centrifuge MPW-251, MPW, Warsaw, Poland) and the biomass was suspended in a physiological saline solution with bile salts added or having the specified pH levels. The samples were incubated at 30 °C without oxygen limitation. The control sample, which was cultured in a 0.85 % (w/v) physiological saline solution with pH equalling 5.5, was also inoculated and incubated under the same conditions.

The serial dilutions of each bile salt solution, the physiological saline solutions with the defined pH levels, and the control sample were prepared at the beginning of incubation and then after 1, 2 and 4 h. The count of yeast cells was determined by a plate count method and using YPG agar. The plates were incubated at 30 °C for 24 h

without oxygen limitation; thereafter the colonies were counted and the results were given in colony-forming units per ml (CFU/ml).

There were conducted three repetitions of the yeast monocultures in physiological saline solutions with a certain pH level or with the bile salts added and of the control samples. The plate method was also performed in three repetitions.

Hydrophobicity

The hydrophobic properties of the selected *S. cerevisiae* strain were assessed using a microbial adhesion to hydrocarbon (MATH) assay based on the methods first described by Rosenberg et al. with modifications [22].

The activated yeast cells were washed twice in a phosphate-buffered saline (PBS, Merck, Darmstadt, Germany) by centrifuging them with a relative centrifugal force (RCF) $3468 \times g$ for 10 min and subsequently suspended in PBS to give a final optical density of 1.0 at 600 nm (A_0) as measured spectrophotometrically (Beckman DU 640, Beckman Instruments, Porterville, USA). The suspension of bacteria (5 ml) was mixed with 1 ml of hexadecane (apolar solvent; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), and vortexed for 2 min. The samples were incubated for 60 min at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and then the PBS fraction absorbance was measured (A).

The hydrophobicity (H) was analysed in three repetitions. The adhesion of yeast cells to hexadecane was calculated using a formula provided by Bellon-Fontaine et al. [1]:

$$\text{Hydrophobicity [\%]} = [(A_0 - (A/A_0)) \times 100]$$

The yeast was classified as hydrophilic ($H < 10\%$), moderately hydrophilic ($10 \div 34\%$), medium hydrophobic ($35 \div 70\%$) or highly hydrophobic ($71 \div 100\%$) according to Chae et al. [5] with a modification consistent with Ben Taheur et al. [2].

Auto-aggregation and co-aggregation assay with pathogens

The activated yeast strain, the *Salmonella* spp. strains and *L. monocytogenes* ATCC 13932 were analysed for their aggregation properties by an assay as described by Kos et al. [18] and Janković et al. [17]. The microorganisms were centrifuged ($3852 \times g$, 10 min), washed once and re-suspended in PBS with a final optical density of 1.0 at 600 nm. The cell suspensions of each strain were vortexed for 10 s and incubated at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. The upper suspension (100 μl) was transferred to another tube after 24 h and the absorbance was measured at 600 nm. The auto-aggregation percentage was determined using the equation:

$$\text{Auto-aggregation [\%]} = [1 - (A_t/A_0)] \times 100$$

where: A_t represents the absorbance after 24 h and A_0 the absorbance at the beginning of the incubation.

For the co-aggregation assay the cell suspensions were prepared similarly to the auto-aggregation test. Equal volumes of the yeast and each pathogen suspensions were mixed together by vortexing (10 s). As the reference tubes, there were used the samples from the auto-aggregation assay containing aliquots of a single bacterial suspension. The absorbance of suspensions was measured after 24 h as described above. The percentage of co-aggregation was calculated according to Handley et al. [13]:

$$\text{Co-aggregation [\%]} = [(A_x + A_y)/2 - (A_{(x+y)})]/[(A_x + A_y)/2] \times 100$$

where: x and y represent each of the two strains in the control tubes and (x + y) their mixture. Each experiment was performed in triplicate.

Adherence to Caco-2 cells in the competition assay with pathogens

The ability of selected *S. cerevisiae* strain to adhere to epithelial cells was determined using the Caco-2 cells, which at a concentration of 2.5×10^5 cells/well were cultured in 24-well tissue culture plates (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, USA) to obtain confluent monolayers.

The strains of yeast and pathogenic bacteria were grown at 30 °C in YPG broth or at 37 °C in a nutrient broth, respectively, then centrifuged ($3852 \times g$, 10 min), washed with sterile PBS and re-suspended in fresh DMEM without antibiotics and supplements. Subsequently, the suspension of single strain (control) or combinations of *S. cerevisiae* with each pathogen (1:1, v/v) were deposited on the Caco-2 cells monolayers in an amount of 10^7 CFU/ml and incubated at 37 °C in 5 % CO₂ for 2 h. Each strain or its combination was tested in triplicate. After incubation the unattached microorganisms were washed away, whereas the Caco-2 cells with bacteria adhered were detached from the bottom of the well with 1 % (w/v) trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and additionally scraped with a sterile cell scraper (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). Afterwards the Caco-2 cells were centrifuged ($3852 \times g$, 10 min) and lysed with 0.1 % (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for 5 min. The enumeration of the adhered microorganisms was performed by a plate method using YPG agar (yeast; incubation at 30 °C, 48 h) or a nutrient agar (pathogens; incubation at 37 °C, 48 h). The adherence inhibition rate [%] was expressed as a ratio of the count of adhered bacteria to the count of total bacteria added initially to each well according to the formula:

$$\text{Adherence inhibition [\%]} = \{(\log(\text{adherence of the tested sample}) \times 100) / [\log(\text{adherence of the control})]\} - 100$$

This represents a percentage reduction in the adhesion of pathogenic bacteria in the presence of the selected *S. cerevisiae* strains (as compared to the results for the pathogen alone).

The above adherence assay was also performed in a Nunc 8-well Lab-Tek™ Chamber Slides system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in order to visualise the yeast cells attached to Caco-2. After removing the non-adhered microorganisms the wells were washed with PBS and the Caco-2 cells were fixed with 80 % (v/v) methanol (15 min). After air-drying the preparations were stained with 0.1 % (w/v) crystal violet for 10 min. After staining the wells were washed with 70 % (v/v) ethanol until no colour remained and next dried overnight. The adhered *S. cerevisiae* strain was observed at 1000 × magnification under a phase-contrast microscope (Nikon, Tokyo, Japan) connected to a digital camera (Nikon Digital Sight DS-U3, Tokyo, Japan) using an imaging software (NIS-elements BR 3.0, Nikon, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

The results presented in the research study constitute an arithmetic mean of the values from three repetitions. Before performing the ANOVA analysis of variances (at a significance level of $p < 0.05$), the Shapiro-Wilk's and Bartlett's tests were accomplished in order to confirm the normal distribution and homogeneity of variances of the variables, respectively. The multi-way ANOVA was carried out to statistically analyse the resistivity to acidic environment and the bile salts concentrations data. However, the one-way ANOVA was used to describe the auto- and co-aggregation data and single strains adhesion to the Caco-2 cells and the competition assay. Moreover, the Tukey's post hoc test was used after each ANOVA. Furthermore, the Pearson's correlation test was conducted to determine the association between the hydrophobicity and the aggregation abilities of the selected *S. cerevisiae* strain. The statistical analysis was performed with the use of XLSTAT software (Addinsoft, SARL, Paris, France).

Results and discussion

Resistance to bile salts and acidic conditions

The resistivity of the *S. cerevisiae* strains analysed in the presence of bile salts varied and ranged between 66.07 % and 98.97 % depending on the bile salts concentration and duration period of incubation (Tab. 2). The survivability of the strains was strain-specific and a significantly higher resistivity was found in the case of *S. cerevisiae* LOCK 0119, the endurance of which exceeded 90 % even up to 4 h of incubation. The above results correspond to the results as reported by Diosma et al. [8], who reported no significant changes in the abundance of live *S. cerevisiae* cells in the presence of bile salts for 6 out of 15 strains, which indicated a high bile salts resistance.

Moreover, the strains were able to survive in the acidic environment (pH 2, pH 3), for which the yeast population density was reduced by up to 33 % after 4 h of incubation (Tab. 3). The *S. cerevisiae* LOCK 0119 was the only strain where no substantial decrease in the survivability was reported; the count of their live cells was reduced no

more than 7 % after 4 h of incubation and the results were in line with those obtained by Srinivas et al. [24].

Furthermore, no significant variations in the survivability of yeast were observed between pH levels or the different bile salts concentrations.

Table 2. Survivability of *S. cerevisiae* strains in the presence of bile salts

Tabela 2. Przeżywalność szczepów drożdży *S. cerevisiae* w obecności soli żółci

Survivability / Przeżywalność [%]					
<i>S. cerevisiae</i> strain Szczep <i>S. cerevisiae</i>	Bile salt concentration Stężenie soli żółci [% w/v]	Time / Czas [h]			
		0	1	2	4
ŁOCK 0068	1	100 k	88.26 ± 2.58 f, g, h, i, j, k	79.29 ± 2.48 b, c, d, e, f, g, h	71.37 ± 5.33 a, b
	2		88.19 ± 2.54 e, f, g, h, i, j, k	76.74 ± 2.14 a, b, c, d, e, f	70.76 ± 5.25 a, b
ŁOCK 0113	1		88.33 ± 2.96 f, g, h, i, j, k	78.17 ± 2.08 a, b, c, d, e, f, g	70.29 ± 3.61 a, b
	2		87.06 ± 1.88 d, e, f, g, h, i, j	75.66 ± 3.17 a, b, c, d	69.69 ± 4.90 a, b
ŁOCK 0119	1		98.97 ± 3.58 j, k	96.30 ± 3.29 i, j, k	93.89 ± 2.47 i, j, k
	2		97.00 ± 3.80 i, j, k	93.03 ± 1.11 i, j, k	91.47 ± 1.73 h, i, j, k
ŁOCK 0137	1		88.77 ± 1.25 f, g, h, i, j, k	76.00 ± 5.73 a, b, c, d, e	68.55 ± 1.16 a, b
	2		88.39 ± 3.18 f, g, h, i, j, k	73.63 ± 4.72 a, b, c	66.90 ± 2.70 a
ŁOCK 0140	1		88.96 ± 4.10 f, g, h, i, j, k	75.82 ± 4.57 a, b, c, d	67.89 ± 2.69 a, b
	2		85.75 ± 4.04 c, d, e, f, g, h, i	74.07 ± 5.37 a, b, c	66.07 ± 2.94 a
ŁOCK 0142	1		89.07 ± 5.06 g, h, i, j, k	77.11 ± 1.29 a, b, c, d, e, f, g	71.80 ± 3.43 a, b
	2		86.59 ± 6.49 d, e, f, g, h, i	75.41 ± 4.77 a, b, c, d	68.85 ± 1.70 a, b

Explanatory notes / Objasnienia:

Table shows mean values ± standard deviations / W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe; n = 3; a-k – mean values denoted by different letters differ statistically significantly at p < 0.05 / wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy p < 0,05.

Table 3. Survivability of *S. cerevisiae* strains in acidic environmentTabela 3. Przeżywalność szczepów drożdży *S. cerevisiae* w kwaśnym środowisku

Survivability / Przeżywalność [%]					
<i>S. cerevisiae</i> strain Szczep <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	pH	Time / Czas [h]			
		0	1	2	4
ŁOCK 0068	2	100 k	83.19 ± 6.99 c, d, e, f, g, h, i, j	71.64 ± 3.74 a, b, c	67.54 ± 0.89 a
	3		88.40 ± 1.31 e, f, g, h, i, j, k	75.76 ± 6.00 a, b, c, d, e, f	69.66 ± 4.93 a, b
ŁOCK 0113	2		89.05 ± 2.72 g, h, i, j, k	74.89 ± 5.47 a, b, c, d	70.15 ± 5.04 a, b, c
	3		88.95 ± 2.83 f, g, h, i, j, k	78.45 ± 1.60 a, b, c, d, e, f, g, h, i	70.52 ± 4.34 a, b, c
ŁOCK 0119	2		96.63 ± 5.00 k	94.41 ± 3.11 j, k	93.22 ± 3.21 j, k
	3		98.83 ± 5.17 k	97.79 ± 4.79 k	96.90 ± 3.98 k
ŁOCK 0137	2		82.67 ± 3.37 b, c, d, e, f, g, h, i, j	75.74 ± 5.48 a, b, c, d, e	71.62 ± 5.10 a, b, c
	3		89.44 ± 2.63 h, i, j, k	78.29 ± 2.67 a, b, c, d, e, f, g, h, i	72.77 ± 3.83 a, b, c
ŁOCK 0140	2		88.66 ± 3.01 e, f, g, h, i, j, k	76.00 ± 3.14 a, b, c, d, e, f, g	70.54 ± 2.08 a, b, c
	3		90.48 ± 3.61 i, j, k	78.46 ± 2.42 a, b, c, d, e, f, g, h, i	74.29 ± 5.06 a, b, c
ŁOCK 0142	2		87.70 ± 4.78 d, e, f, g, h, i, j, k	73.58 ± 4.22 a, b, c	69.06 ± 5.78 a
	3		89.22 ± 2.06 h, i, j, k	76.41 ± 3.07 a, b, c, d, e, f, g, h	73.45 ± 2.42 a, b, c

Explanatory notes as in Tab. 2. / Objasnienia jak pod tab. 2.

Based on the high survival rate and the detoxification properties of mycotoxins described by Chlebicz and Śliżewska [6], *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 was selected in order to further probe other probiotic features of the yeast strain.

Hydrophobicity, auto-aggregation and co-aggregation assay with pathogens

The hydrophobicity of *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 was at a level of 6.51 %, which classified this strain as hydrophilic according to Chae et al. [5] and Ben Taheur et al. [2]. The results opposite to those reported in the authors' own study were obtained by

De Lime et al. [11] and Fernandez-Pacheco et al. [7], who tested 28 and 10 *S. cerevisiae* strains, respectively, and those strains showed strong hydrophobicity.

Despite the hydrophilic characteristic of cell surface of *S. cerevisiae* ŁOCK 0119, this strain exhibited a strong ability to aggregate, which was in line with the data presented by Suvarna et al. [25]. A strong negative correlation was found between the hydrophobicity and the auto-aggregation capability of yeast (Pearson's correlation $r = -0.906$, $p < 0.05$). Moreover, a substantially higher yeast auto-aggregation (88.31 %) was observed in comparison to pathogenic bacteria (Tab. 4).

Table 4. Auto-aggregation of *S. cerevisiae* yeast and pathogenic bacteria

Tabela 4. Autoagregacja drożdży *S. cerevisiae* oraz bakterii patogennych

Strain / Szczep	Auto-aggregation / Autoagregacja [%]
<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0119	88.31 ^c ± 2.44
Pathogen / Patogen	
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932	70.02 ^b ± 1.57
<i>S. Choleraesuis</i> PCM 2565	60.63 ^a ± 0.93
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	73.68 ^b ± 2.94
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	74.82 ^b ± 1.09

Table shows mean values ± standard deviations / W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe; n = 3; a, b, c – mean values denoted by different letters differ statistically significantly at $p < 0.05$ / wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0.05$.

Table 5. Co-aggregation of *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 with pathogenic bacteria from *Salmonella* genus and *L. monocytogenes*

Tabela 5. Koagregacja szczepu drożdży *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 z patogennymi szczepami bakterii z rodzaju *Salmonella* oraz *L. monocytogenes*

Pathogen / Patogen	Co-aggregation / Koagregacja [%]
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932	70.25 ^c ± 3.84
<i>S. Choleraesuis</i> PCM 2565	74.66 ^d ± 0.88
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	46.87 ^b ± 4.64
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	40.10 ^a ± 5.32

Table shows mean values ± standard deviations / W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe; n = 3; a-d – mean values denoted by different letters differ statistically significantly at $p < 0.05$ / wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0.05$.

On the other hand, the co-aggregation of the selected yeast strain with pathogens was significantly diversified and differed from 40.10 % to 74.66 % (Tab. 5). *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 co-aggregated with *S. Choleraesuis* PCM 2565 to the greatest extent, whereas the weakest aggregation of yeast was observed with *S. Typhimurium* ATCC 13311. Pizzolitto et al. [20] observed a substantially lower co-aggregation be-

tween the 4 *S. cerevisiae* strains tested and *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, than that reported in the case of the authors' own strain. However, as for the co-aggregation of *S. cerevisiae* strains with *S. Enteritidis*, the data of the authors were in agreement with those of Binetti et al. [3]. Also, a strong co-aggregation feature of the yeast strain was also noted towards the *L. monocytogenes* ATCC 13932 (70.25 %).

Adherence to Caco-2 cells and the competition assay with pathogens

It was found that the adherence rate of *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 monoculture (Tab. 6, Photo 1) was at a level of 77.56 %, which was considerably higher than the attachment rate of the yeast strains analysed by Menezes et al. [19], although it corresponded to the outcomes by Živković et al. [28].

Table 6. Adherence of monocultures of *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 and pathogenic bacteria to human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2)

Tabela 6. Adhezja monokultur szczepu drożdży *S. cerevisiae* ŁOCK oraz bakterii patogennych do linii komórkowej ludzkiego gruczolaka (Caco-2)

Strain / Szczep	Adherence rate / Stopień adhezji [%]
<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0119	77.56 ^a ± 3.55
Pathogen / Patogen	
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932	90.79 ^b ± 4.65
<i>S. Choleraesuis</i> PCM 2565	96.31 ^b ± 1.97
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	93.28 ^b ± 3.59
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	91.68 ^b ± 2.93

Table shows mean values ± standard deviations / W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe; n = 3; a, b – mean values denoted by different letters differ statistically significantly at $p < 0.05$ / wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,05$.

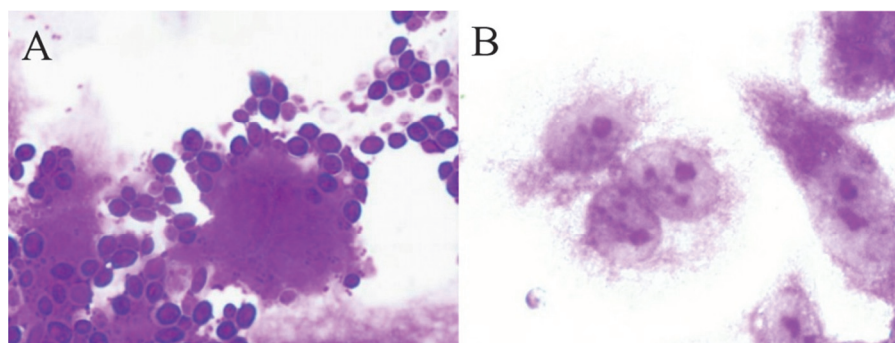


Photo 1. Adherence *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 (A.) to human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2) after 2 h incubation (1000 ×, Nikon – Eclipse, Tokyo, Japan) stained with crystal violet

Fot. 1. Adhezja komórek drożdży *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 (A.) do linii komórkowej ludzkiego gruczolaka (Caco-2) po 2 h inkubacji (powiększenie 1000 ×, Nikon – Eclipse, Tokio, Japan) barwiona fioletem krystalicznym

Table 7. *S. cerevisiae* ŁOCK 0119-caused inhibition of pathogenic bacteria adherence to cell line of human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2)Tabela 7. Hamowanie przez drożdże *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 adhezji bakterii patogennych do linii komórkowej gruczolaka ludzkiego (Caco-2)

Pathogen / Patogen	Inhibition rate / Stopień inhibicji [%]
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932	15.13 ^a ± 3.76
<i>S. Choleraesuis</i> PCM 2565	36.70 ^b ± 1.07
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	37.30 ^b ± 1.06
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	24.62 ^{a,b} ± 5.12

Table shows mean values ± standard deviations / W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe; n = 3; a, b – mean values denoted by different letters differ statistically significantly at $p < 0.05$ / wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,05$.

S. cerevisiae ŁOCK 0119 was able to inhibit the attachment of those strains to the Caco-2 cells (Tab. 7) despite the weaker attachment capability of the analysed yeast strain in contrast to the one exhibited by each of the pathogenic bacteria, which varied between 90.85 ÷ 96.31 % (mean 92.81). The adhesion of *S. Choleraesuis* PCM 2565 and *S. Enteritidis* ATCC 13076 was reduced 36.70 % and 37.30 %, respectively, which was a significantly stronger effect than that as reported in the case of *L. monocytogenes* ATCC 13932 (15.13 %). The attachment of *S. Typhimurium* ATCC 13311 was also inhibited by *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 at a level of 24.62 %.

Conclusions

1. The analysed yeast strain, i.e. *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 can exert a beneficial impact on the health of monogastric animals since it has the potential to survive gastrointestinal passage as well as to colonize the intestines.
2. *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 can decrease the number of pathogenic bacteria, through the co-aggregation and competition for adhesion site.

The research was partially funded by the National Centre for Research and Development within the framework of the Program of Applied Studies (PBS3/A8/32/2015).

References

- [1] Bellon-Fontaine M.N., Rault J., Van Oss C.J.: Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 1996, 7 (1-2), 47-53.

- [2] Ben Taheur F., Kouidhi B., Fdhila K., Elabed H., Ben Slama R., Mahdouani K., Bakhrouf A., Chaieb K.: Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microb. Pathog.*, 2016, 97, 213-220.
- [3] Binetti A., Carrasco M., Reinheimer J., Suárez V.: Yeasts from autochthonal cheese starters: Technological and functional properties. *J. App. Microbiol.*, 2013, 115, 434-444.
- [4] Brown K., Uwiera R.R.E., Kalmokoff M.L., Brooks S.P.J., Inglis G.D.: Antimicrobial growth promoter use in livestock: A requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2017, 49, 12-24.
- [5] Chae M.S., Schraft H., Hansen L.T., Mackereth R.: Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiol.*, 2006, 23 (3), 250-259.
- [6] Chlebicz A., Śliżewska K.: *In vitro* detoxification of aflatoxin B1, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2019. DOI: 10.1007/s12602-018-9512-x.
- [7] De Lima M. dos S.F., de Souza K.M.S., Albuquerque W.W.C., Teixeira J.A.C., Cavalcanti M.T.H., Porto A.L.F.: *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An *in vitro* evaluation of probiotic properties. *Microb. Pathog.*, 2017, 110, 670-677.
- [8] Diosma G., Romanin D.E., Rey-Burusco M.F., Londero A., Garrote G.L.: Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic characterization. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 30, 43-53.
- [9] Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. O. J. L 268, pp. 29-43, of 18.10.2003.
- [10] FAO/WHO: Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. FAO/WHO, London, Canada, 2002.
- [11] Fernandez-Pacheco P., Arévalo-Villena M., Bevilacqua A., Corbo M.R., Briones Pérez A.: Probiotic characteristics in *Saccharomyces cerevisiae* strains: Properties for application in food industries. *LWT Food Sci. Technol.*, 2018, 97, 332-334.
- [12] Guevarra R.B., Lee J.H., Lee S.H., Seok M.J., Kim D.W., Kang B.N., Johnson T.J., Isaacson R.E., Kim H.B.: Piglet gut microbial shifts early in life: Causes and effects. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 2019, 10, #1.
- [13] Handley P.S., Harty D.W.S., Wyatt J.E., Brown C.R., Doran J.P., Gibbs A.C.C.: A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *Microbiology*, 1987, 133 (11), 3207-3217.
- [14] Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C., Sanders M.E.: Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11 (8), 506-514.
- [15] Hossain M.I., Sadekuzzaman M., Ha S.-H.: Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Res. Int.*, 2017, 100 (1), 63-71.
- [16] Hussein E., Selim S.: Efficacy of yeast and multi-strain probiotic alone or in combination on growth performance, carcass traits, blood biochemical constituents, and meat quality of broiler chickens. *Livest. Sci.*, 2018, 216, 153-159.
- [17] Janković T., Frece J., Abram M., Gobin I.: Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Int. J. Sanit. Eng. Res.*, 2012, 6, 19-24.
- [18] Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S.: Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, 94(6), 981-987.

- [19] Menezes A.G.T., Ramos C.L., Cenzi G., Melo D.S., Dias D.R., Schwan R.F.: Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2019. DOI: 10.1007/s12602-019-9518-z.
- [20] Pizzolitto R.P., Armando M.R., Combina M., Cavaglieri L.R., Dalcero A.M., Salvano M.A.: Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B₁ adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *J. Environ. Sci. Health, Part B*, 2012, 47 (10), 933-941.
- [21] Romero-Luna H.E., Hernández-Sánchez H., Ribas-Aparicio R.M., Cauch-Sánchez P.I.: Evaluation of the probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* strain (C41) isolated from tibicos by *in vitro* studies. *Probiotics Antimicro. Prot.*, 2019, 11(3), 794-800.
- [22] Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E.: Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1980, 9, 29-33.
- [23] Siwek M., Sławińska A., Stadnicka K., Bogucka J., Dunisławska A., Bednarczyk M.: Prebiotics and synbiotics – *in ovo* delivery for improved lifespan condition in chicken. *BMC Vet. Res.*, 2018, 14(1), #402.
- [24] Srinivas B., Rani G.S., Kumar B.K., Chandrasekhar B., Krishna K.V., Devi T.A., Bhima B.: Evaluating the probiotic and therapeutic potentials of *Saccharomyces cerevisiae* strain (OBS2) isolated from fermented nectar of toddy palm. *AMB Express.*, 2017, 7 (1), #2.
- [25] Suvarna S., Dsouza J., Ragavan M.L., Das N.: Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Food Sci. Biotechnol.*, 2018, 27 (3), 745-753.
- [26] Vohra A., Syal P., Madan A.: Probiotic yeasts in livestock sector. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2016, 219, 31-47.
- [27] Zielińska D., Rzepkowska A., Radawska A., Zieliński K.: *In vitro* screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. *Curr. Microbiol.*, 2015, 70, 183-194.
- [28] Živković M., Čadež N., Uroić K., Miljković M., Tolinački M., Doušova P., Kos B., Šušković J., Raspor P., Topisirović L., Golić N.: Evaluation of probiotic potential of yeasts isolated from traditional cheeses manufactured in Serbia and Croatia. *J. Intercult. Ethnopharmacol.*, 2015, 4 (1), 12-18.

WŁAŚCIWOŚCI PROBIOTYCZNE DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* LOCK 0119

Streszczenie

Probiotyki, jak również ich połączenia z prebiotykami określane mianem synbiotyków, są szeroko badane jako alternatywa antybiotykowych stymulatorów wzrostu, które powszechnie stosowano w hodowli zwierząt. Spośród wielu mikroorganizmów, które mogą być pożyteczne dla gospodarza, drożdże *Saccharomyces cerevisiae* wykazują potencjał probiotyczny.

Celem pracy było wyselekcjonowanie szczepu *S. cerevisiae* odpowiedniego do stosowania jako probiotyk w nowo opracowywanych preparatach synbiotycznych dla zwierząt monogastrycznych (dla drobiu, trzody chlewnej). Przeżywalność szczepów drożdży w obecności soli żółciowych i niskiego pH była zróżnicowana, przy czym wahała się w zakresie odpowiednio: 66 ÷ 94 % i 68 ÷ 97 % po 4 h inkubacji. Najwyższą przeżywalnością charakteryzował się szczep *S. cerevisiae* LOCK 0119, którego liczba żywych komórek została obniżona o nie więcej niż o 9 % po 4 h inkubacji w ustalonych warunkach. Szczep ten wykazywał również właściwości hydrofilowe oraz silny potencjał auto- i koagregacji. Wyselekcjonowany szczep drożdży koagregował z bakteriami chorobotwórczymi (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*) w zróżnicowanym stopniu w zakresie 40 ÷ 75 %. *S. cerevisiae* LOCK 0119 hamował adhezję patogenów do komórek Caco-2, przy czym przyleganie komórek bakterii chorobotwórczych było ograniczane

w zróżnicowanym stopniu ($15 \div 37\%$). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wyselekcjonowany szczep *S. cerevisiae* LOCK 0119 wykazuje korzystne właściwości, takie jak możliwość przetrwania pasażu jelitowego i kolonizacji danego środowiska oraz ograniczanie wzrostu patogennej flory bakteryjnej.

Słowa kluczowe: probiotyki, drożdże *S. cerevisiae*, hydrofobowość, agregacja, adherencja ☒



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU



Polskie Towarzystwo Technologów Żywności
Oddział Wrocławski

zaprasza na

**XXV Jubileuszową
Sesję Naukową Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ
„Przeszłość w żywności – żywność w przyszłości”**

oraz

**VIII International Session of Young Scientific Staff
„The future in food - food in the future”**

Wrocław, 21-22 maja 2020 r.

Informacje: <https://smkn2020.wordpress.com>

Kontakt: dr inż. Anna Kancelista

tel. (71) 320-77-73 / (71) 320-51-83

e-mail: xxvsmknwroclaw@gmail.com

GRAŻYNA MORKIS

PROBLEMATYKA ŻYWNOŚCIOWA W USTAWODAWSTWIE POLSKIM I UNIJNYM

Publikujemy kolejny przegląd aktów prawnych, które ukazały się w Dzienniku Ustaw RP oraz Dzienniku Urzędowym UE. Poniższe zestawienie zawiera akty prawne dotyczące szeroko omawianej problematyki żywnościowej wg stanu na dzień 31 sierpnia 2019 r.

Polskie akty prawne

1. Ustawa z dn. 12 kwietnia 2019 r. o zmianie ustawy o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych (Dz. U. 2019 r., poz. 1038).
W ustawie z dn. 21 grudnia 2018 r. o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych (Dz. U. 2018 r., poz. 2164 i 2354) wprowadzono zmiany dotyczące klasyfikacji tusz wołowych i wieprzowych.
2. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 30 maja 2019 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie laboratoriów urzędowych i referencyjnych oraz zakresu analiz wykonywanych przez te laboratoria (Dz. U. 2019 r., poz. 1067).
Wprowadzone zmiany dotyczą dwóch jednostek, tj. Hamilton UO-Technologia oraz Głównego Inspektoratu Roślin i Nasiennictwa Centralnego Laboratorium Pracowni Wykrywania i Identyfikacji GMO.
3. Obwieszczenie Marszałka Sejmu z dn. 6 czerwca 2019 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz. U. 2019 r., poz. 1252).
Ogłoszono jednolity tekst ustawy z dn. 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia.
Ustawa niniejsza określa:
 - wymagania zdrowotne dotyczące żywności,
 - zasady higieny żywności i materiałów przeznaczonych do kontaktu z żywnością,

- przeprowadzanie urzędowych kontroli żywności.
4. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 30 maja 2019 r. w sprawie wykazu artykułów rolno-spożywczych przywożonych z zagranicy oraz minimalnych ilości podlegających kontroli jakości (Dz. U. 2019 r., poz. 1330).
Wprowadzono nowy wykaz artykułów rolno-spożywczych przywożonych z zagranicy oraz minimalnych ilości podlegających kontroli jakości.
 5. Ustawa z dn. 29 lipca 2019 r. o oznakowaniu produktów wytworzonych bez wykorzystania organizmów genetycznie zmodyfikowanych jako wolnych od tych organizmów (Dz. U. 2019 r., poz. 1401).
Ustawa określa:
 - zasady oznakowania żywności i pasz,
 - obowiązki podmiotów wprowadzających je na rynek,
 - zasady przeprowadzania kontroli przestrzegania przepisów ustawy,
 - zasady odpowiedzialności za naruszenia przepisów prawa.
 6. Obwieszczenie Marszałka Sejmu z dn. 28 czerwca 2019 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o wyrobie i rozlewie wyrobów winiarskich, obrocie tymi wyrobami i organizacji rynku wina (Dz. U. 2019 r., poz. 1534).
Ustawa z dnia 12 maja 2011 r. o wyrobie i rozlewie wyrobów winiarskich, obrocie tymi wyrobami i organizacji rynku wina reguluje:
 - zasady wyrobu fermentowanych napojów winiarskich oraz obrotu tymi wyrobami,
 - zasady wykonywania działalności gospodarczej w zakresie wyrobu i rozlewu wyrobów winiarskich,
 - organizację rynku wina,
 - zasady i tryb rejestracji nazw pochodzenia i oznaczeń wyrobów winiarskich pozyskiwanych z winogron pochodzących z upraw położonych na terytorium RP.

Unijne akty prawne

1. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2019/849 z dn. 24 maja 2019 r. zmieniające rozporządzenie wykonawcze (UE) 2017/1492 w odniesieniu do maksymalnej zawartości cholekalcyferolu (witaminy D₃) w paszy dla łososiowatych (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. U. UE L 2019 r., 139, s. 4).
W załączniku do rozporządzenia zostały ustalone maksymalne zawartości cholekalcyferolu (witaminy D₃) w paszach dla łososiowatych.
2. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2019/935 z dn. 16 kwietnia 2019 r. ustanawiające zasady stosowania rozporządzenia (UE) nr 1308/2013 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do metod analizy w celu określenia cech fizycznych, chemicznych i organoleptycznych produktów sektora wina oraz do po-

wiadomości o decyzjach państw członkowskich zezwalających na zwiększenie naturalnej zawartości alkoholu (Dz. U. UE L 2019 r., 149, s. 53).

Niniejsze rozporządzenie ustanawia zasady stosowania tytułu II rozdział I rozporządzenia (UE) nr 1308/2013 dotyczącego metod analizy w celu określenia właściwości fizycznych, chemicznych i organoleptycznych produktów winiarskich oraz powiadomień o decyzjach państw członkowskich zezwalających na zwiększenie naturalnej mocy alkoholu.

Metody analizy, o których mowa w art. 75 ust. 5 lit. d) rozporządzenia (UE) nr 1308/2013, które mają być stosowane do weryfikacji limitów ustanowionych w przepisach Unii dotyczących stosowania izotiocyanianu allilu do produkcji niektórych winorośli są określone w załączniku do niniejszego rozporządzenia.

Państwa członkowskie, które zezwalają na zwiększenie naturalnej objętościowej mocy alkoholu zgodnie z załącznikiem VIII część I sekcja A pkt 3 do rozporządzenia (UE) nr 1308/2013, powiadamiają o tym Komisję w terminie jednego miesiąca od przyznania odstępstwa. W powiadomieniu państwa członkowskie określają regiony i odmiany, których dotyczy decyzja oraz przekazują dane i dowody wskazujące, że warunki klimatyczne były wyjątkowo niekorzystne w danych regionach.

3. Rozporządzenie Komisji (UE) 2019/977 z dn. 13 czerwca 2019 r. zmieniające załączniki II i IV do rozporządzenia (WE) nr 396/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości aklonifenu, *Beauveria bassiana* szczep PPRI 5339, *Clonostachys rosea* szczep J1446, fenpyrazaminy, mefentriflukonazolu i penkonazolu w określonych produktach lub na ich powierzchni (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. U. UE L 2019 r., 159, s. 1).

Uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 396/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 lutego 2005 r. w sprawie maksymalnych poziomów pozostałości pestycydów w żywności lub paszy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, ustalono maksymalny poziom pozostałości pestycydów i najwyższe dopuszczalne poziomy pozostałości (mg/kg) (dotyczące acelonifenu, fenpyrazaminy i penkonazolu) w wybranych produktach spożywczych.

4. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2019/1139 z dn. 3 lipca 2019 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2074/2005 w odniesieniu do urzędowych kontroli żywności pochodzenia zwierzęcego, jeżeli chodzi o wymogi w zakresie informacji dotyczących łańcucha żywnościowego i produktów rybołówstwa, a także o uznane metody badania na obecność morskich biotoksyn oraz metody badania surowego mleka i mleka krowiego poddanego obróbce termicznej (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz.U. UE L 2019 r., 180, s. 12).

Zmiany dotyczą m.in. wymagań odnoszących się do informacji o łańcuchu pokarmowym przy prowadzeniu urzędowych kontroli żywności pochodzenia zwierzęcego, o których mowa w sekcji III załącznika II do rozporządzenia (WE) nr 853/2004. Wymagania te szczegółowo określono w załączniku I do niniejszego rozporządzenia. Natomiast wymagania dotyczące produktów rybołówstwa, o których mowa w art. 11 ust. 9 rozporządzenia (WE) nr 853/2004, określono w załączniku II do niniejszego rozporządzenia. Metody testowania wykrywania morskich biotoksyn, o których mowa w art. 11 ust. 4 rozporządzenia (WE) nr 853/2004, zostały określone w załączniku V do rozporządzenia wykonawczego (UE) 2019/627. Wprowadzone zmiany dotyczą również metod badań mleka surowego i mleka krowiego poddanego obróbce cieplnej, które powinny być stosowane w przedsiębiorstwach sektora spożywczego.

5. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2019/1272 z dn. 29 lipca 2019 r. w sprawie sprostowania rozporządzenia wykonawczego (UE) 2017/2470 ustanawiającego unijny wykaz nowej żywności oraz decyzji wykonawczej (UE) 2017/2078 zezwalającej na rozszerzenie zastosowania beta-glukanów z drożdży jako nowego składnika żywności zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. U. UE L 2019 r., 201, s. 3).

W załączniku do niniejszego rozporządzenia zostały zamieszczone następujące sprostowania dotyczące:

- ekstraktu z kultur komórkowych *Echinacea purpurea*,
 - beta-glukanów z drożdży,
 - ołowiu, arsenu, rtęci i kadmu.
6. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2019/1294 z dn. 1 sierpnia 2019 r. zezwalające na wprowadzenie na rynek betainy jako nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470 (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. U. UE L 2019 r., 201, s. 3).

Betaina została włączona do unijnego wykazu nowej żywności, ustanowionego rozporządzeniem wykonawczym (UE) 2017/2470.

Przez okres pięciu lat od dnia wejścia w życie niniejszego rozporządzenia wyłącznie pierwotny wnioskodawca to przedsiębiorstwo DuPont Nutrition Biosciences ApS, które otrzymuje zezwolenie na wprowadzanie na rynek w Unii nowej żywności, o której mowa w ust. 1, chyba że kolejny wnioskodawca otrzyma zezwolenie na przedmiotową nową żywność bez odwoływania się do danych chronionych na podstawie art. 2 niniejszego rozporządzenia lub za zgodą przedsiębiorstwa DuPont Nutrition Biosciences ApS.

7. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2019/1314 z dn. 2 sierpnia 2019 r. zezwalające na zmianę specyfikacji nowej żywności „lakto-*N*-neotetraoza” wytwarzanej z wykorzystaniem *Escherichia coli* K-12 zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470 (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. U. UE L 2019 r., 205, s. 4).

Zostały wprowadzone zmiany we wpisie w unijnym wykazie dozwolonej nowej żywności, określonym w art. 6 rozporządzenia (UE) 2015/2283, dotyczącym substancji lakto-*N*-neotetraoza wytwarzanej z wykorzystaniem *Escherichia coli* szczep K-12. Zakres wprowadzonych zmian zawiera załącznik do niniejszego rozporządzenia. ☒

XLIV SESJA NAUKOWA KOMITETU NAUK O ŻYWNOSCI I ŻYWIENIU PAN

„Nauka, technologia i innowacje w żywności i żywieniu”

Łódź, 3 - 4 lipca 2019 roku

W dniach 3 - 4 lipca 2019 roku w Łodzi odbyła się XLIV Sesja Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu Polskiej Akademii Nauk, która została zorganizowana przy współudziale Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności i Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Sesje Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN są organizowane przez krajowe ośrodki akademickie związane z naukami o żywności i żywieniu w dwuletnich cyklach w wytypowanych krajowych ośrodkach naukowych. Stanowią one największe w skali kraju forum prezentacji najnowszych osiągnięć naukowych i technologicznych w zakresie technologii żywności i żywienia człowieka, wymiany poglądów oraz doświadczeń pracowników jednostek naukowych i przedstawicieli przemysłu spożywczego, dające możliwość nawiązania współpracy. Tematyka XLIV Sesji dotyczyła szeroko pojętej problematyki związanej z oddziaływaniem żywności i odżywiania na zdrowie. W skład Komitetu Organizacyjnego wchodził: dr hab. inż., prof. nadzw. Dorota Żyżelewicz – przewodnicząca, dr inż. Joanna Oracz – sekretarz, mgr Renata Kulińska – skarbnik oraz członkowie: dr hab. inż., prof. nadzw. Joanna Leszczyńska, dr hab. inż. Agnieszka Nowak, dr hab. inż. Justyna Rosicka-Kaczmarek, dr inż. Karolina Miśkiewicz, dr inż. Małgorzata Redzynia, dr inż. Michał Sójka, mgr inż. Joanna Grzelczyk.

W XLIV Sesji wzięły udział 133 osoby, w tym 24 członków Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN. Uczestnicy to przedstawiciele 14 uczelni wyższych i instytucji naukowo-badawczych, 1 instytucji administracji państwowej oraz 2 podmiotów gospodarczych. Najliczniej reprezentowanymi jednostkami były Politechnika Łódzka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie oraz Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego.

Sesję w imieniu JM Rektora Politechniki Łódzkiej, prof. dra hab. inż. Sławomira Wiaki, otworzył Prorektor ds. kształcenia prof. dr hab. Grzegorz Bąk. Następnie głos

zabrała Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz i kolejno: przewodniczący Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN – prof. dr hab. Andrzej Lenart oraz Prezes Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności – prof. dr hab. inż. Agnieszka Kita, która wręczyła statuetkę laureatce konkursu PTTŻ na najlepszą pracę doktorską z zakresu nauk o żywności obronioną w 2018 r. Najwyższą punktację i nominację do nagrody Kapituła przyznała pracy dr inż. Anny Grygier pt. „Ocena zdolności grzybów pleśniowych *Galactomyces geotrichum* do syntezy związków bioaktywnych, ze szczególnym uwzględnieniem polienowych kwasów tłuszczowych”, wykonanej pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Rudzińskiej, prof. nadzw. Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz promotora pomocniczego dr inż. Kamili Myszk. W czasie rozpoczęcia konferencji wręczone zostały również dyplomy Członka Honorowego Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności – najwyższej godności nadawanej przez Walne Zgromadzenie Delegatów Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności. Odebrały je 4 osoby: prof. dr hab. Dorota Witrowa-Rajchert, prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska, prof. dr hab. Edward Pospiech i prof. dr hab. Antoni Golachowski. Następnie wykład inauguracyjny nt. „MikroRNA – nowy gracz wśród bioaktywnych składników diety” wygłosiła Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz.

W ramach tematu przewodniego XLIV Sesji „Nauka, technologia i innowacje w żywności i żywieniu” prezentowanych było 9 wykładów plenarnych, 24 referaty, 17 e-posterów i 42 tradycyjne plakaty w sześciu obszarach tematycznych: „Żywność funkcjonalna”, „Innowacyjne technologie w produkcji żywności”, „Bezpieczeństwo żywności”, „Żywienie człowieka”, „Biotechnologia” oraz „Aspekty środowiskowe w produkcji żywności”. Merytoryczny nadzór nad obradami sprawował Komitet Naukowy powołany spośród samodzielnych pracowników Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej w składzie: prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz, prof. dr hab. inż. Danuta Kalemba, prof. dr hab. Krzysztof Śmigielski, dr hab. inż., prof. nadzw. Radosław Bonikowski, dr hab. inż., prof. nadzw. Grażyna Budryn, dr hab. inż., prof. nadzw. Anna Diowks, dr hab. inż., prof. nadzw. Edyta Kordialik-Bogacka, dr hab. inż., prof. nadzw. Alina Kunicka-Styczyńska, dr hab. inż., prof. nadzw. Joanna Leszczyńska, dr hab. inż., prof. nadzw. Katarzyna Śliżewska, dr hab. inż., prof. nadzw. Dorota Żyżelewicz, dr hab. inż. Elżbieta Klewicka, dr hab. inż. Robert Klewicki, dr hab. inż. Agnieszka Nowak, dr hab. inż. Anna Podsędek.

Podczas XLIV Sesji zostały wygłoszone następujące wykłady plenarne:

- Żywność o małym stopniu przetworzenia – czy na pewno jest dla nas bezpieczna? – prof. dr hab. Katarzyna Czaczyk (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu),
- Bakteriocyny i ich nadal nie w pełni wykorzystany potencjał – dr hab. Anna Sip (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu),

- Unikalne kwasy tłuszczowe jako potencjalne składniki żywności funkcjonalnej – dr hab. Iwona Konopka, prof. nadzw. (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie),
- Kasze – dobre wczoraj, dobre dziś – prof. dr hab. Danuta Górecka (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu),
- Wpływ sposobu żywienia na patogenezę i przebieg wybranych chorób neurodegeneracyjnych – dr hab. Monika Bronkowska, prof. nadzw. (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu),
- Trendy i innowacje w przetwórstwie mięsnym – dr hab. Joanna Stadnik (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie),
- Związki biologicznie czynne w warzywach psiankowatych z produkcji ekologicznej i konwencjonalnej – dr hab. Ewelina Hallmann (Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie),
- Peptydy bioaktywne – właściwości funkcjonalne, możliwości i wyzwania – dr hab. Grażyna Budryn, prof. nadzw. (Politechnika Łódzka),
- Zastosowanie technik spektroskopowych w badaniu żywności – dr Rafał Głaszczka (SHIM-POL A. M. Borzymowski).

Tematyką dominującą podczas obrad było wytwarzanie i rola nutraceutyków w profilaktyce chorób cywilizacyjnych, innowacje w technologiach produkcji żywności oraz jakość i bezpieczeństwo zdrowotne żywności. W ramach konferencji wydano monografię, w której opublikowanych zostało 17 artykułów. Komisje oceniające wyniki badań prezentowane w ramach sesji przyznały nagrody w trzech kategoriach: za najlepszy referat, najlepiej zaprezentowany e-poster i poster tradycyjny. Nagrody otrzymali:

- I nagroda za referat – mgr inż. Bogumiła Urbańska (Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie): Porównanie właściwości przeciwutleniających czekolad wyprodukowanych z prażonego i nieprażonego ziarna kakaowego;
- II nagroda za referat – dr hab. inż. Wiesław Wiczkowski (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN): Charakterystyka wchłaniania, metabolizmu i biodostępności naturalnych czerwonych barwników pochodzenia roślinnego;
- III nagroda za referat – mgr inż. Justyna Szczepańska (Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego): Zmiany aktywności enzymów oksydoredukcyjnych w soku jabłkowym pod wpływem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego i homogenizacji wysokociśnieniowej;
- I nagroda za e-poster – mgr inż. Andrzej Jaśkiewicz (Politechnika Łódzka): Wpływ dodatku ekstraktu z cykorii podróżnik na właściwości opakowaniowej folii skrobiowej;

- II nagroda za e-poster – mgr inż. Milena Kaczmarek (Politechnika Łódzka): Aktywność i stabilność kompleksu inkluzyjnego polifenoli z ekstraktu z proszku kakaowego Acticoa z β -cyklodekstryną;
- III nagroda za e-poster – dr inż. Ewa Walaszczyk (Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu): Dobór źródła azotu w procesie biosyntezy kwasu szczawiowego przez *Aspergillus niger* we wglębnej hodowli okresowej;
- I nagroda za poster – prof. dr hab. Krzysztof Polewski (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu): Bursztynian tokoferolu w liposomach DPPC. Badania strukturalne metodami DSC i fluorescencji ANS;
- II nagroda za poster – dr hab. Jolanta Tomaszewska-Gras (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu): Rozpoznawanie zmian polimorficznych tłuszczu kakaowego jako przyczyny wad jakościowych czekolad;
- III nagroda za poster – prof. dr hab. inż. Dorota Witrowa-Rajchert (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie): Suszenie rozpyłowe koncentratu soku jabłkowego i miodu – badanie możliwości zastąpienia tradycyjnych nośników mlekiem w proszku.

Ponadto nagrodę Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności za najlepszy referat nt. „Zamienniki słoju jęczmiennego w produkcji piwa” otrzymała dr hab. inż., prof. nadzw. Edyta Kordalik-Bogacka z Politechniki Łódzkiej.

Konferencja otrzymała dofinansowanie z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Polskiej Akademii Nauk w ramach zadań związanych z działalnością upowszechniającą naukę. Dodatkowo sesję sponsorowały dwa podmioty gospodarcze, tj. SHIM-POL A. M. Borzymowski i Cukiernia Robert Dybalski.

Nieformalną częścią sesji było spotkanie towarzyskie w formie bankietu, które odbyło się w restauracji Browar Księży Młyn, w czasie którego wystąpił z krótką prezentacją absolwent Politechniki Łódzkiej mgr inż. Damian Bińkiewicz, pracujący w tym Browarze. Prezentacja dotyczyła wykorzystania wiedzy i doświadczenia zdobytego w czasie studiów w Politechnice Łódzkiej w podejmowaniu i realizowaniu wyzwań w życiu zawodowym.

Na zakończenie sesji prof. dr hab. Andrzej Lenart ogłosił, że organizatorem XLV Sesji Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN będzie Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie.

Dr hab. inż. Dorota Żyżelewicz, prof. nadzw.

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Politechnika Łódzka

TECHNOLOG ŻYWNOŚCI

INFORMATOR POLSKIEGO TOWARZYSTWA TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI

Rok 29 Nr 3

wrzesień 2019

WAŻNIEJSZE KRAJOWE I ZAGRANICZNE KONFERENCJE NAUKOWE

W 2019 ROKU

Wrzesień

- 16 - 18 NITRA, Slovakia = 14th International Scientific Conference FoodBioTech
Organizatorzy: Faculty of Biotechnology and Food Sciences of the Slovak University of Agriculture in Nitra
Informacje: <https://fbtcon.fbp.uniag.sk/>
Kontakt: Zuzana Kňazická
e-mail: food.bio.tech.con@gmail.com ; tel. +421-37-641-5382
- 19 - 20 **ŁÓDŹ = 3rd International Conference „Biologically Active Compounds in Food – BACIF 2019”**
Organizatorzy: Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, Instytut Technologii i Analizy Żywności Politechniki Łódzkiej, PTTŻ - Oddział Łódzki, PTTŻ - Sekcja Owoców i Warzyw
Informacje: <http://bacif2019.p.lodz.pl>
Kontakt: dr inż. Krzysztof Kołodziejczyk; tel. (42) 631-27-77
e-mail: bacif2019@info.p.lodz.pl

Październik

- 5 - 9 COLOGNE, Germany = Innovation Food Conference
Organizator: Koelnmesse GmbH Business International
Informacje: <https://10times.com/innovation-food-conference>
- 16 - 17 **CZĘSTOCHOWA = VIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa z cyklu Żywność – Żywnienie – Dietetyka nt. „Żywnienie i dietetyka osób starszych”**

Organizatorzy: Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy im. Jana Długosza w Częstochowie, Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Komitet Nauk o Żywności i Żywieniu PAN

Informacje: www.dietkonf.ujd.edu.pl

Kontakt: mgr Sylwia Ptak

e-mail: dietkonf@ujd.edu.pl ; tel. (34) 361-49-18 w. 163

- 21 - 23 ROME, Italy = International Congress on Food Science and Agronomy ICFA 2019 on "Research and Innovations in Food Science and Agronomy for healthy life"

Organizatorzy: Science Access

Informacje: <http://foodscience.summitsglobal.com>

Kontakt: foodscience@sameetings.net ; tel. 1-302-428-9993, 1-267-646-2200

WAŻNIEJSZE KRAJOWE I ZAGRANICZNE KONFERENCJE NAUKOWE

W 2020 ROKU

Marzec

- 26 - 27 PIEŠŤANY, Slovakia = XVII Scientific Conference with International Participation "Food safety and control"

Organizatorzy: Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences of the Slovak University of Agriculture in Nitra; National Contact Point for Scientific and Technical Cooperation with EFSA – Ministry of Agriculture and Rural Development, Bratislava

Informacje: www.bezpecnostpotravin.sk

Kontakt: prof. ing. Jozef Golian; e-mail: Jozef.Golian@uniag.sk

tel. +42137/6414 325

Maj

- 21 - 22 WROCŁAW = XXV Jubileuszowa Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ pt. „Przyszłość w żywności – żywność w przyszłości” i VIII International Session of Young Scientific Staff

Organizatorzy: PTTŻ – Oddział Wrocławski, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Sekcja Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Sekcja Chemii Żywności Polskiego Towarzystwa Chemicznego

Informacje: <https://smkn2020.wordpress.com>

Kontakt: dr inż. Anna Kancelista; e-mail: xxvsmknwroclaw@gmail.com

tel. (71) 320-77-73 / (71) 320-51-83

Czerwiec

15 - 16 GDAŃSK = XXVIII Ogólnopolskie Sympozjum Bromatologiczne „Innowacyjne podejście do bezpiecznej żywności i racjonalnego żywienia”

Organizatorzy: Katedra i Zakład Bromatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Ogólnopolska Sekcja Bromatologiczna Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Zespół Analityki Żywności Komitetu Chemii Analitycznej PAN, Zespół Higieny Żywności i Żywnienia Komitetu Nauki o Żywności Człowieka PAN

Informacje: <http://www.bromatologia2020.gumed.edu.pl>

Kontakt: Katedra i Zakład Bromatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

e-mail: bromatologia2020@gumed.edu.pl ; tel. (58) 349-10-89

Lipiec

6 - 10 WARSZAWA = Konferencja Europejskiego Stowarzyszenia Badaczy Ziemniaka 21st EAPR Triennial Conference

Organizatorzy: European Association for Potato Research, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

Informacje: <https://www.eapr2020.pl>

Kontakt: Magdalena Owczarek, tel. (12) 651-90-54

e-mail: eapr2020@targi.krakow.pl

Wrzesień

17 - 18 KRAKÓW = XIV Konferencja Naukowa z cyklu „Żywność XXI wieku“ nt. "Żywność a oczekiwania współczesnego konsumenta"

Organizatorzy: PTTŻ – Oddział Małopolski, Wydział Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Informacje: <http://www.pttzm.org>

Kontakt: dr hab. inż. Stanisław Kowalski, prof. nadzw.

e-mail: zywnoscxxi@pttzm.org ; tel. (12) 662-47-47

Przy Zarządzie Głównym: **TCHIBO – WARSZAWA Sp. z o.o. Marki, HORTIMEX Plus Spółka komandytowa Konin.**

Przy Oddziale Małopolskim: **ZAKŁADY PRZEMYSŁU TŁUSZCZOWEGO BIELMAR Sp. z o.o., Bielsko-Biała.**

KOMUNIKATY

Informacje dla Autorów oraz wymagania redakcyjne publikujemy na nowej stronie internetowej <http://www.wydawnictwo.pttz.org>

Przypominamy Państwu o nowym adresie internetowym Wydawnictwa – e-mail: redakcja@pttz.org

**Adresy Zarządu Głównego, Oddziałów i Sekcji
Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności**

PREZES / ODDZIAŁ	ADRES
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Kita Prezes PTTŻ	UPWr, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCŁAW Tel.: (71) 320-77-62; e-mail: agnieszka.kita@upwr.edu.pl
Dr inż. Krzysztof Kołodziejczyk Sekretarz PTTŻ	PŁ., ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 ŁÓDŹ Tel.: (42) 631-27-77; e-mail: krzysztof.kolodziejczyk@p.lodz.pl
Dr hab. inż., prof. nadzw. Aleksandra Wilczyńska Oddział Gdański	UM, ul. Morska 81-87, 81-225 GDYNIA Tel.: (58) 558-62-81; e-mail: a.wilczynska@wpit.umg.edu.pl
Dr hab. inż., prof. nadzw. Małgorzata Karwowska Oddział Lubelski	UP, ul. Skromna 8, 20-704 LUBLIN; Tel.: (81) 462-33-41; e-mail: malgorzata.karwowska@up.lublin.pl
Dr inż. Krzysztof Kołodziejczyk Oddział Łódzki	PŁ., ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 ŁÓDŹ Tel.: (42) 631-27-77; e-mail: krzysztof.kolodziejczyk@p.lodz.pl
Dr hab. inż. prof. nadzw. Mariusz Witczak Oddział Małopolski	UR, ul. Balicka 122, 30-149 KRAKÓW Tel.: (12) 662-48-35; e-mail: rrwitcza@cyf-kr.edu.pl
Dr hab. inż., prof. nadzw. Iwona Konopka Oddział Olsztyński	UWM, Pl. Cieszyński 1, 10-726 OLSZTYN Tel.: (89) 523-34-66; e-mail: iwona.konopka@uwm.edu.pl
Dr hab. inż., prof. nadzw. Małgorzata Dżugan Oddział Podkarpacki	UR w Rzeszowie, ul. M. Œwiklińskiej 2, 35-601 RZESZÓW Tel.: (17) 872-16-19; e-mail: mdzugan@ur.edu.pl
Dr hab. prof. nadzw. Izabela Dmytrów Oddział Szczeciński	ZUT, ul. Kazimierza Królewicza 4, 71-550 SZCZECIN Tel.: (91) 449-65-00; e-mail: izabela.dmytrow@gmail.com
Dr hab. inż., prof. nadzw. Ewa Jakubczyk Oddział Warszawski	SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 WARSZAWA Tel.: (22) 593-75-62; e-mail : ewa_jakubczyk@sggw.pl
Dr hab. inż. Małgorzata Gumienna Oddział Wielkopolski	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (61) 848-72-67; e-mail: gumienna@up.poznan.pl
Prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska Oddział Wrocławski	UPWr, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCŁAW Tel.: (71) 320-77-64; e-mail: pttz_ow@wnoz.up.wroc.pl joanna.kawa-rygielska@upwr.edu.pl
SEKCJE	
Dr Karol Krajewski Ekonomiczna	Politechnika Koszalińska, ul. Kwiatkowskiego 6e, 75-343 KOSZALIN Tel.: 609-807-618; e-mail: janjasienczyk@poczta.onet.pl
Dr inż. Arkadiusz Źych Technologii Mięsa	ZUT, ul. Kazimierza Królewicza 4, 71-550 SZCZECIN Tel.: (91) 449-66-00 wew. 6583; e-mail: arkadiusz.zych@zut.edu.pl
Dr hab. inż. Magdalena Rudzińska, prof. Chemii i Technologii Tłuszczów	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (61) 848-72-76; e-mail: magdar@up.poznan.pl
Prof. dr hab. inż. Antoni Gołachowski Technologii Węglowodanów	UPWr, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCŁAW Tel.: (71) 320-77-68; e-mail: antoni.golachowski@upwr.edu.pl
Dr hab. inż. Dorota Walkowiak-Tomczak Technologii Owoców i Warzyw	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (61) 846-60-43; e-mail: dorota.walkowiak@up.poznan.pl
Dr inż. Monika Przeor Młodej Kadry Naukowej	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (61) 848-73-30; e-mail: monika.przeor@up.poznan.pl