

## PREŽIVATELNOSŤ BAKTÉRIÍ V PROBIOTICKÝCH TYČINKÁCH BACTERIAL VIABILITY IN PROBIOTICS BARS

Miroslava Kačániová, Mária Angelovičová, Ivana Nováková, Jaroslav Pochop, Daniela Liptajová, Martin Kliment, Simona Kunová

### ABSTRACT

The aim of this study was the monitoring of probiotic bacteria viability in the probiotic bars and in probiotics during storage. From the microbiological indicators in the probiotic bars we monitored numbers of *Lactobacilli* counts in MRS agar during 48-72 h incubation at 37 °C, total number of bacteria in MPA agar during 48-72 h incubation at 25 °C and mesophile anaerobes sporulating microorganisms in MPA agar during 48-72 h incubation at 25 °C under anaerobic conditions. Bacterial viability of probiotic bars was adequate to the quality declared by the producer. Probioticum viability was in accordance to the requirements related to such sort of products.

**Key words:** viability, probiotics, bars, lactobacilli

---

### ÚVOD

Pokrok v spoznávaní významu črevnej mikroflóry pre udržovanie zdravia podnietil zvýšenie záujmu o potraviny obsahujúce probiotické baktérie a prebiotiká. Probiotiká sú živé mikroorganizmy, ktoré sa vyznačujú, ak sú podávané v dostatočnom množstve, zdraviu prospešnými účinkami a to najmä udrzovaním, resp. zlepšovaním zloženia mikroflóry v gastrointestinálnom trakte, alebo v inom anatomickom mieste hostiteľa. Probiotické baktérie obsadzujú receptory enterocytov, produkujú rôzne inhibičné substancie (bakteriocíny, kyselina mliečna, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a i.), zabraňujú prilipnutiu patogénov k črevnej sliznici a spúšťajú mechanizmus syntézy cytokínov (Drisko et al., 2005).

Na európskom trhu sa tieto prospešné baktérie nachádzajú najčastejšie vo fermentovaných mliečnych výrobkoch ako sú jogurty a mliečne nápoje, ale k dispozícii sú aj lyofilizované preparáty. Problémom komerčných preparátov je stabilita probiotík počas skladovania. Mnohé produkty obsahujú nízky počet živých mikroorganizmov a môžu existovať taxonomické rozdiely ohľadne probiotických kmeňov v niektorých produktoch. Schopnosť prežiť v ľudskom gastrointestinálnom trakte tiež môže byť prekážkou v ich využívaní. Štúdie na dobrovoľníkoch ukázali, že kyslé prostredie žalúdka, tráviace šťavy a kompetícia s autochtónnou črevnou mikroflórou môžu obmedziť schopnosť prežívania probiotických baktérií v čreve človeka. Ich predpokladané prospešné účinky sa dosiahnu len vtedy, ak sú ich živé bunky schopné prežiť pasáž hornou časťou gastrointestinálneho traktu a kolonizovať hrubé črevo. Jednou z požiadaviek na mikroorganizmy používané ako potravinové doplnky je potreba udržať životaschopnosť a aktivitu v preparáte pred konzumáciou (Kim, 1998).

Celkovo, jedným z najzaujímavejších mikroorganizmov z hľadiska jeho využitia ako pomocnej látky vo výžive je *Lactobacillus acidophilus*. Laktobacily tvoria početnú typickú súčasť mikroflóry črevného traktu cicavcov a vtákov, kde plnia významnú úlohu pri zisťovaní prirodzeného obranného systému a pozitívne ovplyvňujú proces celkového metabolizmu (Gilliland, 1990).

Produkujú enzýmy a vitamíny skupiny B, zvyšujú stráviteľnosť bielkovín, sacharidov a tiež tukov. Niektoré kmene *Lactobacilov* zvyšujú biologickú dostupnosť vápnika a tiež produkujú antimikrobiálne látky inhibujúce významné enteropatogény (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringen*) (Chang et al., 2001).

Schopnosť adhérencie a prežívania bakteriálneho kmeňa v danej ekologickej jednotke úzko súvisí s jeho pôvodom. Autochtónne (hostiteľovi vlastné) kultúry lepšie kolonizujú epitel, zatiaľ čo kmene alochtónnych (hostiteľovi nevlastných) mikroorganizmov sú za bežných

podmienok z ekosystému ľahko vyplavované, nie sú do danej ekologickej jednotky začlenené, sú potláčané interakciami mikrobiálneho spoločenstva alebo sú eliminované imunitnými obrannými mechanizmami hostiteľského organizmu (Nemcová, 1997).

Bifidobaktérie sú zaujímavé z hľadiska ich využitia ako probiotických doplnkových látok. Tieto baktérie podporujú mikrobiálnu rovnováhu v tráviacom trakte (Kim et al, 2007). Bifidobaktérie sú grampozitívne baktérie produkujúce kyselinu mliečnu odlišným spôsobom ako je to pri rode *Lactococcus*. Bifidobaktérie produkujú okrem kyseliny mliečnej aj acétát. To prebieha v nezvyčajnej metabolickej dráhe, ktorej výsledkom je vznik primárnych metabolitov acétátu a laktátu a to v teoretickom pomere 3:2 (Shah et al., 1995).

Bifidobaktérie a laktobacily majú niekoľko veľmi podobných vlastností, ako schopnosť produkovať metabolity podobné antibiotikám a organické kyseliny, schopnosť prežívať a rásť v anaeróbnom prostredí a schopnosť fungovať ako konkurenční antagonisti. Potláčajú rozvoj enteropatogénov, najmä *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Proteus sp.* (Lim et al., 1993).

Bomba et al. (2002) udávajú, produkčný kmeň by mal pochádzať z črevného traktu (alebo tolerovať podmienky tráviaceho traktu), mal by adherovať vo vysokých počtoch, zachovávať si vysokú životnosť pri spracovaní, lyofilizácii a skladovaní a byť schopný rýchlej revitalizácie v čreve po lyofilizácii, produkovať inhibičné látky voči patogénom a stimulovať imunitnú odpoveď.

Cieľom našej práce bolo sledovanie životaschopnosti probiotických baktérií v probiotických tyčinkách a v probiotiku počas skladovania.

## MATERIÁL A METODIKA

Zasúpenie jednotlivých skupín mikroorganizmov sme sledovali v piatich vzorkách probiotických tyčienok po výrobe a po mesiaci skladovania. Rovnako sme sledovali zastúpenie laktobacilov vo vzorkách probiotického preparátu, ktorý bol pridávaný do probiotických tyčienok. Z mikrobiologických ukazovateľov boli sledované počty *Lactobacillus sp.* na MRS agare počas 48-72 hodinovej inkubácie pri teplote 37 °C, celkový počet mikroorganizmov na MPA agare za aeróbnych podmienok počas 48-72 hodinovej inkubácie pri teplote 25 °C a počet mezofilne anaeróbne sporulujúcich mikroorganizmov anaeróbnych podmienok (anaerostat) počas 48-72 hodín inkubácie pri teplote 25 °C.

Na kvantitatívne stanovenie počtu kolónií tvoriacich jednotky (KTJ) jednotlivých skupín mikroorganizmov v 1 g substrátu sme použili platňovú zried'ovaciu metódu. Vopred pripravenými riedeniami (desiatkovým zried'ovacím systémom) homogenizovaných vzoriek sme naočkovali živné pôdy 1 ml vzorky v Petriho miskách zaliatím. Boli použité nasledovné selektívne médiá pre *Lactobacillus sp.* MRS, pre celkový počet mikroorganizmov MPA a pre anaeróbne mikroorganizmy MPA. Mezofilné anaeróbne sporulujúce mikroorganizmy boli kultivované za anaeróbných podmienok v anaerostatoch.

**Tabuľka 1** Počet živých buniek a determinácia (určenie) ich stability

Anaeróbná zmes	
zloženie	%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.45
L-cysteín HCL	0.05
Tween 80	0.05
dest. H <sub>2</sub> O	98.85
pH	6.8-7.0

\* úprava pH pomocou 0.1 M NaOH

Postup:

Precízne sme rozpustili 1 g originál vzorky v 9 ml vyautoklávovanom tlmivom roztoku. Vortexovali sme cca 20 min (2 min trepanie, 3 min elúcia, opakovať 4x) pri izbovej teplote na uvoľnenie obalových štruktúr. Skontrolovali sme uvoľnenie bakteriálnych buniek pod mikroskopom (x1000). Ak neboli baktérie kompletne uvoľnené, opakovali sme predchádzajúci postup. Pomocou desiatkovej zriedovacej metódy sme urobili riedenie  $10^9$ . Po zriedení nasledovala ďalšia 10 min elúcia (2 min trepanie, 3 min uvoľňovanie, opakovať 2x). Po dôkladnom uvoľnení bakteriálnych buniek v každej zmesi po cca 30 s sa pridalo 1 ml zmesi do sterilných Petriho misiek. Dôkladne sa premiešali s 20 ml živného média (MRS) pre *Lactobacillus* sp. Inkubovalo sa za nasledovných podmienok 37 °C po dobu 48-72 h v anaerostate.

Počet kolónií sa pohyboval v rozmedzí 30 – 300 na Petriho miske.

Vyhodnotili sme výsledky podľa nasledovného vzorca: počet kolónií x dilučný faktor = počet živých buniek ( $\text{cfu.g}^{-1}$ ).

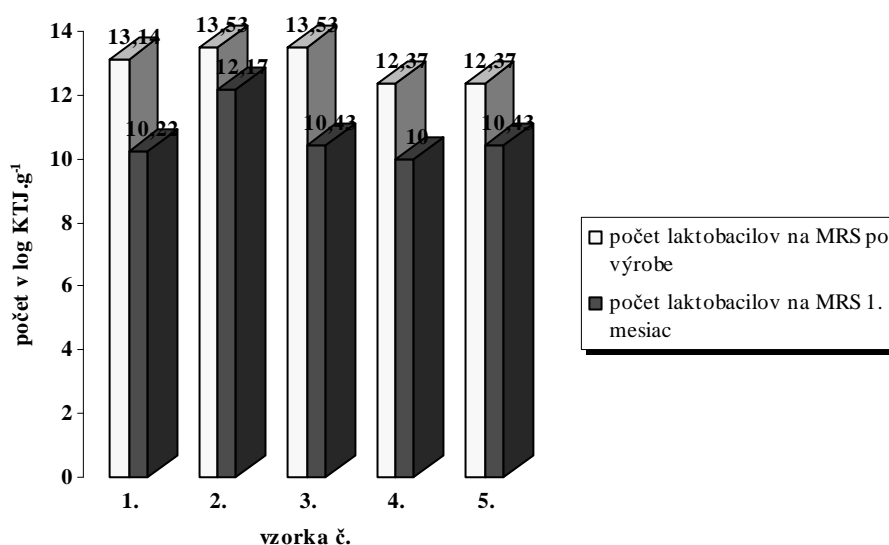
Na overenie viability sme pripravili vitálne sfarbený preparát a sledovali sme mikroskopicky (x1000).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

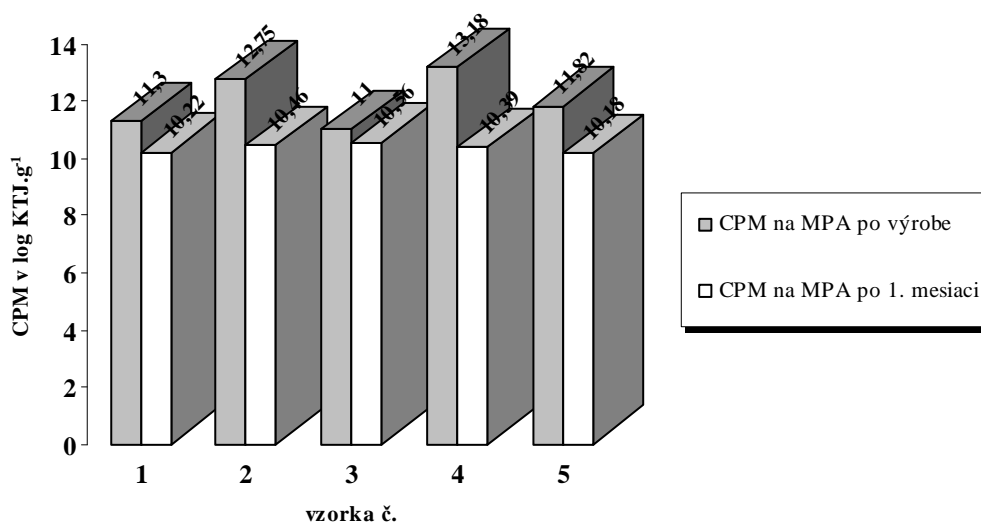
Funkčné potraviny sú novou generáciou potravinárskych výrobkov navrhnutých na zvýšenie nutričnej hodnoty bežných výrobkov pri zachovaní ich sensorických vlastností. Umožňujú spotrebiteľovi lepšie bilancovať svoju stravu bez zmeny stravovacích návykov. Dôležitá je použitá kombinácia kultúr bifidobaktérií a *L. acidophilus* a ďalších kyslomliečnych baktérií napr. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* alebo mezofilných aromatických kultúr, ktoré majú schopnosť chrániť potravinu pred viacerými nežiaducimi problémami. Nežiaducimi problémami sú nárast rastového objemu a redukcia fermentačného času, absencia sensorov a defekty textúry. Veľmi dôležité vlastnosti sú tolerancia proti kyseline a žľči, ktoré sú dôležité na zachovanie vysokého množstva životaschopných buniek v procese skladovania a počas prechodu cez zažívací trakt nasledovne po prechode cez ústnu dutinu a adhérenciu na ľudský vnútorný povrch čreva, ktorá je potrebná pre dočasné osídlenie ľudského črevného traktu a produkcia antimikrobiálnych látok, ktoré inhibujú patogény. Navyše vybrané druhy by mali produkovať finálne výrobky dobrej chuti, textúry a prijateľné telo (**Krajčová et al., 2007**).

Životaschopnosť bifidobaktérií sa rýchlo stráca aj v probio jogurtoch, napriek doporučeniu výrobcom spotrebovať do 30 dní. Po 7 dňoch uskladnenia pri teplote 4 °C počet živých bifidobaktérií sa zníži o 2 rády. Po 14 dňoch skladovania aj pri nízkych teplotách živé baktérie sa tam vyskytujú už len v zanedbateľnom počte. Výsledkami našich pokusov sme zistili, že počet laktobacilov, ktoré sa prirodzene nachádzali v probiotickom preparáte sa pohyboval v rozmedzí od 12,37 do 13,53  $\log \text{KTJ.g}^{-1}$ . Po mesiaci skladovania sa tento počet pohyboval v rozmedzí od 10,00 do 12,17  $\log \text{KTJ.g}^{-1}$ . Výrobca zaručuje prežiteľnosť baktérií obsahujúcich probiotikum 12 mesiacov od výroby pri skladovaní pri teplote 4 °C.

Väčšina funkčných potravín probiotického charakteru, ako aj potravinových aditív s probiotickými vlastnosťami (kapsule, tablety) obsahuje baktérie mliečneho kysnutia. Najčastejšie sú to rôzne druhy alebo kmene rodov *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. Johnsonii*), *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*), *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. faecalis*), resp. ich zmesi (**Vanderhoof, 2001**).



Obrázok 1 Počet laktobacilov v log KTJ.g<sup>-1</sup>

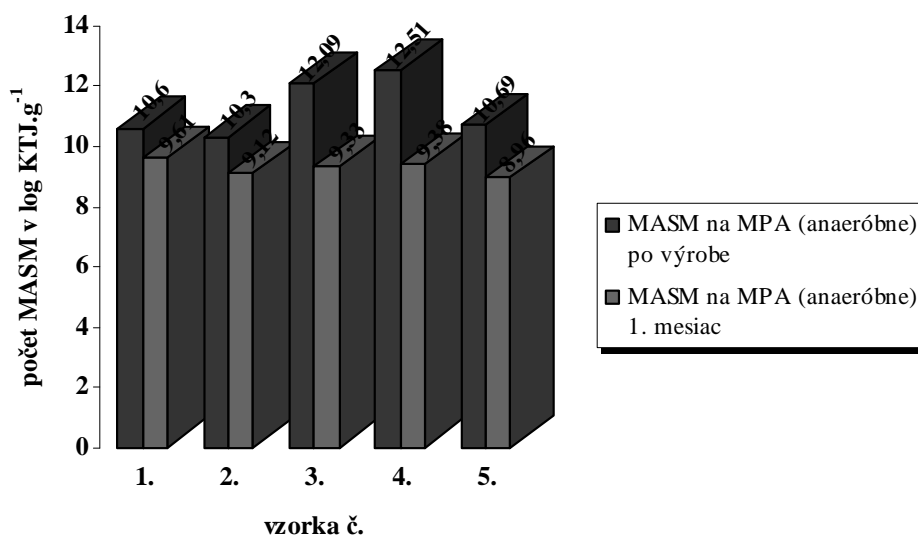


Obrázok 2 Celkový počet mikroorganizmov v log KTJ.g<sup>-1</sup>

V súčasnosti je snahou vyrábať fermentované produkty, ktorých hlavnou podstatou sú fermentované obilniny, fermentované ovocné a zeleninové šťavy a inkorporovať živé mliečne baktérie do krémov, práškových mliek a mrazených dezertov. Existuje viac ako 50 rôznych typov potravinárskych produktov obsahujúcich probiotiká, ktoré sú ponúkané hlavne na japonskom trhu. V Európe sú probiotiká veľmi obľúbené. Ich konzumácia vychádza predovšetkým z ponuky produktov trhom (**Heller, 2001**).

Celkový počet mikroorganizmov v probiotických tyčinkách sa pohyboval v rozmedzí od 11,00 do 13,48 log KTJ.g<sup>-1</sup> a po mesiaci skladovania tyčiniek sa tento počet pohyboval v rozmedzí od 10,18 do 10,56 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Celkový počet mikroorganizmov je len

informatívnym ukazovateľom a nemá vplyv na počet laktobacilov, ktoré sa kultivujú v mikroaerofilných podmienkach.

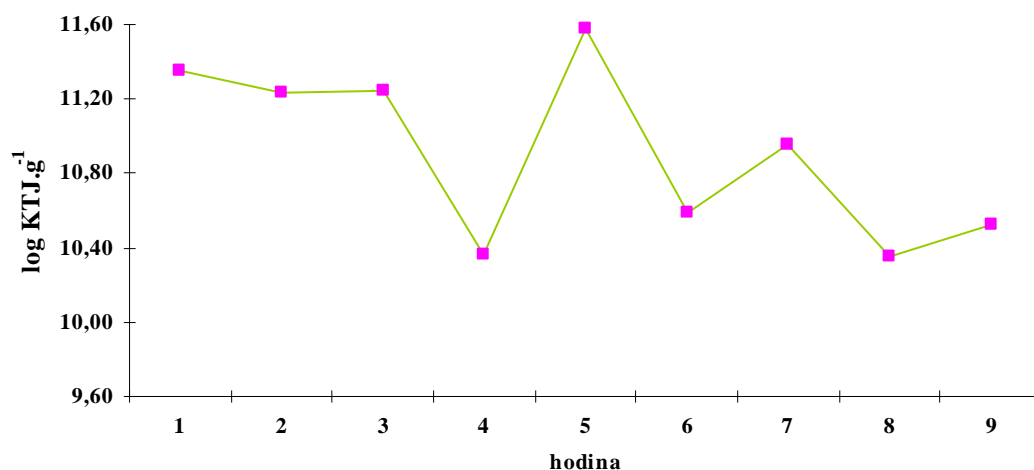


**Obrázok 3** Počet mezofilne anaeróbne sporulujúcich mikroorganizmov v log KTJ.g<sup>-1</sup>

Počet mezofilne anaeróbne sporulujúcich mikroorganizmov v probiotických tyčinkách sa pohyboval v rozmedzí od 10,30 do 13,51 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Počet týchto mikroorganizmov sa po mesiaci skladovania pohyboval v rozmedzí od 8,96 do 9,61 log KTJ.g<sup>-1</sup>.

Charakteristickým znakom kyslomliečnych výrobkov, vrátane jogurtov je prítomnosť živých mikroorganizmov. V jednom grame kyslomliečného výrobku musí byť prítomných najmenej  $1 \times 10^7$  živých mikroorganizmov, špecifických pre konkrétny druh výrobku. Kyslomliečne výrobky sa vyrábajú na moderných technologických linkách za dodržania prísnych hygienických opatrení a preto majú dlhú dobu spotreby (napr. 21 dní), pričom si zachovávajú vysoký počet živých mikroorganizmov (St-Onge et al., 2000).

Aktivita probiotického preparátu sme sledovali počas deviatich hodín. Od nulte do prvej hodiny mala klesajúcu tendenciu, potom tendencia do druhej hodiny bola vyrovnaná. Neskôr počet životaschopných baktérií počas štvrtej hodiny prudko klesol a následne počas piatej hodiny prudko stúpol na maximálnu hodnotu 11,60 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Od piatej hodiny mala viability klesajúcu tendenciu.



**Obrázok 4** Viabilita baktérií v probiotickom preparáte

Mechanizmus pôsobenia probiotík nie je presne známy, ale uplatňuje sa na úrovni anatomických štruktúr (zabránenie adhézie patogénnych mikroorganizmov na črevný epitel), ako aj zariadení prirodzenej a špecifickej imunity. Podstatou pôsobenia je imunostimulačný účinok na tie imunitné mechanizmy, ktoré sa uplatňujú v obrane proti patogénnym mikroorganizmom nachádzajúcim sa v GIT-e, a naopak imunosupresívny účinok na reakcie imunitnej precitlivenosti (hypersenzitívnosti) na potravinové antigény. Imunostimulačný účinok probiotík sa odráža aj vo zvýšenej rezistencii hostiteľa na spontánne nádory (najmä hrubého čreva, prostaty, obličiek a pečene) následkom účinnejšieho imunitného dozoru a zníženej aktivity pro-karcinogénnych enzýmov (**Hirayama a Rafter, 2000, Wollowski et al., 2001**).

Veľmi dôležitý je výber a aj kombinácia vhodných klinicky overených prospešných probiotických mikroorganizmov, ktoré sú odolné alebo chránené pred žalúdočnými a žľčovými kyselinami a enzýmami počas transportu do črevného traktu. Pri výbere probiotík je vhodné uprednostňovať vedecky overené probiotické prípravky, ktoré majú definované zloženie, sú upravené do vhodnej liekovej formy a nie je ich potrebné skladovať v chladničke. Probiotické jogurty, nápoje, biopotraviny je potrebné konzumovať čerstvé, keď obsahujú živé probiotické mikroorganizmy v dostatočnom počte (min.  $10^6$  v 1 dávke za deň) (**Drisko et al., 2003**).

## LITERATÚRA

- BOMBA, A., NEMCOVA, R., GANCARČÍKOVÁ, S., HERICH, R., GUBA, P., MUDROŇOVA, D. 2002. Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. In *British Journal of Nutrition*, vol. 88, 2002, Suppl. 1, p. 95–99.
- DRISKO, J.A., GILDA, C., BISCHOFF, B. 2003. Probiotics in health maintenance and disease prevention. In *Alternative Medicine Review*, vol. 8, 2003, no. 2, p.143–155.
- DRISKO, J., BISCHOFF, B., GILES, CH., ADDELSON, R. 2005. Evaluation of five probiotic products for label claims by DNA extraction and polymerase chain reaction analysis. In *Diseases and Science*, vol. 50, 2005, no. 6, p 1113-1117.
- GILLIAND, S. E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. In *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 87, 1990, p. 175-188.
- HELLER, K. J. 2001. Probiotic bacteria intermented foods : product characteristics and starter organisms. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, 2001, n. 2, p. 374-379.

- HIRAYAMA, K., RAFTER, J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. In *Microbes and Infections*, vol.2, 2000, p. 681-686.
- CHANG, Y.H., KIM, J.K., KIM, H.J., KIM, W.Y., KIM, Y.B., PARK, Y.H. 2001. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. In *Antonie van Leeuwenhoek*, vo. 80, 2001, no. 2, p. 2001 193-199
- KIM, H.S.1998. Characterisation of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. In *Culture Dairy Products Journal*, vol. 23, 1998, p. 6-9.
- KIM, P.I., JUNG, M.Y., CHANG, Y.H., KIM, S.H., KIM, S.J., PARK, J.H. 2007. Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract. In *Applied Mikrobiology and Biotechnology*, Vol. 74, 2007, no. 5, p. 2007 1103-1111.
- KRAJČOVÁ, E., GREIFOVÁ, M., SCHMIDT, Š. 2007. Výživové, zdravotné a technologické vlastnosti mliečnych probiotických výrobkov. In *Mliekarstvo*, roč. 38, 2007, č. 1, s. 28.
- LIM, K.S., HUH, C.S., Y. J. BAEK, Y.J. 1993. Antimicrobial Susceptibility of Bifidobacteria In *Journal of Dairy Science*, Vol. 76, 1993, no. 8, p. 2168-2174
- NEMCOVA, R. 1997 Criteria for selection of lactobacilli for probiotic use. In *Veterinarna Medicina*, vol. 42, 1997, no. 1, p.19-27.
- SHAH, N.P., LANKAPUTHRA, W.E.V., BRITZ, M.L., KYLE, W.S.A. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. In *International Dairy Journal*, Vo. 5, 1995, no. 5, p. 515-521
- ST-ONGE M.P., FARNWORTH, E.R, JONES, P.J. 2000. Consumption of fermented and non-fermented dairy products:effects on cholesterol concentration and metabolism. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 71, 2000, p. 674-681.
- VANDERHOOF J. A. 2001. Probiotics: future directions. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol.73, 2001, p.1152S-55S
- WOLLOWSKI, I., RECHKEMER, G., POOL-ZOBEL, B.L. 2001 Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, 2001, p. 451-445

### Pod'akovanie

Práca bola financovaná za podpory projektu APVV VMSP-P-0057-09.

### Kontaktná adresa:

doc. Ing. Miroslava Kačániová, PhD., Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel. č.: +421 37 641 4494, [Miroslava.Kacaniova@uniag.sk](mailto:Miroslava.Kacaniova@uniag.sk)

prof. Ing. Mária Angelovičová, PhD., Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel. č.: +421 37 641 5805, [Maria.Angelovicova@uniag.sk](mailto:Maria.Angelovicova@uniag.sk)

Ing. Ivana Nováková, Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel. č.: +421 37 641 5812, [Ivana.Novakova@uniag.sk](mailto:Ivana.Novakova@uniag.sk)

Ing. Jaroslav Pochop, Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel. č.: +421 37 641 4494, [Jaroslav.Pochop@uniag.sk](mailto:Jaroslav.Pochop@uniag.sk)

Ing. Daniela Liptajová, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel. č.: +421 37 641 5808, [Daniela.Liptajova@uniag.sk](mailto:Daniela.Liptajova@uniag.sk)

Ing. Martin Kliment, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel. č.: +421 37 641 5806, [Martin.Kliment@uniag.sk](mailto:Martin.Kliment@uniag.sk)

Ing. Simona Kunová, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel. č.: +421 37 641 5806, [simona.pavlicova@uniag.sk](mailto:simona.pavlicova@uniag.sk)