

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Urška JELENKO

**PREŽIVETJE SEVOV VRST *Lactobacillus delbrueckii* subsp.  
*bulgaricus* IN *Streptococcus thermophilus* V SIMULIRANIH  
POGOJIH PREBAVIL**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**SURVIVAL OF *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* AND  
*Streptococcus thermophilus* IN SIMULATED  
GASTROINTESTINAL CONDITIONS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Mikrobiološki del je bil opravljen v laboratorijih Katedre za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ireno Rogelj, za somentorico dr. Bojano Bogovič Matijašič in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Somentorica: dr. Bojana Bogovič Matijašič

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Urška JELENKO

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 579.24: 612.32 (043) = 163.6  
KG probiotični mikroorganizmi/*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*/*Streptococcus thermophilus*/rast mikroorganizmov/simulirani prebavni sokovi/želodčni sok/koeficient inhibicije rasti/liofilizirane bakterije/prehranska dopolnila  
AV JELENKO, Urška  
SA ROGELJ, Irena (mentorica)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (somentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)  
KZ SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2009  
IN PREŽIVETJE SEVOV VRST *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IN *Streptococcus thermophilus* V SIMULIRANIH POGOJIH PREBAVIL  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XII, 46 str., 4 pregl., 6 slik, 11 pril., 47 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Ugotavljali smo preživetje sevov vrst *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus* v simuliranih prebavnih sokovih. Po tretiranju bakterij s simuliranim želodčnim, žolčnim in črevesnim sokom smo preživetje bakterij ugotavljali s konvencionalno metodo štetja kolonij na selektivnih gojiščih. Preživetje bakterij iz sveže kulture smo primerjali s preživetjem liofiliziranih bakterij v komercialnih prehranskih dopolnilih. V simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH 2 so od laktobacilov preživeli sevi *L. bulgaricus* R1, *L. bulgaricus* OB2, *L. bulgaricus* TS in *L. bulgaricus* C1 in nobeden od testiranih streptokokov. Simuliran želodčni sok s pH 3 so preživeli vsi testirani sevi. Tako sevi vrste *L. bulgaricus* kot tudi seva vrste *S. thermophilus* so občutljivi za žolč, saj pri nobenem sevu  $c_{inh}$  ni bil manjši od 0,4. V simuliranem črevesnem soku sta najbolje preživela seva *L. bulgaricus* CH in *L. bulgaricus* OB2, katerih začetno število je padlo za 2 do 3 log enote, v enakih pogojih pa sta preživela tudi seva vrste *S. thermophilus*, vendar je začetno število padlo za 4 do 6,5 log enot. V treh prehranskih dopolnilih sta bila prisotna seva *L. bulgaricus* BF in *S. thermophilus* BF, ki sta spadala v čistih kulturah med bolj občutljive seve. Ugotovili smo, da sta v primerjavi s sevoma v čisti kulturi, oba seva v liofiliziranih izdelkih bolje preživela samo v simuliranem želodčnem soku pri pH 2, sev *L. bulgaricus* BF pa tudi v simuliranem črevesnem soku. Začetno število bakterij seva *L. bulgaricus* BF v liofiliziranih izdelkih je znašalo okoli 6 log ke/g izdelka, kar je v skladu s številom, ki ga navajajo deklaracije izdelkov ( $10^6$  ke/g izdelka). Začetno število bakterij seva *S. thermophilus* BF v liofiliziranih izdelkih je znašalo okoli 8 log ke/g izdelka, vendar ta vrsta bakterij ni bila navedena v deklaracijah.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.24: 612.32 (043) = 163.6  
CX probiotic microorganisms/*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*/ *Streptococcus thermophilus*/growth of microorganisms/simulated gastrointestinal juices/gastric juice/coefficient of growth inhibition/lyophilised bacteria/food supplements  
AU JELENKO, Urška  
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (co-advisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)  
PP SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2009  
TI SURVIVAL OF *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* AND *Streptococcus thermophilus* STRAINS IN SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XII, 46 p., 4 tab., 6 fig., 11 ann., 47 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB We examined the survival of strains of two species, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in simulated gastrointestinal juices. After treating of these bacteria with simulated gastric, bile and intestinal juices, we used the conventional colony counting method to determine their survival. We compared the survival of bacteria obtained from overnight cultures with the survival of lyophilised bacteria from commercial food supplements. In simulated gastric juice with pH 2 survived the strains *L. bulgaricus* R1, *L. bulgaricus* OB2, *L. bulgaricus* TS and *L. bulgaricus* C1 but not strains of *S. thermophilus*. In simulated gastric juice with pH 3 survived all tested strains. Tested strains of both species are sensitive to bile because neither of them had the inhibition coefficient lower than 0,4. In simulated intestinal juice the strains *L. bulgaricus* CH and *L. bulgaricus* OB2 had the best survival rate, their initial number fell by 2-3 log units. In the same conditions the strains of *S. thermophilus* also survived, but their initial number fell by 4-6,5 log units. Three food supplements with the strains *L. bulgaricus* BF and *S. thermophilus* BF, which were very sensitive in fresh cultures, were tested as well. We found out that in comparison with the strains in pure culture both strains in lyophilised product survived better only in the simulated gastric juice at pH 2 and *L. bulgaricus* BF survived better also in simulated intestinal juice. Initial number of *L. bulgaricus* BF in the lyophilised product was around 6 log ke/g of the product, what is comparable to the product's declaration ( $10^6$  ke/g of product). The initial number of *S. thermophilus* BF was around 8 log ke/g of lyophilised product. This species was not stated in the declaration.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG .....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	X
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 CILJ NALOGE .....	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 PROBIOTIKI SKOZI ZGODOVINO .....	3
2.2 ZAHTEVE ZA PROBIOTIKE .....	5
2.3 VPLIV PROBIOTIKOV NA ZDRAVJE .....	7
2.4 TIPIČNA JOGURTOVA KULTURA.....	8
<b>2.4.1 <i>Streptococcus thermophilus</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4.2 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .....</b>	<b>8</b>
2.5 SEVI TIPIČNIH VRST JOGURTOVE KULTURE KOT PROBIOTIKI .....	9
2.6 METODE ZA IZBOLJŠANJE PREŽIVETJA PROBIOTIKOV V RAZLIČNIH POGOJIH.....	13
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>16</b>
3.1 NAČRT POSKUSA.....	16
3.2 MATERIAL .....	16
<b>3.2.1 Bakterijski sevi in pogoji kultivacije .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.2 Probiotični izdelki.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.3 Gojišča in raztopine za razredčevanje.....</b>	<b>17</b>
3.2.3.1 Gojišče MRS .....	17
3.2.3.2 Gojišče M17 .....	18
3.2.3.3 Peptonska voda.....	18
<b>3.2.4 Simulirani prebavni sokovi.....</b>	<b>18</b>
3.2.4.1 Simuliran želodčni sok .....	18
3.2.4.2 Simuliran žolčni sok .....	18
3.2.4.3 Simuliran črevesni sok .....	18
3.3 METODE DELA .....	19
<b>3.3.1 Ugotavljanje začetnega števila mikroorganizmov v svežih kulturah in kapsulah .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.2 Preživetje testnih bakterij v simuliranem želodčnem soku .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3.3 Preživetje testnih bakterij v simuliranem črevesnem soku .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.4 Preživetje testnih bakterij v simuliranem žolčnem soku .....</b>	<b>21</b>

---

<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>22</b>
4.1	USTREZNOST DEKLARACIJ PROBIOTIČNIH IZDELKOV .....	<b>22</b>
4.2	PREŽIVETJE TESTNIH SEVOV V SIMULIRANIH PREBAVNIH SOKOVIH 22	
4.3	PREŽIVETJE TESTNIH SEVOV V LIOFILIZIRANIH IZDELKIH V SIMULIRANIH PREBAVNIH SOKOVIH .....	26
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>30</b>
5.1	RAZPRAVA .....	<b>30</b>
5.1.1	Ugotavljanje števila bakterij v probiotičnih izdelkih .....	30
5.1.2	Preživetje probiotičnih bakterij v simuliranem želodčnem soku .....	31
5.1.3	Preživetje probiotičnih bakterij v simuliranem žolčnem soku .....	33
5.1.4	Preživetje probiotičnih bakterij v simuliranem črevesnem soku .....	34
5.2	SKLEPI .....	36
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>41</b>

PRILOGE

ZAHVALA

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste mikroorganizmov, med katerimi najdemo probiotike (Senok in sod., 2005) .....	4
Preglednica 2: Imena in izvor posameznih testnih sevov .....	17
Preglednica 3: Vsebina kapsul treh različnih probiotičnih izdelkov .....	17
Preglednica 4: Začetno število testnih sevov <i>L. bulgaricus</i> BF in <i>S. thermophilus</i> BF v izdelku (log ke/g izdelka) .....	22

## KAZALO SLIK

Slika 1: Število bakterij testnih sevov v 18-urni kulturi in po 20-minutni izpostavitvi simuliranemu želodčnemu soku z različnimi vrednostmi pH .....	23
Slika 2: Število bakterij testnih sevov v 18-urni kulturi in po 2-urni izpostavitvi simuliranemu črevesnemu soku .....	24
Slika 3: Vrednosti koeficienta inhibicije testnih sevov po 8-urni izpostavitvi simuliranemu žolčnemu soku.....	25
Slika 4: Število bakterij seva <i>L. bulgaricus</i> BF v liofiliziranih izdelkih in po 20-minutni izpostavitvi izdelka s sevom simuliranemu želodčnemu soku z različnimi vrednostmi pH. ....	26
Slika 5: Število bakterij seva <i>L. bulgaricus</i> BF v liofiliziranih izdelkih in po 2-urni izpostavitvi izdelka s sevom simuliranemu črevesnemu soku .....	27
Slika 6: Število bakterij seva <i>S. thermophilus</i> BF v liofiliziranih izdelkih in po 8-urni izpostavitvi izdelka s sevom simuliranemu želodčnemu soku z različnimi vrednostmi pH .....	28



## KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Povprečno število testnih sevov (log ke/ml) pred in po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom različnih vrednosti pH (vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)
- Priloga A2: Razmerje med končnim in začetnim številom testnih sevov po tretiranju z želodčnim sokom različnih vrednosti pH (vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)
- Priloga A3: Preživetje testnih sevov v simuliranem črevesnem soku (vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)
- Priloga A4: Koeficienti inhibicije testnih sevov po izpostavitvi simuliranemu žolčnemu soku (vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)
- Priloga A5: Izmerjene vrednosti  $A_{650}$  pred in po tretiranju sevov s simuliranim žolčnim sokom v prvem preskusu
- Priloga A6: Izmerjene vrednosti  $A_{650}$  pred in po tretiranju sevov s simuliranim žolčnim sokom v drugem preskusu
- Priloga B1: Preživetje seva *Lactobacillus bulgaricus* BF, vključenega v izdelek, v simuliranem želodčnem soku različnih vrednosti pH (vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)
- Priloga B2: Preživetje seva *Streptococcus thermophilus* BF, vključenega v izdelek, v simuliranem želodčnem soku različnih vrednosti pH (vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)
- Priloga B3: Preživetje seva *Lactobacillus bulgaricus* BF, vključenega v izdelek, v simuliranem črevesnem soku (vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)
- Priloga B4: Razmerje med končnim in začetnim številom seva *L. bulgaricus* BF, vključenega v izdelek, po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom različnih vrednosti pH
- Priloga B5: Razmerje med končnim in začetnim številom seva *S. thermophilus* BF, vključenega v izdelek, po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom različnih vrednosti pH

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
cfu	Colony forming unit
$C_{inh}$	Koeficient inhibicije
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FSA	Food Science Asociation
ke	Kolonijske enote
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
log	Logaritem
MRS	Gojišče de Man – Rogosa - Sharpe
OTC	Over-the-counter (zdravila brez recepta)
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)
<i>L. bulgaricus</i> BF	sev vključen v probiotičen izdelek
<i>S. thermophilus</i> BF	sev vključen v probiotični izdelek

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Povečevanje stroškov zdravstvene nege, daljšanje življenjske dobe in želja odraslih po kvalitetnejšem življenju so danes pomembni dejavniki, ki vzpodbujajo razvoj in mnoge raziskave na področju funkcionalne hrane in prehranskih dopolnil, med katere uvrščamo tudi probiotične izdelke (Vasiljevic in Shah, 2008).

Uživanje izdelkov, ki vsebujejo probiotične bakterije, lahko vpliva na gostitelja posredno preko spreminjanja sestave črevesne mikroflore, ali pa neposredno. Med pozitivne učinke na zdravje ljudi omenjajo preprečevanje ali zdravljenje diareje, povečevanje odpornosti proti črevesnim patogenim bakterijam, preprečevanje raznih bolezni prebavil in protikancerogeno delovanje (Santosa in sod., 2006). Število probiotičnih bakterij v izdelkih in preparatih ni predpisano z zakonodajo niti v Sloveniji, niti v drugih državah. Po mnenju strokovnjakov, ki so opravili številne raziskave, naj bi bilo v izdelku prisotnih minimalno  $10^6$  probiotičnih bakterij na ml oziroma gram izdelka (Saarela in sod., 2000).

O probiotičnem izdelku ali preparatu lahko govorimo takrat, kadar vsebuje seve, stabilne v pogojih, ki vladajo v prebavnem traktu. To pomeni, da morajo priti bakterije žive v črevo in se tam vsaj začasno naseliti (Rogelj, 1997). Neugodne pogoje v prebavilih predstavljajo nizke vrednosti pH v želodcu zaradi izločanja želodčne kisline in visoke koncentracije žolčnih kislin ter encimov v tankem črevesu. Za mnoge od probiotičnih bakterij iz tovrstnih izdelkov ni na voljo podatkov o njihovih lastnostih, kot so preživetje med prehodom skozi prebavila in učinkovitost delovanja. Na preživetje namreč lahko vplivajo tudi sestavine izdelka (proteini, laktoza, oligosaharidi, antioksidanti...), ki v mnogih primerih zagotavljajo dodatno zaščito pred neugodnimi pogoji (Anal in Singh, 2007).

Sposobnost preživetja ugotavljamo tako *in vitro*, kjer skušamo ustvariti pogoje, ki so čim bolj podobni tistim v prebavilih, kakor tudi *in vivo* na živalskih modelih ali ljudeh. *In vivo* raziskave so zelo kompleksne, zato za ugotavljanje sposobnosti preživetja bakterij v

prebavnih pogojev uporabljajo tudi več-oddelčne modele, ki simulirajo posamezni del človeškega prebavnega trakta (Palencia in sod., 2008).

V okviru naloge smo nameravali z različnimi mikrobiološkimi metodami ugotoviti, kolikšno je začetno število bakterij v probiotičnih izdelkih, kako dobro bakterije vrst *Streptococcus thermophilus* in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (v nadaljevanju *L. bulgaricus*) v čistih kulturah in liofiliziranih probiotičnih prehranskih dopolnilih preživijo v simuliranih pogojih prebavil, ter kako vplivajo na njihovo preživetje sestavine pripravkov (matriks).

## 1.2 CILJ NALOGE

Glede na številne objave o slabem preživetju mlečnokislinskih bakterij, ki ne izvirajo iz prebavil, smo predvidevali, da bomo med bakterijami vrst *Streptococcus thermophilus* in *Lactobacillus bulgaricus* našli predvsem takšne, ki nimajo dovolj izraženih lastnosti, ki omogočajo preživetje v prebavilih, kot so odpornost proti nizkim vrednostim pH, proti žolčnim solem ter encimom pankreasa.

## 1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavljali smo, da bo preživetje bakterij boljše, kadar jih bomo testirali skupaj s pomožnimi snovmi, s katerimi se nahajajo v kapsulah, torej v obliki liofiliziranega prehranskega dopolnila, kot pa če jih bomo predhodno namnožili v gojišču ter testirali celice iz čistih kultur.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PROBIOTIKI SKOZI ZGODOVINO

Koncept probiotikov se je pojavil že v začetku 20. stoletja, ko je Nobelov nagrajenec, ruski znanstvenik Elie Metchnikoff leta 1908 temeljito opisal in poudaril pomen črevesne mikroflore za človekovo zdravje. Menil je, da redno uživanje fermentiranih mlečnih izdelkov in s tem vnašanje zdravju koristnih mlečnokislinskih bakterij pomembno pripomoreta k ohranjanju ravnovesja črevesnih bakterij in zmanjšujeta »gnilobni« tip fermentacij (Siuta-Cruce in Goulet, 2001).

Izraz probiotiki je prvič uporabil Parker leta 1974 za opis dodatkov živalski krmi in jih definiral kot »organizme in substance, ki pripomorejo k ohranjanu intestinalne mikrobne združbe« (Fooks in sod., 1999).

Ker je bila definicija probiotikov dolgo omejena zgolj na živalsko prehrano, sta Haavenaar in Huis in 't Veld leta 1992 predlagala razširitev definicije tudi na humano prehrano. Probiotike sta opisala kot »mono- ali mešane kulture živih mikroorganizmov, ki koristno učinkujejo na človeka ali žival z uravnavanjem črevesne mikroflore« (Vasiljevic in Shah, 2008).

Najbolj splošno sprejeto definicijo je leta 1989 podal Fuller: »Probiotiki so živ mikrobni dodatek krmi, ki ugodno vpliva na žival gostiteljico, z izboljšanjem njenega mikrobnega ravnotežja« (Anal in Singh, 2007).

Od leta 2002 pa je najbolj razširjena definicija, ki sta jo povzeli tudi organizaciji FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations) in WHO (World Health Organization), in opisuje probiotike kot »žive mikroorganizme (bakterije ali kvasovke), ki ugodno vplivajo na zdravje gostitelja, če jih ta zaužije v zadostni količini« (Santosa in sod., 2006).

Probiotike danes opisujejo kot žive mikroorganizme, ki vplivajo na fiziologijo gostitelja tako, da okrepijo črevesni in sistemski imunski odziv in izboljšajo prehransko in mikrobnoravnesje v prebavilih. Ker pa v zadnjem času ugotavljajo, da delovanje v smislu stimulacije imunskega sistema ni omejeno zgolj na žive celice, se pogosto srečamo s terminom probiotično aktivna snov, pri čemer gre za celične komplekse (mrtve celice ali deli celic) mlečnokislinskih bakterij ali drugih probiotičnih mikroorganizmov, ki tudi vplivajo na funkcijo črevesne sluznice in na imunski odziv (Rogelj in Matijašič, 2004).

V zadnjih dvajsetih letih delovanje probiotičnih bakterij na zdravje ljudi obsežno raziskujejo, zato jih je mlekarska industrija v veliki meri začela vključevati v proizvodnjo mlečnih izdelkov in tako pripomogla k razvoju nove generacije živil, med katerimi zavzemajo pomembno mesto probiotični izdelki (Chandramouli in sod., 2004).

Probiotiki za ljudi se pojavljajo pretežno v obliki funkcionalne hrane ter v manjši meri v obliki prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta (OTC). Zadnji dve skupini vsebujeta liofilizirane ali posušene mikroorganizme. Uporabljajo se za izboljšanje zdravja in počutja pri ljudeh in živalih (vključno s pospeševanjem rasti), lahko pa vplivajo na vse gostiteljeve površine, pokrite s sluznico, to je ustno votlino in gastrointestinalni trakt ter urogenitalni trakt (lokalno doziranje) (Cukjati Trnovšek, 2001).

Preglednica 1: Vrste mikroorganizmov, med katerimi najdemo probiotike (Senok in sod., 2005)

<b><i>Lactobacillus</i> spp.</b>	<b><i>Bifidobacterium</i> spp.</b>	<b>ostali</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> <sup>a</sup>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <sup>a</sup>	<i>B. longum</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <sup>b</sup>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. adolescentis</i>	
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

a- njihova probiotična aktivnost ni potrjena

b- le posamezni sevi ustrezajo zahtevam varnosti, zaradi potencialne patogenosti in odpornosti proti vankomicinu

## 2.2 ZAHTEVE ZA PROBIOTIKE

Izbira probiotika mora temeljiti na določenih selekcijskih kriterijih, ki vključujejo ugotavljanje varnosti in kliničnih učinkov. Potrebni so trije pristopi, ki pa morajo v končni fazi predstavljati zaključeno celoto. To so:

- proučevanje seva (izvor, identifikacija, karakterizacija, ugotavljanje varnosti na nivoju rodu, vrste in seva)
- proučevanje farmakokinetike seva (preživetje in aktivnost v črevesu, vezava in s tem večje možnosti za naselitev, morebitna invazivnost, odnos med odmerkom in učinkom)
- študije interakcij med sevom in gostiteljem (vezava na črevesno tkivo, selektivna stimulacija koristnih bakterij in zaviranje škodljivih, stimulacija/supresija imunskega odziva, klinični stranski učinki) (Rogelj, 2001).

Poleg varnosti in dokazanih funkcionalnih lastnosti mora imeti probiotični sev, ki ga želimo vključiti v hrano, tudi sprejemljive tehnološke lastnosti: preživeti mora tehnološki postopek in skladiščenje izdelka, sestavine hrane ne smejo vplivati na njegove karakteristike, s svojo aktivnostjo ne sme negativno vplivati na organoleptične lastnosti izdelka (Rogelj, 2001).

Z vidika varnosti je za probiotične bakterije, namenjene za uporabo v humani prehrani, zaželeno, da so humanega izvora, zahteva pa se, da so nepatogene, ne povzročajo infekcij, ne razgrajujejo črevesne sluznice, ne povzročajo dekonjugacije žolčnih soli ter da ne vsebujejo prenosljivih genov za odpornost proti antibiotikom (Saarela in sod., 2000).

Funkcionalnost probiotičnih bakterij temelji na njihovi sposobnosti preživetja in naselitve v prebavnem traktu (Taranto in sod., 2006). Na njihovo preživetje v prebavnem traktu vplivajo različni dejavniki, med katere sodijo odpornost proti kislinam, žolčnim solem in prebavnim encimom (Iyer in Kailasapathy, 2004). Pomembna lastnost, ki probiotičnim bakterijam omogoča kolonizacijo, pa je tudi njihova sposobnost pritrjevanja na sluznico prebavil, zlasti na črevesne epitelne celice (Pedrosa in sod., 1995).

Med pomembne kriterije, na podlagi katerih poteka izbor probiotičnih bakterij, sodi tudi inhibicija patogenih bakterij. Inhibicijo omogoča proizvodnja kislin, bakteriocinov in

drugih protimikrobnih snovi, ter sposobnost tekmovanja s patogenimi bakterijami za hranila in receptorska mesta na epitelnih celicah črevesa. Nekateri sevi lahko izboljšajo imunsko odzivnost. Med pomembne lastnosti uvrščamo tudi antikarcinogeno in antimutageno delovanje. Znano je, da nekateri probiotični sevi lahko vežejo in razgrajujejo karcinogene in/ali prokarcinogene snovi ter inhibirajo rast bakterij, ki prokarcinogene snovi pretvarjajo v karcinogene (Senok in sod., 2005).

Probiotike lahko zaužijemo v obliki fermentiranega ali nefermentiranega živila, ali kot pripravke v obliki kapsul, tablet, praškov. Pri tem bi morale biti, z vidika zdravja potrošnikov, izpolnjene naslednje zahteve (Rogelj in Matijašič, 2004):

- V primeru, da gre za probiotično živilo, mora biti to prav tako varno kot konvencionalno živilo.
- Če so navedeni učinki na zdravje, morajo ti biti ustrezno dokazani tudi v kliničnih raziskavah na ljudeh.
- Izdelki morajo biti jasno in natančno označeni tako, da je porabnik ob nakupu nedvoumno seznanjen z vsebino izdelka.
- Deklaracija bi morala vsebovati naslednje informacije:
  - a) zaznamek, ali so prisotne žive bakterije,
  - b) natančen opis bakterij,
  - c) velikost populacije posamezne bakterije, zapisane v enotah, razumljivih porabniku in strokovno pravih,
  - d) minimalno količino bakterij, ki ima še zdravju koristne učinke,
  - e) natančno vsebnost bakterij za obdobje, ko je izdelek na tržišču, torej do konca roka obstojnosti in ne samo podatek o številu bakterij v svežem izdelku.



### 2.3 VPLIV PROBIOTIKOV NA ZDRAVJE

Probiotiki imajo številne ugodne učinke za zdravje ljudi, ki jih Holzapfel in Schillinger (2002) delita na:

- Prehranske učinke:
  - proizvodnja vitaminov, mineralov,
  - proizvodnja pomembnih prebavnih encimov,
  - proizvodnja  $\beta$ -galaktozidaze, ki izboljša presnovo laktoze.
- Lajšanje simptomov pri:
  - infekcijski diareji (potovalna diareja, otroška virusna diareja),
  - diarejah zaradi zdravljenja z antibiotiki in obsevanjem.
- Zniževanje koncentracije holesterola v krvi:
  - z asimilacijo,
  - z modifikacijo hidrolazne aktivnosti žolčnih soli.
- Stimulacija in izboljšanje delovanja imunskega sistema:
  - preprečevanje infekcij,
  - povečanje fagocitozne aktivnosti levkocitov,
  - povečanje proizvodnje igA,
  - indukcija sinteze citokinov.
- Izboljšanje absorpcije v črevesju, preprečevanje zaprtja:
  - preprečevanje črevesnih vnetij in alergij,
  - ponovna vzpostavitev ravnovesja v imunskem sistemu,
  - nadzorovanje sinteze citokinov.
- Sposobnost adhezije in kolonizacije v črevesju:
  - antikarcinogeno delovanje v debelem črevesju,
  - vezava mutagenov,
  - inaktivacija in preprečevanje nastanka karcinogenov in prokarcinogenov,
  - izboljšanje imunskega odziva.
- Spreminjanje metabolne aktivnosti črevesnih bakterij,
- Ohranjanje integritete črevesne sluznice in
- Antioksidativno delovanje.

## 2.4 TIPIČNA JOGURTOVA KULTURA

Jogurt, ki je produkt mlečnokislinske fermentacije z bakterijama *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus*, je že dolgo poznan po ugodnih učinkih na zdravje ljudi. V mnogih raziskavah so se znanstveniki posvetili vplivu klasične jogurtove kulture na prebavni trakt ljudi in dokazali, da jogurt s svojimi bakterijami izboljša presnovo laktoze pri laktoza-intolerantnih ljudeh, vpliva na čas prebave oziroma tranzitni čas in stimulira črevesni imunski sistem (Elli in sod., 2006).

### 2.4.1 *Streptococcus thermophilus*

Bakterije vrste *Streptococcus thermophilus* so po Gramu pozitivne, okrogle ali ovalne oblike. V mleku oblikujejo dolge verižice, sestavljene iz 10-20 celic. Laktozo fermentirajo po homofermentativni poti do L(+) mlečne kisline. Mikrobna populacija *S. thermophilus* v jogurtu doseže velikost  $10^8$  do  $10^9$  ke/ml. Mlečna kislina v koncentracijah okrog 10 g/kg jogurta (vrednost pH 4,3-4,5) inhibira nadaljno rast in metabolizem *S. thermophilus*. Proteolitska aktivnost te vrste je omejena, kot izvor dušika pa vsaj v začetku fermentacije služijo proste aminokisliline, ki so v mleku naravno prisotne, sproščajo pa se tudi med toplotno obdelavo mleka. Koncentracija aminokislin v mleku je premajhna za uspešno rast *S. thermophilus*, ob podpori *L. bulgaricus* pa je fermentacija uspešna, saj laktobacili zagotovijo kratkoverižne peptide, ki jih streptokoki lahko hidrolizirajo in tako pridobijo potrebne aminokisliline. Optimalna temperatura za rast te vrste je 37 °C, vendar med proizvodnjo jogurta dobro raste ob *L. bulgaricus* tudi pri 42 °C. *S. thermophilus* stimulira rast *L. bulgaricus* s proizvodnjo metanojske kisline in majhnih količin CO<sub>2</sub>, ki nastane pri razgradnji sečnine (Rogelj in Perko, 2003).

### 2.4.2 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Bakterije vrste *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (krajše *L. bulgaricus*) so po Gramu pozitivne, paličaste bakterije. Bakterijske celice se združujejo v mleku v kratke verižice, sestavljene iz treh do štirih celic. Laktozo fermentirajo po homofermentativni poti do D(-) mlečne kisline, ki na koncu fermentacije doseže koncentracijo okoli 18 g/kg jogurta. Vrsta *L. bulgaricus* je precej bolj odporna proti kislini kot *S. thermophilus*. Za razliko od *S. thermophilus* ima vrsta *L. bulgaricus* proteinaze za razgradnjo kazeina,

predvsem  $\beta$ -kazeina, zato je v tem pogledu odvisna od *S. thermophilus*, ki ji z razgradnjo kratkoverižnih peptidov zagotavlja aminokislino. *S. thermophilus* stimulira rast *L. bulgaricus* s proizvodnjo metanojske kisline in majhnih količin CO<sub>2</sub>, ki nastanejo pri razgradnji sečnine (Rogelj in Perko, 2003).

## 2.5 SEVI TIPIČNIH VRST JOGURTOVE KULTURE KOT PROBIOTIKI

Jogurt je eden najbolj poznanih fermentiranih mlečnih izdelkov. S prehrambenim kodeksom je bil leta 1992 definiran kot koaguliran mlečni izdelek, ki nastane pri kisli fermentaciji mleka z bakterijskima vrstama *Lactobacillus bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus* (Adolfson in sod., 2004).

Ker vrsti, ki predstavljata tipično jogurtovo kulturo, primarno ne izvirata iz človeških prebavil, slabo prenašata neprijazne pogoje prebavil (še posebej streptokoki) in imata slabo sposobnost pritrjevanja na epitelne celice. Zato ju običajno ne uvrščajo med probiotične bakterije (Elli in sod., 2006).

Preživetje bakterij *Lactobacillus bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus* med prehodom skozi gastrointestinalni trakt ljudi in njihov ugodni vpliv na zdravje ljudi, so že veliko raziskovali. Brigidi in sod. (2003) so v raziskavi med drugim ugotavljali prisotnost bakterije *S. thermophilus* v vzorcih blata. V raziskavo je bilo vključenih deset zdravih ljudi in deset bolnikov z vnetjem črevesja. Pet od desetih zdravih ljudi je deset dni zaužilo dnevno po 250 g jogurta, ostalih pet pa po 6 g farmacevtskega probiotičnega pripravka, ki je vseboval liofilizirane bakterije *S. thermophilus* ter bakterijske seve iz rodov *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*. Vzorci blata so bili odvzeti na začetku terapije, tretji, sedmi in zadnji dan terapije. Za detekcijo posameznih vrst bakterij so uporabili metodo verižnega pomnoževanja DNA s polimerazo (PCR) in vrstno specifičnimi začetniki. Rezultati so pokazali, da je število bakterij *S. thermophilus* v vzorcih blata ljudi, ki so uživali jogurt, naraščalo do zadnjega dne terapije, po prenehanju terapije pa je število začelo padati. Tako šesti dan po prenehanju terapije v vzorcih blata niso več zasledili prisotnosti bakterij vrste *S. thermophilus*. Pri ljudeh, ki so uživali farmacevtski probiotični pripravek, je število *S. thermophilus* v vzorcih blata naraščalo še tretji dan po koncu terapije, nato pa hitro začelo upadati. Pri bolnikih z vnetjem črevesja je terapija trajala dva

meseca. Pri slednjih je bila vrsta *S. thermophilus* v vzorcih blata prisotna le pri tretjini bolnikov.

O preživetju bakterij iz jogurta med prehodom skozi gastrointestinalni trakt so poročali tudi Mater in sod. (2005). V raziskavo so vključili trinajst zdravih oseb, starih od 25 do 45 let, ki so dvanajst dni uživale trikrat dnevno po 125 ml svežega jogurta. Odvzeli so 39 vzorcev blata, v katerem so ugotavljali prisotnost živih bakterij vrst *L. bulgaricus* in *S. thermophilus*. Vrsta *S. thermophilus* je bila prisotna v 32-ih od 39 vzorcev, vrsta *L. bulgaricus* pa v 37-ih od 39 vzorcev. Ugotovili so tudi, da je bila selektivnost gojišč za omenjeni vrsti zelo slaba, metoda PCR pa je bila za identifikacijo zanesljiva.

Nasprotno pa so poročali o preživetju teh vrst med prehodom skozi gastrointestinalni trakt Del Campo in sod. (2005), ki so izvedli zelo obsežno raziskavo, v katero je bilo vključenih 114 zdravih mladih ljudi, katerih povprečna starost je bila 23,6 let. Razdeljeni so bili v dve skupini po 48 prostovoljcev. V raziskavo je bilo vključenih tudi 18 ljudi, ki jogurta niso uživali in so predstavljali kontrolno skupino. Prva skupina ljudi je v prvi fazi, ki je trajala dva tedna, uživala po 375 g svežega jogurta dnevno, medtem ko je druga skupina uživala enako količino pasteriziranega jogurta. V drugi fazi poskusa pa so tipa jogurtov skupinama zamenjali. Vzorce blata so odvzeli pred začetkom terapije, po koncu prve faze poskusa in po koncu druge faze poskusa. Analize so opravili z gojenjem bakterij na selektivnih gojiščih, z metodo PCR in s hibridizacijskimi tehnikami. Rezultati so pokazali prisotnost vrste *S. thermophilus* v vzorcih blata pri 10-ih od 96 oseb, ki so uživale svež jogurt, in le pri dveh od 96 oseb, ki so uživale pasteriziran jogurt, medtem ko je bila vrsta *L. bulgaricus* v vzorcih blata prisotna le pri sedmih od 96 oseb, ki so uživale svež jogurt ter pri eni od 96 oseb, ki so uživale pasteriziran jogurt.

O slabem preživetju so poročali tudi Pedrosa in sod. (1995), ki so opravili raziskavo, v katero so vključili deset starejših oseb, obolenih za gastritisom, in 23 starejših oseb, ki so bile zdrave. Povprečna starost oseb, zajetih v raziskavi, je bila 72 let. Raziskava je bila sestavljena iz treh faz: od prvega dne do 12. dne so ljudje dnevno uživali po 240 g pasteriziranega jogurta ali kapsule, ki so vsebovale mrtve bakterije *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* in *L. gasseri* (slednje imajo dobro sposobnost pritrjevanja na epitelne celice),

od 13. do 24. dne so uživali enako količino jogurta oziroma kapsule z živimi bakterijami, od 25. do 36. dne pa so ponovili postopek iz prve faze. Ugotavljali so prisotnost bakterij v želodčnem in črevesnem soku in vpliv uživanja jogurta oziroma kapsul na število mikroorganizmov v želodcu in črevesju. Bakterijski vrsti *L. bulgaricus* in *S. thermophilus* nista bili prisotni v želodčnem in črevesnem soku niti pri zdravih osebah, niti pri osebah obolelih za gastritisom. Bakterijski sev vrste *L. gasseri* je bil prisoten v želodčnem in črevesnem soku pri treh od štirih oseb z gastritisom, v vzorcih blata pa je bil prisoten pri štirih od petih oseb obolelih za gastritisom, medtem ko je bil v vzorcih blata prisoten pri enajstih od dvanajstih oseb, ki so bile zdrave. Rezultati raziskave so tako pokazali, da so bakterije vrste *L. gasseri* mnogo bolje preživele prehod skozi gastrointestinalni trakt kot predstavnice *L. bulgaricus* in *S. thermophilus*, kar so pripisali predvsem dobri adhezivni sposobnosti seva vrste *L. gasseri*.

Raziskave o preživetju probiotičnih bakterij med prehodom skozi prebavni trakt pa so bile opravljene tudi na modelih prebavil *in vitro*. Eno tovrstnih raziskav so opravili Marteau in sod. leta 1996, vključeni pa so bili sevi različnih vrst bakterij. Uporabili so dinamični model prebavil, ki je vseboval štiri različne oddelke: simuliran želodec in dvanajsternik ter simulirano tanko in debelo črevo. V simuliranem tankem črevesu je bila koncentracija žolčnih soli visoka, v debelem pa nizka. Oddelki so bili zaporedno povezani s črpalkami, ki so bile računalniško nadzorovane in so simulirale peristaltiko. Vsebinsko obroka sta predstavljala dva fermentirana izdelka, od katerih je eden vseboval seva *Bifidobacterium bifidum* in *Lactobacillus acidophilus*, drugi pa je bil navaden jogurt s klasično jogurtovo kulturo. Preživetje sevov so spremljali v simuliranem želodcu, med prehodom kaše iz simuliranega želodca v simuliran dvanajsternik, med prehodom kaše skozi simulirano tanko črevo in v oddelku, ki je simuliral debelo črevo. Spremljali so vrednost pH, koncentracijo encimov in žolčnih soli ter peristaltiko. Za predstavnike *B. bifidum* in *L. acidophilus* so se rezultati raziskave dobro ujemale z rezultati, pridobljenimi s poskusi »*in vivo*«, ki so pokazali dobro preživetje. Ujemanje rezultatov za *L. bulgaricus* in *S. thermophilus* je bilo nekoliko slabše. Slednja sta bila v želodčnem oddelku prisotna le v sledovih, in preživelost po dobri uri je bila slabša kot pri *B. bifidum* in *L. acidophilus*. Po dveh urah je bilo živih le še manj kot en odstotek celic *L. bulgaricus* in *S. thermophilus* in okoli 40 odstotkov celic *B. bifidum* in *L. acidophilus*. Med prehodom kaše v dvanajstnik je

število živih bakterij *L. bulgaricus* in *S. thermophilus* zopet nekoliko naraslo (na 26 % oziroma 12 % začetnega števila), vendar je bilo v primerjavi z *B. bifidum* (67 %) in *L. acidophilus* (64 %) še vedno manjše. V prisotnosti žolčnih soli v visoki koncentraciji, ki je znašala okoli 10 mmol/l, je število preživelih bakterij *L. bulgaricus* in *S. thermophilus* padlo pod 5 %, pri *L. acidophilus* na 30 % in pri *B. bifidum* na 50 %, pri koncentraciji okoli 2 mmol/l pa je ponovno nekoliko naraslo. Rezultati so pokazali zelo različno sposobnost preživetja posameznih bakterijskih sevov v pogojih prebavil.

V raziskavah *in vitro* ne moremo vzpostaviti prav takih pogojev, kot vladajo *in vivo*. Če spremljamo koncentracijo žolčnih soli, se ta v različnih delih črevesja nenehno spreminja. Po zaužitju obroka v dvanajsterniku koncentracija žolčnih soli sprva naraste na okoli 15 mmol/l in hitro pade na 5 mmol/l, v zgornjem delu tankega črevesja istočasno znaša okoli 10 mmol/l, v debelem črevesu pa na koncu, zaradi absorpcije, pade pod 4 mmol/l. Pomemben dejavnik je tudi zgradba žolčnih soli in posledično tudi njihova protimikrobna aktivnost, ki je pri konjugiranih žolčnih solih znatno nižja kot pri prostih žolčnih solih. Prav tako so žolčne soli v kombinaciji z želodčnim sokom precej bolj protimikrobno učinkovite kot pa želodčni ali žolčni sok sam (Marteau in sod., 1996).

## 2.6 METODE ZA IZBOLJŠANJE PREŽIVETJA PROBIOTIKOV V RAZLIČNIH POGOJIH

Da bi zagotovili ugodne učinke na zdravje, znanstveniki danes priporočajo uživanje probiotičnih izdelkov, ki vsebujejo minimalno  $10^7$  ke živih probiotičnih bakterij v ml oziroma g izdelka (Sultana in sod., 2000).

Pogosto je število probiotičnih bakterij v izdelkih premajhno, ali pa vsebujejo bakterije, ki so slabo raziskane glede odpornosti proti želodčni kislini, žolču, žolčnim solem in prebavnim encimom ter posledično slabo preživijo prehod skozi gastrointestinalni trakt. Le dobro preživetje pa v končni fazi omogoča vsaj začasno kolonizacijo v črevesu in izražanje pričakovanih funkcionalnih učinkov. V zadnjem času zato veliko pozornosti posvečajo razvoju novih tehnoloških postopkov, med katerimi so predvsem zanimive različne tehnike enkapsulacije, ki omogočajo boljše preživetje tako med skladiščenjem kakor tudi med prehodom skozi prebavila (Capela in sod., 2006).

Zaradi dokazanih zdravstvenih učinkov danes v številne mlečne izdelke kot so jogurt, mehki, poltrdi in trdi siri, sladoled, mlečni praški in zamrznjeni mlečni deserti, dodajajo mikroenkapsulirane probiotične bakterije. Mikroenkapsulacija je definirana kot tehnologija pakiranja trdnih, tekočih ali plinastih materialov v miniaturne in zaprte kapsule. Te lahko svojo vsebino sprostijo v specifičnih pogojih, tudi v različnih predelih prebavnega trakta. Mikro kapsula je sestavljena iz polprepustne, sferične, tanke in močne membrane, ki obdaja trdno/tekoče jedro, ki lahko vsebuje tudi probiotične bakterije. Najpogosteje so te membrane zgrajene iz alginatov, pa tudi iz citozana, karboksimetil-celuloze, karaginina, želatine in pektina (Anal in Singh, 2007).

Z ugotovitvijo, da imajo različni sevi probiotičnih bakterij različno sposobnost preživetja v prebavnem traktu, se je začel razvijati tudi koncept prebiotikov. To so neprebavljive sestavine hrane, ki eni vrsti ali omejenemu številu bakterij v črevesju omogočajo selektivno rast in/ali aktivnost in s tem ugodno vplivajo na zdravje gostitelja. Mednje uvrščamo neprebavljive oligosaharide, proteine in peptide pa tudi nekatere lipide, ki bakterijam med navedenim pomagajo preiti tudi razne biološke ovire v zgornjem delu prebavnega trakta. Kadar probiotike uporabljamo v kombinaciji s prebiotiki govorimo o

sinbiotikih. Zelo dobro poznan sinbiotik je kombinacija bifidobakterij in fruktooligosaharidov (Fooks in sod., 1999).

O ugodnih vplivih prebiotikov, enkapsulacijskih tehnik in materialov ter raznih zaščitnih snovi, kot so krio- in ozmo-protaktanti, so poročali avtorji številnih raziskav.

Chandramouli in sod. (2004) so primerjali preživelost enkapsuliranih in neenkapsuliranih probiotičnih bakterij različnih vrst rodu *Lactobacillus*. Rezultati raziskave so pokazali, da enkapsulirane bakterije *L. acidophilus* bistveno bolje preživijo v kislem okolju želodca ( $\text{pH} < 2$ ) in v prisotnosti visokih koncentracij žolča (1,0 %) kot neenkapsulirane, proste bakterije.

O podobnih rezultatih so poročali tudi Sultana in sod. (2000), ki so za proučevanje izboljšanja preživelosti probiotičnih bakterij poleg tehnike enkapsulacije, uporabili tudi prebiotike in krioprotektante. Ugotovili so, da glicerol kot krioprotektant zagotavlja bistveno boljšo preživelost enkapsuliranih, liofiliziranih celic *L. acidophilus*, shranjenih pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ter izpostavljenih kislim pogojem želodca. Ob dodatku koruznega škroba, kot prebiotika, se je preživelost še izboljšala. Rezultati raziskave pa so poleg navedenega pokazali, da mikroenkapsulirane probiotične bakterije proizvedejo večje količine mlečne kisline v jogurtu, v primerjavi z neenkapsuliranimi.

Saarela in sod. (2005) so za proučevanje preživelosti *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* med liofilizacijo, shranjevanjem in izpostavljenostjo kislemu okolju, kot krioprotektante pa uporabili betain, posneto mleko in saharozo. Pri uporabi saharoze je bila preživelost neenkapsuliranih celic med shranjevanjem pri temperaturi  $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  najboljša. Kot dobra zaščitna snov se je saharoza izkazala tudi pri izpostavljanju celic želodčnim in žolčnim kislinam, zato avtorji raziskave njeno uporabo priporočajo tudi v proizvodnji drugih ne-mlečnih probiotičnih izdelkov.

O izboljšanju preživetja probiotikov s pomočjo prebiotikov in krioprotektantov so poročali tudi Capela in sod. (2006). Rezultati njihove raziskave so pokazali, da se je ob dodatku raftiloze kot prebiotika, preživetje izbranih probiotičnih bakterij rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* v svežem jogurtu, shranjenem štiri tedne pri temperaturi  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , izboljšalo



za 1,42 logaritemskih enot. Ugotovili pa so tudi, da mikroenkapsulacija z alginati izboljša preživetje bakterij rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* za 0,31 logaritemskih enot v liofiliziranem jogurtu, shranjenem pri 21 °C.

Picot in Lacroix (2004) sta za imobilizacijo *Bifidobacterium breve* in *Bifidobacterium longum* uporabila mlečno maščobo in denaturirane sirotkine proteine. Slednji so znatno pripomogli k preživetju vrste *Bifidobacterium breve* v želodčnem soku z vrednostjo pH 1,9 in v črevesnem soku z dodanim pankreatinom in žolčnimi solmi, ki je imel vrednost pH 7,5. Število imobiliziranih celic v obeh medijih je naraslo za 2,7 logaritemskih enot v primerjavi z številom neimobiliziranih celic. Med 28-dnevnim shranjevanjem jogurta z imobiliziranimi bakterijami pri 4 °C je število naraslo za 2,6 logaritemskih enot.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 NAČRT POSKUSA

Najprej smo testne seve vrst *S. thermophilus* in *L. bulgaricus* namnožili v primernih tekočih gojiščih in ugotovili njihovo število. Nato smo izvedli poskus preživetja svežih bakterijskih kultur v simuliranih prebavnih sokovih.

Pri izbranih liofiliziranih probiotičnih prehranskih dopolnilih (izdelkih), pakiranih v kapsule, smo najprej pregledali deklaracije in poiskali podatke o številu in vrsti prisotnih mikroorganizmov. Na osnovi teh podatkov smo izbrali ustrezna selektivna gojišča za preverjanje začetnega števila živih bakterij v posameznem izdelku in izbrali ustrezne razredčitve vzorcev. Nato smo vsebino kapsul mešali s simuliranimi prebavnimi sokovi, ter ugotavljali preživetje bakterij.

Za ugotavljanje preživetja v simuliranih prebavnih sokovih smo število bakterij ugotavljali s konvencionalno metodo štetja kolonijskih enot na selektivnih hranilnih gojiščih oziroma zasledovali rast z merjenjem optične gostote. Morfološke lastnosti preiskovanih bakterij smo ugotavljali z mikroskopiranjem.

#### 3.2 MATERIAL

##### 3.2.1 Bakterijski sevi in pogoji kultivacije

Imena in izvor bakterijskih sevov, ki smo jih uporabili (testni sevi), so navedeni v Preglednici 1. Seve smo prejeli iz zbirke proizvajalca prehranskih dopolnil in jih hranili pri temperaturi -20 °C, v mikrobiološki zbirki Katedre za mlekarstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani. Predhodne analize so pokazale nekatere potencialno probiotične lastnosti sevov (podatki proizvajalca). Zamrznjene testne seve smo oživili s precepljanjem v tekoča gojišča. Za seve vrste *L. bulgaricus* smo uporabili gojišče MRS (Merck, Darmstadt, Nemčija), za seve vrste *S. thermophilus* pa smo uporabili gojišče M17 (Merck, Darmstadt, Nemčija). Seve obeh vrst smo inkubirali pri temperaturi 42 °C, v anaerobnih razmerah, ki smo jih zagotovili z uporabo sistema Generbox (Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, Francija).

Preglednica 2: Imena in izvor posameznih testnih sevov

Bakterijski sev	Izvor
<i>L. bulgaricus</i> R1	Jogurt Rodopeia
<i>L. bulgaricus</i> OB2	Domači jogurt iz ovčjega mleka iz Bolgarije
<i>L. bulgaricus</i> TS	Domači jogurt iz kravjega mleka iz Bolgarije
<i>L. bulgaricus</i> C1	Več različnih domačih jogurtov iz kravjega mleka iz Bolgarije
<i>L. bulgaricus</i> CH	Domači jogurt iz kravjega mleka iz Bolgarije
<i>L. bulgaricus</i> BF	Liofiliziran pripravek BF
<i>L. bulgaricus</i> L21	Domači jogurt iz kravjega mleka iz Bolgarije
<i>S. thermophilus</i> BF	Liofiliziran pripravek BF
<i>S. thermophilus</i> C1	Domači jogurt iz kravjega mleka iz Bolgarije

### 3.2.2 Probiotični izdelki

Probiotične izdelke (prehranska dopolnila) smo prejeli od proizvajalca in smo jih do analize hranili na sobni temperaturi. Uporabljeni probiotični izdelki so navedeni v Preglednici 3.

Preglednica 3: Vsebina kapsul treh različnih probiotičnih izdelkov

Probiotični izdelek	Probiotični sev	Aerosil A200 (mg)	Mg stearat (mg)	Pektin (mg)	Biotorin (mg)
Pripravek BF	<i>L. bulgaricus</i> BF + <i>S. thermophilus</i> BF	3,5	3,5	/	/
Pripravek BF z dodatkom pektina	<i>L. bulgaricus</i> BF + <i>S. thermophilus</i> BF	3,5	3,5	17,5	/
Biotorin BF	<i>L. bulgaricus</i> BF + <i>S. thermophilus</i> BF	3,5	3,5	/	171,5

### 3.2.3 Gojišča in raztopine za razredčevanje

#### 3.2.3.1 Gojišče MRS

Trdno hranljivo gojišče MRS smo uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila kolonijskih enot (ke) *Lactobacillus bulgaricus*, tekoče gojišče pa za oživitev in pripravo 18-urnih kultur. Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), razdelili v stekleničke (po 200 ml agarja) oziroma epruvete (po 10 ml bujona) in ga avtoklavirali 15 minut pri 115 °C.

### 3.2.3.2 Gojišče M17

Agar in bujon M17 smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) in ga uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila ke *Streptococcus thermophilus* oziroma za oživitev in pripravo 18-urnih kultur.

### 3.2.3.3 Peptonska voda

Po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) smo pripravili Ringerjevo raztopino ter dodali 1 g/l peptona (Trypton, Merck, Darmstadt, Nemčija). Raztopino smo razdelili po 9 ml v epruvete in avtoklavirali. Uporabili smo jo za razredčevanje po Kochu.

## 3.2.4 Simulirani prebavni sokovi

Simulirane prebavne sokove smo pripravili tako, kot je navedeno v poročilu o rezultatih podobne raziskave, o kateri so poročali Gibson in sod. (2005).

### 3.2.4.1 Simuliran želodčni sok

V destilirani vodi smo raztopili 7,5 g/l peptona (Trypton, Merck, Darmstadt, Nemčija) in vsebino porazdelili v stekleničke (po 200 ml peptonske vode). Nato smo vrednost pH v posameznih stekleničkah umerili z 1 M HCl na 1, 2, 3 in 6,5. Stekleničke smo nato avtoklavirali 10 min pri 121 °C. Pred začetkom poskusa smo aseptično dodali še toliko raztopine pepsina (300 mg/l), da je bila končna koncentracija encima 15 mg/l.

### 3.2.4.2 Simuliran žolčni sok

Najprej smo pripravili bujon MRS oziroma M-17 po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) in ga porazdelili v stekleničke po 200 ml. V posamezne stekleničke smo nato dodali dehidrirani žolč »Ox-gall« (Merck, Darmstadt, Nemčija) v koncentracijah 0,5 g/l, 1 g/l in 3 g/l. Stekleničke smo nato avtoklavirali 10 min pri 121 °C.

### 3.2.4.3 Simuliran črevesni sok

Najprej smo v destilirani vodi raztopili 1 g/l žolčnih soli (Merck, Darmstadt, Nemčija). Po avtoklaviranju (10 min, 121 °C) smo dodali koncentrirani pufer PBS (20-kratni koncentrat), uravnavali vrednost pH na 8,0 in nato dodali še pankreatin (1 g/l).

### 3.3 METODE DELA

#### 3.3.1 Ugotavljanje začetnega števila mikroorganizmov v svežih kulturah in kapsulah

Epruveto s svežo 18-urno kulturo smo najprej dobro premešali, nato smo ob plamenu odvzeli 1 ml vzorca, ga prenesli v 9 ml  $1/4$  Ringerjeve raztopine ter nadalje razredčili s fiziološko raztopino v razmerju 1:10, z metodo po Kochu v sterilnih pogojih. Izdelek iz kapsul smo pripravili tako, da smo 1 g vsebine kapsul dopolnili z 9 g  $1/4$  Ringerjeve raztopine, rehidrirali 15 minut na sobni temperaturi ter nadalje redčili, kakor je opisano. Po 1 ml posameznih redčitev kultur oziroma izdelka smo prenesli v prazne petrijevke, dodali raztopljeno gojišče, ohlajeno na 45 °C, dobro premešali in pustili, da se je agar strdil.

Petrijevke z gojiščem MRS smo inkubirali 48 h pri temperaturi 42 °C, v anaerobnih pogojih, ki smo jih ustvarili s pomočjo Generbox sistema (Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, Francija). Petrijevke z gojiščem M17 smo inkubirali v aerobnih razmerah, pri temperaturi 42 °C, 48 h.

Po končani inkubaciji smo prešteli izrasle kolonije s pomočjo elektronskega števca (EŠKO, 7L, LABO Ljubljana). Število kolonijskih enot (ke) bakterij v mililitru sveže kulture, oziroma v gramu izdelka, smo izračunali po naslednji formuli (IDF standard ..., 1991):

$$KE = \frac{\sum n}{(f_a \cdot 1 + f_b \cdot 0,1) \cdot d} \quad \dots (1)$$

Legenda:

$\Sigma n$  vsota kolonij izraslih na ploščah

$f_a$  število plošč, uporabljenih v prvi razredčitvi

$f_b$  število plošč, uporabljenih v drugi razredčitvi

$d$  recipročni razredčitveni faktor najnižje razredčitve

### 3.3.2 Preživetje testnih bakterij v simuliranem želodčnem soku

Pri svežih kulturah smo preživetje bakterij testirali tako, da smo najprej v aseptičnih pogojih po 1 ml posameznega vzorca prenesli v štiri sterilne mikroeprovete (1,5 ml). Te smo nato centrifugirali 5 min pri 3500 g, po centrifugiranju pa smo supernatant odlili. V vsako epruveto smo nato dodali po 1 ml simuliranega želodčnega soka z vrednostmi pH 1, 2, 3 in 6,5 ter 50 µl raztopine pepsina. Nato smo vzorce inkubirali 20 min pri sobni temperaturi.

Po končani inkubaciji smo iz posamezne epruvete odvzeli po 1 ml vsebine in napravili zaporedne razredčitve z  $\frac{1}{4}$  Ringerjevo raztopino v razmerju 1:10, jih nanесли na petrijeve plošče, zalili z gojiščem. Petrijevke z gojiščem MRS smo inkubirali v anaerobnih pogojih, petrijevke z gojiščem M17 pa v aerobnih, v vsakem primeru 48 h pri 42 °C.

Po končani inkubaciji smo izrasle kolonije prešteli s pomočjo elektronskega števca (EŠKO, 7L, LABO Ljubljana) in število kolonijskih enot bakterij v ml sveže kulture izračunali po formuli (1), ki je navedena v poglavju 3.3.1.

Pri testiranju preživetja bakterij iz probiotičnih izdelkov, smo najprej ob ognju odprli kapsulo in vsebino prenesli v sterilno epruveto. Uporabili smo 0,1 g izdelka, ki smo ga ob ognju prenesli v sterilno mikroeproveto in dodali 1 ml simuliranega želodčnega soka (pH = 1, 2, 3 in 6,5) ter 50 µl raztopine pepsina. Po inkubaciji, ki je potekala pri sobni temperaturi, 20 min, smo 1 ml vsebine redčili in nacepili, kakor je opisano za čiste kulture. Test preživetja probiotičnih bakterij v simuliranem želodčnem soku smo opravili dvakrat v primeru svežih kultur in dvakrat v primeru bakterij iz probiotičnih izdelkov. Rezultate smo ovrednotili s koeficientom-r kot navajajo Gibson in sod. (2005) po naslednji formuli:

$$r = \frac{\text{končno število bakterij}}{\text{začetno število bakterij}} \quad \dots (2)$$

### 3.3.3 Preživetje testnih bakterij v simuliranem črevesnem soku

Najprej smo 1 ml sveže kulture odpipetirali v prazno sterilno epruveto in nato dodali 9 ml simuliranega črevesnega soka. Pri testiranju preživetja bakterij iz probiotičnega izdelka, smo najprej ob ognju odprli kapsulo in vsebino prenesli v sterilno epruveto. Uporabili smo 1 g izdelka, ki smo mu dodali 9 ml simuliranega črevesnega soka. Suspenzije celic, oziroma izdelka, smo inkubirali 2 h pri temperaturi 37 °C.

Po končani inkubaciji smo vzorce redčili in nacepljali, kakor je opisano v poglavju 3.3.1.

### 3.3.4 Preživetje testnih bakterij v simuliranem žolčnem soku

V prazno sterilno epruveto smo najprej odpipetirali 1 ml sveže kulture in dodali 9 ml simuliranega žolčnega soka z različnimi koncentracijami žolčnih soli. Epruvete smo nato inkubirali 8 h pri temperaturi 37 °C.

Na začetku in po končani inkubaciji smo s spektrofotometrom izmerili absorbanco vzorcev pri 650 nm, kot kontrolni vzorec pa smo uporabili tekoče gojišče brez dodanih žolčnih soli in brez kulture. Preživetje bakterij smo ovrednotili s koeficientom inhibicije, ki smo ga izračunali po naslednji formuli:

$$c_{inh.} = \frac{A_{T8-T0,konst.} - A_{T8-T0}}{A_{T8-T0,konst.}} \quad \dots (3)$$

Legenda:

$A_{T8}$  absorbanca vzorca, izmerjena po 8-urni inkubaciji

$A_{T0}$  absorbanca vzorca, izmerjena ob času 0 h

$A_{T0,konst.}$  absorbanca kontrolnega vzorca

$c_{inh.}$  koeficient inhibicije

$c_{inh.} < 0,4$  bakterije so odporne proti žolčnim solem

## 4 REZULTATI

### 4.1 USTREZNOST DEKLARACIJ PROBIOTIČNIH IZDELKOV

Pri pregledu deklaracij probiotičnih izdelkov smo ugotovili, da naj bi izdelki vsebovali  $10^6$  ke/g izdelka bakterij vrste *Lactobacillus bulgaricus*. Deklaracije niso vsebovale informacije o vsebnosti, oziroma številu bakterij vrste *Streptococcus thermophilus*.

Preglednica 4: Začetno število testnih sevov *L. bulgaricus* BF in *S. thermophilus* BF v probiotičnih izdelkih (log ke/g izdelka)

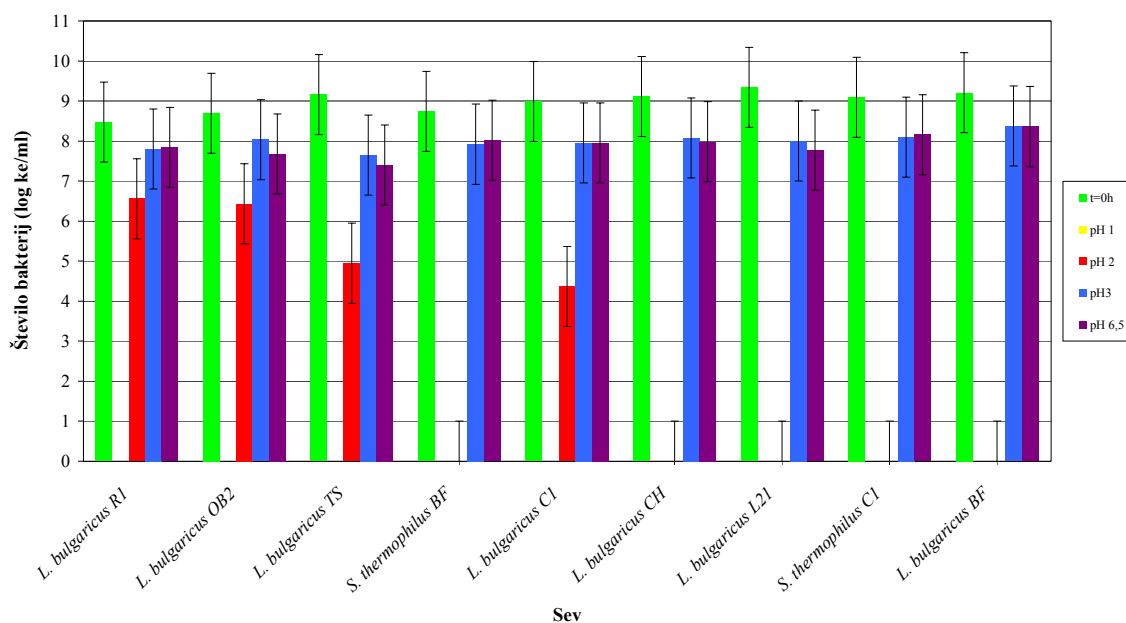
Probiotični izdelek	<i>L.bulgaricus</i> BF (log ke/g izdelka)	<i>S.thermophilus</i> BF (log ke/g izdelka)
Pripravek BF	6,27	8,44
Pripravek BF+ pektin	6,17	8,35
Biotorin BF	6,10	7,99

Število bakterij seva *L. bulgaricus* BF v izdelkih je bilo v skladu z številom, ki ga navajajo deklaracije izdelkov in je znašalo okoli 6 log ke/g izdelka. Število bakterij seva *Streptococcus thermophilus* BF v izdelkih je bilo precej višje in je znašalo okoli 8 log ke/g izdelka, vendar te vrste bakterij ni bilo navedene v deklaracijah izdelkov. Začetno število bakterij obeh sevov v liofiliziranih izdelkih je bilo v skladu s priporočili prehranskih strokovnjakov, ki navajajo vsaj  $10^6$  ke/g izdelka (Saarela in sod., 2000).

### 4.2 PREŽIVETJE TESTNIH SEVOV V SIMULIRANIH PREBAVNIH SOKOVIH

Osnovni podatki in rezultati preživetja testnih sevov v simuliranih prebavnih sokovih so prikazani na slikah 1-3 in prilogah A1-A6.

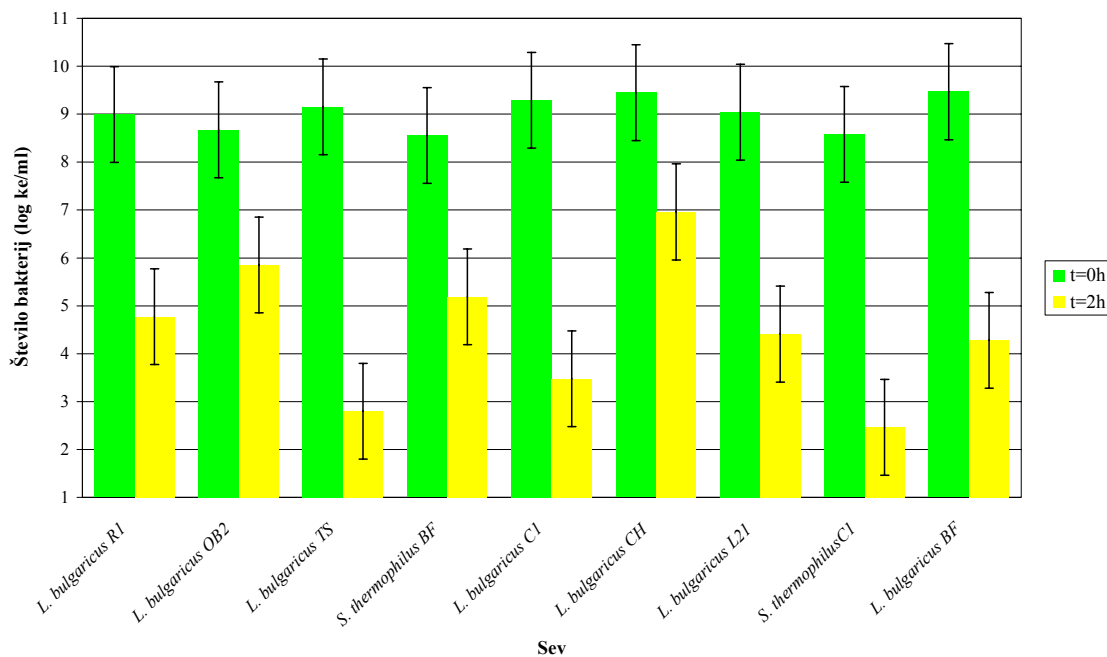




**Slika 1:** Število bakterij testnih sevov v 18-urni kulturi in po 20-minutni izpostavitvi simuliranemu želodčnemu soku z različnimi vrednostmi pH

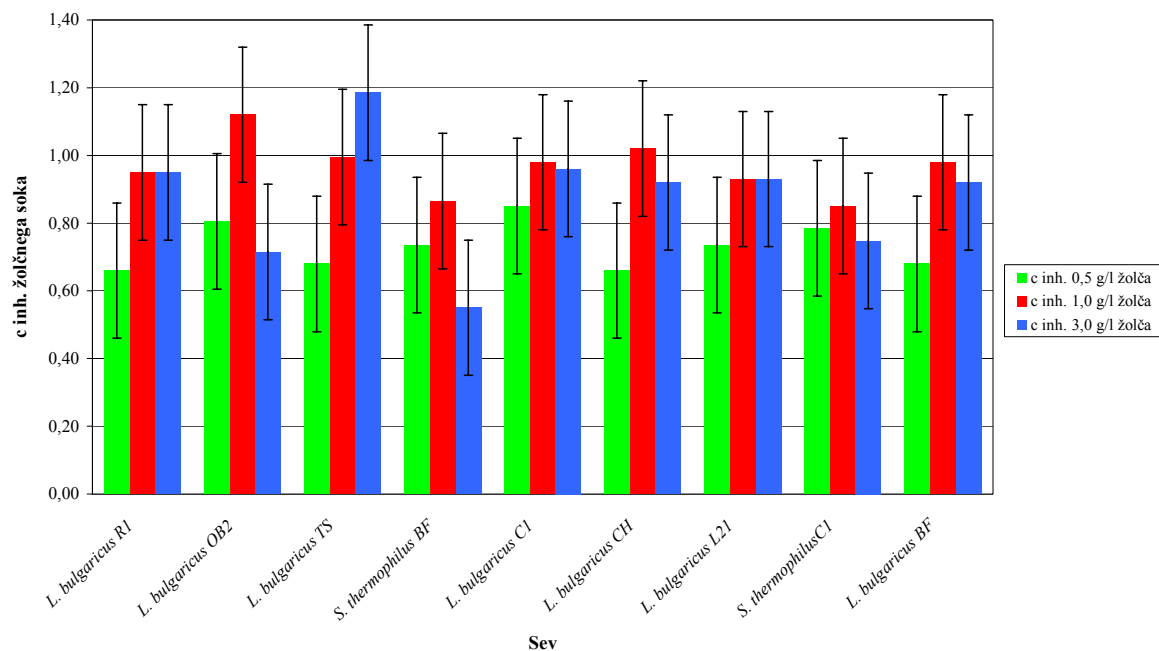
Slika 1 prikazuje začetno število testnega seva (ke/ml) in njihovo število po 20-minutnem tretiranju s simuliranim želodčnim sokom različnih vrednosti pH (2, 3 in 6,5). Po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 1 je število preživelih bakterij pri vseh sevih padlo pod mejo detekcije ( $10^3$  ke/ml). Po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 2 so delno preživele le sevi *L. bulgaricus* R1, *L. bulgaricus* OB2, *L. bulgaricus* TS in *L. bulgaricus* C1. Najbolje so preživele bakterije seva *L. bulgaricus* R1, pri katerem je število padlo za 1,9 log enoto/ml, pri drugih treh sevih, ki smo jih uspeli kvantificirati po tretmaju, pa za 2,26, 4,21 oziroma 4,62 log enote/ml. Najbolj se je zmanjšalo število ke pri sevu *L. bulgaricus* C1, in sicer za 4,72 log/ml. Bakterije vrste *S. thermophilus* v simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH 2 niso preživele v takšnem številu, da bi jih lahko detektirali. V simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH 3 pa so prav vsi sevi, tako vrste *L. bulgaricus* kot vrste *S. thermophilus*, preživele enako dobro kot v tistem z vrednostjo 6,5. Zmanjšanje glede na izhodiščno število (za 0,5 do 1,4 log ke/ml) verjetno lahko pripišemo vplivu pepsina. Najbolje je preživel sev *L. bulgaricus* R1, saj je število ke/ml padlo za okoli 0,5 log enote, najslabše pa sev *L. bulgaricus* L21, pri katerem je število padlo za 1,4 log /ml. Pri sevih *L. bulgaricus* OB2, *L. bulgaricus* TS, *L. bulgaricus*

CH in *L. bulgaricus* L21 smo opazili, da je število bakterij po tretiranju z želodčnim sokom vrednosti pH 3 višje za okoli 0,2 log/ml, v primerjavi s številom pri vrednosti pH 6,5, vendar lahko to odstopanje pripišemo analitični napaki. V celoti gledano sev *L. bulgaricus* R1 najboljše preživi v simuliranih pogojih želodca.



**Slika 2:** Število bakterij testnih sevov v 18-urni kulturi in po 2-urni izpostavitvi simuliranemu črevesnemu soku

Slika 2 prikazuje število ke/ml testnih sevov (v log vrednostih) pred in po 2-urnem tretiranju s simuliranim črevesnim sokom. Rezultati kažejo, da je od vseh sevov simulirane pogoje črevesja najboljše preživel sev *L. bulgaricus* CH, saj je njegovo število padlo za 2,49 log enote, prav tako dobro pa je preživel tudi sev *L. bulgaricus* OB2, saj je začetno število bakterij padlo za 2,38 log/ml. Najslabše sta preživela sev *L. bulgaricus* TS in *S. thermophilus* C1, katerih začetno število je padlo za 6,36 log/ml, oziroma 6,12 log/ml. Pri ostalih sevih se je začetno število znižalo za okoli 3,5 log/ml. Med obema sevoma *S. thermophilus* smo opazili precejšnjo razliko v preživetju, saj je začetno število pri sevu *S. thermophilus* C1 padlo za več kot 6 log enot, pri sevu *S. thermophilus* BF pa le za približno 3,5 log enot.

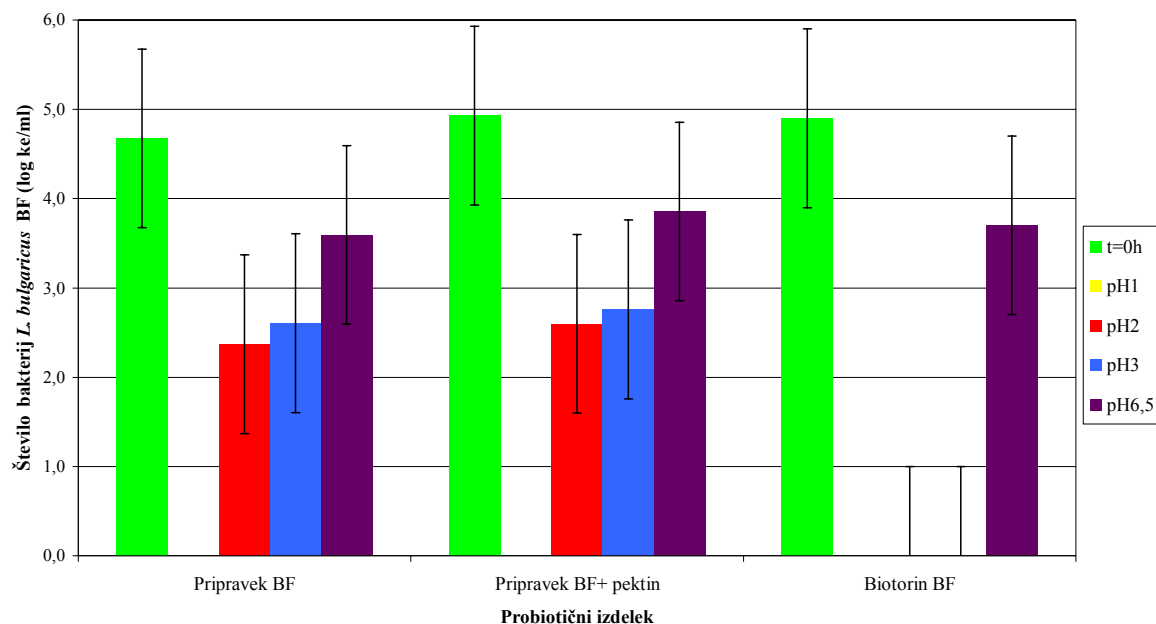


**Slika 3:** Vrednosti koeficienta inhibicije testnih sevov po 8-urni izpostavitvi simuliranemu žolčnemu soku

Slika 3 prikazuje vrednosti koeficienta inhibicije testnih sevov po izpostavitvi simuliranemu žolčnemu soku s koncentracijami žolča 0,5 g/l, 1,0 g/l in 3,0 g/l. Nižja vrednost koeficienta pomeni boljšo toleranco bakterij za žolčni sok, vrednosti blizu 1 pa pomenijo, da je bila rast popolnoma inhibirana. Najbolj odporni probiotični sevi imajo koeficient inhibicije manjši od 0,4. Nobeden od testiranih sevov v naši raziskavi ni imel koeficienta inhibicije manjšega od 0,4 kar pomeni, da so bolj ali manj občutljivi za žolč. Najmanj občutljiva za simuliran žolčni sok s koncentracijo žolča 0,5 g/l sta bila seva *L. bulgaricus* R1 in *L. bulgaricus* CH (koeficient inhibicije 0,66), in s podobno vrednostjo seva *L. bulgaricus* TS in *L. bulgaricus* BF (koeficient inhibicije 0,68). Koncentracija žolča 1,0 g/l pa je že zadostovala za inhibicijo rasti vseh sevov, z izjemo *S. thermophilus* BF in *S. thermophilus* C1. Rezultati kažejo, da sta seva vrste *S. thermophilus* manj občutljiva za žolčni sok kot sevi vrste *L. bulgaricus*.

#### 4.3 PREŽIVETJE TESTNIH SEVOV V LIOFILIZIRANIH IZDELKIH V SIMULIRANIH PREBAVNIH SOKOVIH

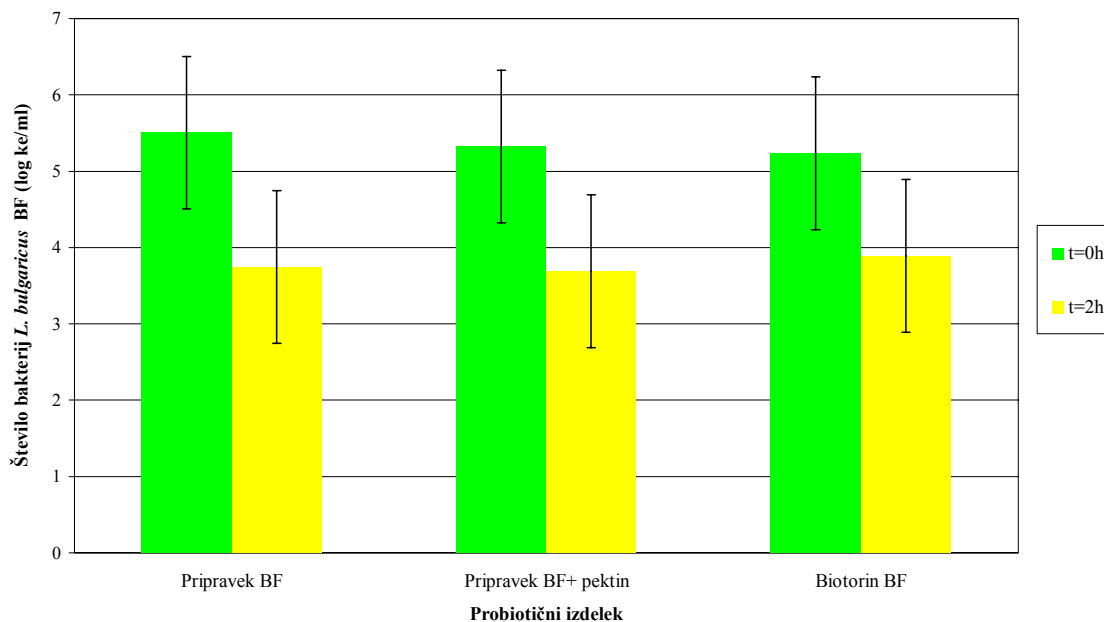
Rezultati preživetja sevov *L. bulgaricus* BF in *S. thermophilus* BF v liofiliziranih izdelkih so prikazani na slikah 4 – 6 in v prilogah B1-B5.



**Slika 4:** Število bakterij seva *L. bulgaricus* BF v liofiliziranih izdelkih in po 20-minutni izpostavitvi izdelka s sevom simuliranemu želodčnemu soku z različnimi vrednostmi pH.

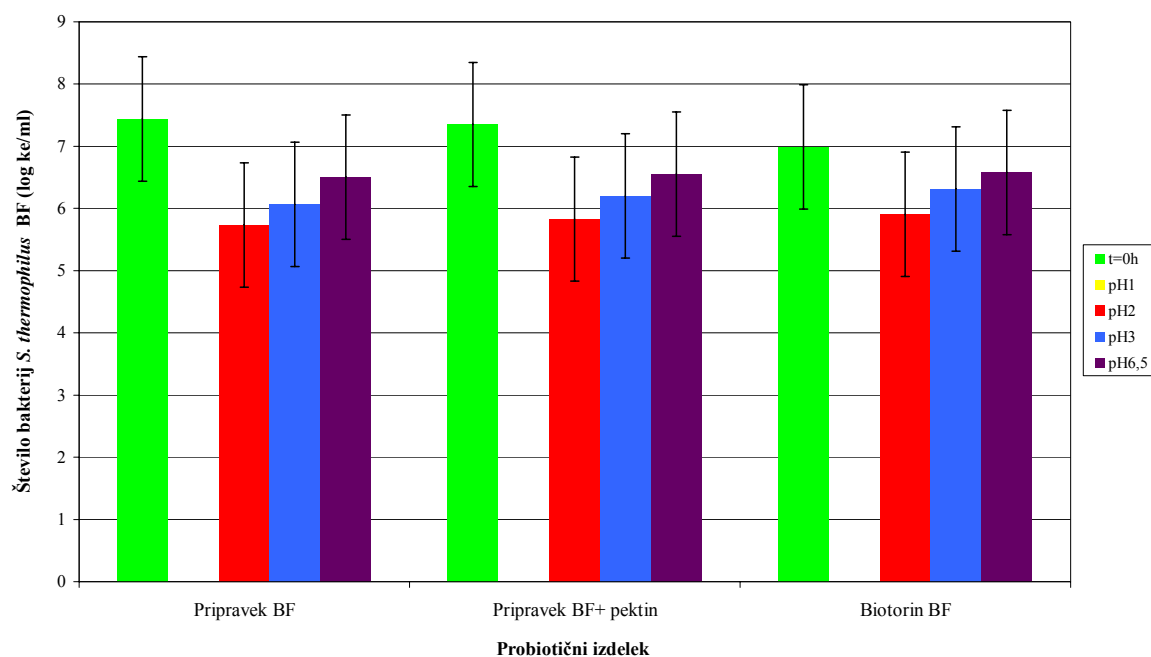
Slika 4 prikazuje začetno število testnega seva *L. bulgaricus* BF v izdelku ter število po 20-minutnem tretiranju izdelka s simuliranim želodčnim sokom različnih vrednosti pH (1, 2, 3 in 6,5). Rezultati kažejo, da je bilo izhodiščno število bakterij v kapsulah BF brez dodatka, BF z dodatkom pektina in Biotorin BF precej nizko, saj ni preseglo 5 log ke/ml, kar ustreza 6 log ke/g izdelka. V simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH 1 niso preživele bakterije iz nobenega izdelka. V simuliranem želodčnem soku z vrednostmi pH 2 in 3 so preživeli sevi v izdelkih BF brez dodatka in v izdelkih BF z dodatkom pektina. Najslabše so preživele bakterije iz izdelka Biotorin BF. Na gojišču smo sicer opazili komaj vidne drobne kolonije, ki pa jih niti ni bilo mogoče šteti. Najbolje so bakterije iz vseh treh izdelkov preživele v simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH 6,5, kjer je njihovo število padlo za 1 log ke/ml. Liofilizirane bakterije seva *L. bulgaricus* BF so v kombinaciji

s sestavinami pripravka v simuliranih pogojih želodca preživele, vendar je njihovo število padlo pod mejo detekcije ( $10^3$  ke/ml).



**Slika 5:** Število bakterij seva *L. bulgaricus* BF v liofiliziranih izdelkih in po 2-urni izpostavitvi izdelka s sevom simuliranemu črevesnemu soku

Slika 5 prikazuje število bakterij seva *L. bulgaricus* BF v izdelkih pred in po tretiranju s simuliranim črevesnim sokom. Začetno število bakterij v kapsuli je tudi v tem primeru pri vseh izdelkih precej nizko, saj je nekoliko presegló koncentracijo 5 log ke/ml, kar odговarja 6 log ke/g izdelka. Po tretiranju pripravka s simuliranim črevesnim sokom je začetno število laktobacilov po 2 h v vseh treh izdelkih padlo za okoli 1,5 log ke/ml. Preživetje seva *L. bulgaricus* BF, vključenega v izdelek, je bilo precej boljše od preživetja seva v svežih kulturah, pri katerih je začetno število po tretiranju s simuliranim črevesnim sokom padlo kar za 5 log ke/ml.



**Slika 6:** Število bakterij seva *S. thermophilus* BF v liofiliziranih izdelkih in po 8-urni izpostavitvi izdelka s sevom simuliranemu želodčnemu soku z različnimi vrednostmi pH

Slika 6 prikazuje število bakterij seva *S. thermophilus* BF, vključenega v izdelek, pred in po 20-minutnem tretiranju s simuliranim želodčnim sokom vrednosti pH 1, 2, 3 in 6,5. Po tretiranju vsebine kapsule z želodčnim sokom z vrednostjo pH 1 niso preživele bakterije iz nobenega izdelka. Začetno število bakterij je bilo primerno, saj je znašalo okoli 7,3 log ke/ml, kar ustreza 8,3 log ke/g izdelka. Po tretiranju vsebine kapsule z želodčnim sokom vrednosti pH 2, 3 in 6,5 je sev *S. thermophilus* BF najboljše preživel v izdelku Biotorin BF, saj je začetno število pri vrednosti pH 2 padlo za 1,1 log/ml, pri pH 3 za 0,7 log/ml in pH 6,5 za 0,4 log/ml. Najslabše je preživel sev iz izdelka BF, saj je število po tretiranju z želodčnim sokom vrednosti pH 2 padlo za 1,7 log/ml, pri pH 3 za 1,4 log/ml in pri pH 6,5 za 0,9 log/ml. Medtem ko noben od testnih sevov *S. thermophilus* (BF in C1) iz sveže kulture ni preživel v želodčnem soku z vrednostjo pH 2, pa je sev *S. thermophilus* BF v izdelkih bolje preživel, saj se je njegovo število v različnih izdelkih zmanjšalo le za 1,1 – 1,7 log enot. V želodčnem soku z vrednostmi pH 3 in 6,5 razlike med preživetjem *S. thermophilus* iz čistih kultur ali iz izdelka niso bile tako očitne.

Pri ugotavljanju preživetja seva *S. thermophilus* BF vseh treh izdelkov v simuliranem črevesnem soku so na gojiščih zrasle zelo drobne kolonije, za katere smo predvidevali, da so sicer ohranile viabilnost, vendar so tako poškodovane, da niso bile več sposobne normalnega razmnoževanja in rasti. Ker jih tudi ni bilo mogoče prešteti, jih nismo upoštevali pri podajanju rezultatov.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Ugotavljanje števila bakterij v probiotičnih izdelkih

Definicija probiotikov, podana s strani organizacij FAO in WHO, ki velja danes za najbolj splošno sprejeto poudarja, da morajo biti probiotiki zaužiti v zadostni količini, da lahko zagotovijo pričakovane funkcionalne učinke. Kljub temu si strokovnjaki in znanstveniki s področja probiotikov danes niso enotni, kolikšna naj bi bila ta najmanjša predpisana in predvsem zadostna količina probiotikov v izdelkih. Kriterij, ki ga je zasnovalo združenje »The Fermented Milks and Lactic Acid Beverages Association«, navaja kot priporočeno minimalno koncentracijo za sveže izdelke vrednosti, ki naj ne bodo nižje od  $10^7$  ke živih probiotičnih bakterij na g oziroma ml izdelka, medtem ko organizaciji FAO in WHO navajata koncentracijo  $10^6$  probiotičnih bakterij na g oz. ml izdelka (FAO/WHO, 2002). Rezultati mnogih raziskav kažejo, da število bakterij pade med tehnološkimi procesi izdelovanja in med shranjevanjem probiotičnih izdelkov, kot tudi med prehodom skozi zgornji in spodnji del prebavnega trakta, kjer so bakterije podvržene kislemu okolju želodca, žolčnim solem in različnim prebavnim encimom (Gueimonde in sod., 2004; Fasoli in sod., 2003; Saarela in sod., 2000).

Farnworth (2008) poudarja, da bi morali proizvajalci probiotičnih izdelkov na embalaži med ostalimi podatki navesti tudi število živih probiotičnih bakterij, ki se nahajajo v izdelku in uporabljeno metodologijo, ki to število potrjuje. Med drugim tudi ugotavlja, da se na tržišču pojavlja veliko izdelkov s pomanjkljivimi deklaracijami, pri katerih bodisi ni podatkov o vrsti bakterij ali pa imena teh niso pravilno navedena. Prav tako ni zagotovila, da so te probiotične bakterije žive.

Ali so bakterije v izdelkih žive ali mrtve, pa ni preprosto vprašanje. V laboratorijskih pogojih celice lahko postanejo nekultivabilne, vendar imajo še vedno izražene nekatere aktivnosti in lastnosti, ki so značilne za žive celice (Lahtinen in sod., 2006). Ta pojav je lahko posledica pomanjkanja primernih rastnih pogojev ali pa subletalnih poškodb celic, nekateri strokovnjaki pa zatrjujejo, da takšno stanje nastopi zaradi stresnih okoljskih pogojev, ki spremenijo mehanizem celičnega preživetja (Lahtinen in sod., 2008). Bunthof



in Abee (2002) pa v svoji raziskavi navajata, da probiotične bakterijske celice, ki so žive vendar nekultivabilne, prav tako lahko pripomorejo k zagotavljanju nekaterih zdravstvenih učinkov kot so razgradnja glukoze, asimilacija holesterola, proizvodnja protibakterijskih in antioksidativnih snovi.

Pri pregledu deklaracij naših testiranih izdelkov smo ugotovili, da je bilo ime *L. bulgaricus* pravilno navedeno, število bakterij v izdelkih BF, BF z dodatkom pektina in Biotorin BF pa je bilo v skladu s številom v deklaraciji, ki navaja  $10^6$  ke na g izdelka. Ugotovili smo, da v deklaraciji ni bilo navedenih bakterij vrste *S. thermophilus*, kljub temu pa je bilo v vseh treh izdelkih prisotno visoko število bakterij te vrste, in sicer okoli  $10^8$  ke na g izdelka.

Lahtinen in sodelavci (2005) v svoji raziskavi ugotavljajo, da se v probiotičnih izdelkih med shranjevanjem lahko razvijejo tudi speče (ang. »dormant«) bakterijske celice, ki so metabolno neaktivne, ampak imajo nepoškodovano celično membrano in v določenih pogojih lahko postanejo kultivabilne. V naši raziskavi smo po tretiranju izdelka Biotorin BF s simuliranim želodčnim sokom vrednosti pH 2 in 3 opazili, da so po nacepljanju vzorcev na hranljivo gojišče zrasle komaj opazne kolonije nepravilnih oblik, ki jih ni bilo mogoče šteti. Sklepali smo, da je to posledica poškodb celic, ki niso popolnoma izgubile sposobnosti rasti in razmnoževanja, ampak samo delno.

Alander in sodelavci (1999) so poudarili, da je pomembno vsakodnevno uživanje probiotičnih izdelkov, saj naj bi po prekinitvi uživanja število probiotičnih bakterij, zlasti tistih, ki ne izvirajo iz prebavil, hitro padlo. V deklaraciji izdelkov, ki smo jih preiskovali, ni bilo navedenega priporočenega dnevnega odmerka, ki naj bi zadostoval za zagotavljanje ugodnih učinkov.

### **5.1.2 Preživetje probiotičnih bakterij v simuliranem želodčnem soku**

Osnovna funkcija želodca je uničenje in inaktivacija patogenih mikroorganizmov, zaužitih s hrano in vodo ter s tem preprečevanje njihovega vstopa v črevesje. Pri tem igra pomembno vlogo želodčna kislina (HCl), ki jo izločajo parietalne celice želodčnih žlez. Želodčna kislina povečuje absorpcijo zaužitega kalcija in železa in omogoča aktivacijo neaktivnega pepsinogena v aktiven pepsin oziroma encim, ki sodeluje pri delni razgradnji

proteinov. Želodčne žleze vsak dan izločijo 1-2 l želodčnega soka, ki vsebuje 5,475-5,840 mg HCl/l soka in ima nerazredčen vrednost pH okoli 1 (Smith, 2003).

Raziskava, ki so jo opravili Haller in sodelavci (2001), je pokazala, da le redki sevi probiotičnih bakterij preživijo vrednost pH 1,5 v želodcu. Pri bakterijah, ki so to vrednost pH preživele, je začetno število padlo iz 8-9 log ke/ml želodčnega soka na okoli 4 log ke/ml. Nekatere bakterije, naprimer predstavnice vrste *L. johnsonii*, imajo povečano toleranco za želodčni sok. V naši raziskavi v želodčnem soku z vrednostjo pH 1 niso preživele niti bakterije vrste *L. bulgaricus* niti bakterije vrste *S. thermophilus*, ki smo jih testirali v obliki svežih kultur in v liofilizirani obliki, kot sestavine treh izdelkov.

Vstop hrane v želodec vodi v postopno zviševanje vrednosti pH v želodcu. Želodčni sok po obroku po mnenju nekaterih raziskovalcev pri mladih ljudeh (21-35 let) doseže vrednost pH 6,6, pri starejših ljudeh (65-83 let) pa vrednost pH 6,2 (Smith, 2003). Zato smo v naši raziskavi preživetje probiotičnih sevov testirali tudi pri višjih vrednostih pH želodčnega soka kot so 2, 3 in 6,5. Ugotovili smo, da so pri testiranju bakterij iz svežih kultur v želodčnem soku z vrednostjo pH 2 preživeli le štiri sevi bakterij vrste *L. bulgaricus*, katerih začetno število je padlo za okoli 2-5 log enot. Sevi bakterij vrste *S. thermophilus* pri vrednosti pH 2 niso preživeli. Bakterije iz izdelkov/kapsul so pokazale mnogo boljše odpornost proti želodčnemu soku z vrednostjo pH 2 in 3 kot bakterije iz svežih kultur. Bakterije iz kapsul so bile seveda resuspendirane v želodčnem soku skupaj z matriksom oz. sestavinami polnila izdelka. Pri vrednosti pH 2 je število liofiliziranih bakterij vrste *L. bulgaricus* padlo za okoli 2,5 log enoti, medtem ko pri vrsti bakterij *S. thermophilus* za okoli 1,2 log enote. Obe vrsti bakterij sta dobro preživeli pogoje tudi pri vrednosti pH 3, kjer je začetno število bakterij padlo za okoli 1 log enoto.

O podobnih rezultatih sta poročala tudi Picot in Lacroix (2004), ki sta v raziskavi primerjala preživetje probiotičnih bakterij svežih kultur in liofiliziranih bakterij, mobiliziranih na sirotkinih proteinih. Ugotovila sta, da slednje bolje preživijo v želodčnem soku različnih vrednosti pH, ki vsebuje encima pepsin in pankreatin. Po 60 min je število bakterij vrste *B. breve* iz sveže kulture iz 8 log ke/ml enot padlo za 6 log ke/ml, medtem ko je število liofiliziranih in hkrati mobiliziranih bakterij padlo le za 3 log enote.

Rezultati raziskave, ki sta jo opravila Vinderola in Reinheimer (2003) so pokazali, da so mlečnokislinske bakterije iz običajnih starterskih kultur mnogo manj odporne proti želodčnemu soku kot probiotične bakterije intestinalnega izvora. Pri vrednosti pH 2 je začetno število bakterij vrst *L. bulgaricus* in *S. thermophilus* padlo za 6 log ke/ml. Pri vrednosti pH 3 pa je najbolj padlo število bakterij *S. thermophilus*, in sicer za okoli 5 log ke/ml, medtem ko je pri vrsti bakterij *L. bulgaricus* število bakterij padlo za okoli 4 log enote. Kot najbolj odporna vrsta bakterij so se izkazale bakterije vrste *L. acidophilus*, katerih začetno število je pri vrednosti pH 2 padlo za 3,4-5 log enot, pri vrednosti pH 3 pa za 0,7-3,3 log enote.

Na vrednost pH želodčnega soka pomembno vpliva tudi agregatno stanje zaužite hrane (tekoče, trdno) pa tudi kemijska zgradba zaužite hrane. Tekoča hrana in voda se iz želodca izločita mnogo hitreje kot trdna hrana, ki potrebuje časovno daljšo razgradnjo. Posledično so tudi bakterije, zaužite s tekočo hrano in vodo, v krajšem časovnem stiku z želodčno kislino in imajo večjo možnost preživetja in prehoda v črevesje. Obrok z visoko vsebnostjo maščob, nizko vrednostjo pH, visoko viskoznostjo in visoko kalorično vrednostjo povzroča počasno praznjenje želodca in počasno zviševanje vrednosti pH želodčnega soka. Tako hitrost praznjenja želodca pomembno vpliva na preživetje bakterij, zaužitih s hrano (Smith, 2003). V naši raziskavi teh dejavnikov nismo mogli simulirati, zato bi se lahko rezultati analize *in vivo* bistveno razlikovali od naših.

### 5.1.3 Preživetje probiotičnih bakterij v simuliranem žolčnem soku

Pri prehodu probiotičnih bakterij skozi intestinalni trakt je potrebno upoštevati tudi dejstvo, da jetra vsak dan izločijo nekaj več kot liter žolča. Gre za rumeno-zeleno vodno raztopino organskih in anorganskih snovi, katere glavne sestavine so žolčne soli, holesterol, fosfolipidi in barvilo biliverdin. Žolč pospešuje prebavo in sodeluje pri emulzifikaciji in raztapljanju maščob. Na bakterije vpliva tako, da poškoduje fosfolipide in proteine celične membrane in tako poruši celično ravnovesje (Begley in sod., 2005).

Polovico vseh organskih snovi v žolču predstavljajo žolčne kisline. Njihova sinteza poteka v jetrih iz holesterola v prisotnosti različnih encimov. Pred izločanjem poteka njihova konjugacija z glicinom ali taurinom, lahko pa so konjugirane tudi z drugimi

aminokislinami, vendar te pogosto hidrolizira karboksi-peptidaza pankreasa. Razmerje med glikokonjugati in taurokonjugati v humanem žolču je ponavadi 3:1. Konjugacija žolčnih kislin je pomembna, saj v tej obliki popolnoma ionizirajo pri fiziološkem pH-ju in tako postanejo mnogo bolj topne kot nekonjugirane žolčne kisline. Prav zaradi tega dejstva konjugiranim žolčnim kislinam pravimo tudi žolčne soli (Begley in sod., 2005). Taranto in sod. (2006) so v raziskavi med drugim ugotovili, da so nekonjugirane žolčne kisline za nekatere vrste bakterij bolj toksične kot konjugirane žolčne kisline. Pri bakterijah vrste *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* in *L. casei* je nekonjugirana deoksiholična kislina povzročila 80-100 % inhibicijo rasti bakterij, medtem ko je konjugirana taurodeoksiholična kislina povzročila 62-87 % inhibicijo rasti bakterij.

Preživetje bakterij v žolčnem soku so preučevali tudi Burns in sodelavci (2008). V raziskavi so primerjali preživetje predstavnikov vrst, ki naseljujejo prebavni trakt ljudi (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* in *L. plantarum*), s preživetjem izolatov iz mlečnih izdelkov (*L. bulgaricus*, *L. lactis* in *L. helveticus*). Pri 0,5-odstotni koncentraciji žolča so iz druge skupine preživele le bakterije *L. lactis* in *L. helveticus*, medtem ko je bila rast bakterij *L. bulgaricus* popolnoma inhibirana tudi pri nižjih koncentracijah žolča (0,03%, 0,05%, 0,1%). O veliki občutljivosti bakterij vrste *L. bulgaricus* za žolč poroča tudi raziskava, ki so jo opravili Kociubinsky in sodelavci (1999). Podobne rezultate smo dobili tudi v našem preskusu, ki je pokazal izredno občutljivost bakterijskih sevov vrste *L. bulgaricus* na simuliran žolčni sok s koncentracijami žolča 0,5, 1,0 in 3,0 g/l. Najbolje sta v teh koncentracijah žolča preživela bakterijska seva vrste *S. thermophilus*, vendar tudi pri slednjih koeficient inhibicije ni padel pod 0,4, ki so ga Gibson in sod. (2005) postavili za kriterij za izbiro probiotičnih sevov, zato lahko sklepamo, da je tudi ta vrsta bakterij na žolč oziroma njegovo sestavo precej občutljiva.

#### **5.1.4 Preživetje probiotičnih bakterij v simuliranem črevesnem soku**

Wallace in sodelavci (2002) so opravili pomembno raziskavo, v kateri so ugotavljali vpliv mlečnokislinskih bakterij vrste *Lactobacillus* na epitelne celice črevesja pri človeku. Mlečnokislinske bakterije na slednje lahko vplivajo tako, da proizvajajo citokine, ki pa so sestavni del imunskega odziva v črevesju. Med citokine, ki jih črevesne epitelne celice proizvajajo, sodijo tudi interlevkini, transformirajoči rastni faktor beta, ki je močan

imunosupresor, ter tumorje nekrotizirajoči faktor alfa in beta, ki omogočata adhezijo bakterij in aktivirata delovanje levkocitov in makrofagov. Zaužite mlečnokislinske bakterije tako pomembno vplivajo na črevesno mikrofloro, zavirajo rast patogenih bakterij in imajo pomemben vpliv na zdravljenje nekaterih bolezni kot so ulcerativni kolitis, Chronova bolezen in različne oblike diarej. Organizaciji FAO in WHO kot eno pomembnejših karakteristik bakterij, ki jih uvrščamo med probiotike, navajata tudi odpornost proti žolčnim solem, ki so prisotne v črevesnem soku.

Nekatere vrste laktobacilov kot so *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, ki so naravno prisotne v črevesju človeka, naj bi bile po poročanju raziskave, ki sta jo opravila Vinderola in Reinheimer (2003), odpornejše proti želodčnemu soku in žolču ter žolčnim solem, hkrati pa naj bi imele tudi boljšo  $\beta$ -galaktozidazno aktivnost in sposobnost dekonjugacije žolčnih soli, kot vrste laktobacilov drugega izvora, kot sta *L. bulgaricus* in *L. lactis* in bakterije vrste *Streptococcus thermophilus*. Slednje v prisotnosti konjugiranih žolčnih soli sploh niso pokazale sposobnosti rasti. Podobne rezultate smo dobili tudi v našem eksperimentu, saj je začetno število bakterij vrste *Lactobacillus bulgaricus* iz sveže kulture, v črevesnem soku s koncentracijo žolčnih soli 1 g/l, pri dveh od sedmih sevov iz 9 log enot padlo na 7 oziroma 6 log ke/ml, pri kar štirih sevih pa je padlo celo pod 6 log ke/ml. V črevesnem soku sta slabo sposobnost preživetja pokazala tudi oba seva streptokokov, pri enem je začetno število bakterij padlo iz slabih 9 log ke/ml na 5 log ke/ml, pri drugem pa na 4 log ke/ml .

Bakterijski sev *L. bulgaricus* BF iz liofiliziranega izdelka je v primerjavi s sevom sveže kulture v simuliranem črevesnem soku, pri enakih pogojih, preživel bistveno bolje. Število bakterij seva BF iz sveže kulture je iz začetnih 9 log ke/ml padlo za 5 log enot, medtem ko je pri liofiliziranih bakterijah, glede na začetno število, padlo za okoli 1,5 log enot. Najmanj in sicer za 1,3 log enote je število padlo pri izdelku z dodatkom biotorina, pri izdelku z dodatkom pektina in izdelku brez drugih funkcionalnih dodatkov pa za 1,7 log enote. Liofilizirane bakterije seva *S. thermophilus* BF vseh treh izdelkov po tretiranju s simuliranim črevesnim sokom niso pokazale sposobnosti rasti na gojišču. Zasledili smo drobne, neštene kolonije.

## 5.2 SKLEPI

- V simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH 1 je število preživelih bakterij sveže kulture pri vseh sevih padlo pod mejo detekcije ( $10^3$  ke/ml), z vrednostjo pH 2 so preživele sevi bakterij vrste *Lactobacillus bulgaricus* iz svežih kultur (*L. bulgaricus* R1, *L. bulgaricus* OB2, *L. bulgaricus* TS in *L. bulgaricus* C1), medtem ko rasti sevov vrste *Streptococcus thermophilus* nismo zasledili. Najbolje so vsi sevi preživele v simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH 3 in 6,5, kjer je njihovo število iz začetnega padlo za okoli 1 log enoto.
- Tako sevi vrste *L. bulgaricus* kot tudi sevi vrste *S. thermophilus* iz svežih kultur so izredno občutljivi za žolč, saj pri nobenem sevu  $c_{inh}$  ni bil manjši od 0,4, kar po nekaterih virih velja kot kriterij za izbiro probiotičnih sevov.
- V simuliranem črevesnem soku sta najboljše preživela seva *L. bulgaricus* CH in *L. bulgaricus* OB2, katerih začetno število je padlo za 2 do 3 log enote, v enakih pogojih pa sta preživela tudi seva vrste *S. thermophilus*, vendar je začetno število padlo za 4 do 6,5 log enot.
- V vseh treh liofiliziranih izdelkih se je začetno število bakterij *L. bulgaricus* BF gibalo okoli  $10^6$  ke /g izdelka. Začetno število bakterij vrste *S. thermophilus* je znašalo nad  $10^8$  ke/g izdelka, vendar pa ime te vrste ni bilo navedeno na nobeni od deklaracij izdelka.
- Matriks liofiliziranega izdelka je delno zaščitil celice seva *L. bulgaricus* BF pred vplivom simuliranega črevesnega soka in želodčnega soka s pH 2, saj so celice preživele v višjem deležu od celic iz sveže kulture. Celice seva *S. thermophilus* BF so v liofiliziranih izdelkih bistveno bolj preživele v simuliranem želodčnem soku pri pH 2 in podobno pri ostalih vrednostih pH (pH 3 in pH 6,5) kot tiste iz sveže kulture. Po tretiranju bakterij v liofiliziranem izdelku s simuliranim črevesnim sokom na gojišču nismo zasledili števnih kolonij.

- Dodani pektin v liofiliziranem izdelku ni vplival na preživetje sevov *L. bulgaricus* BF in *S. thermophilus* BF v simuliranih prebavnih pogojih, biotorin pa je izboljšal preživetje *S. thermophilus* in poslabšal preživetje *L. bulgaricus* BF v simuliranem želodčnem soku.

## 6 POVZETEK

V raziskavi smo ugotavljali sposobnost preživetja bakterij vrst *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) in *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) iz zbirke proizvajalca prehranskih dopolnil ter iz treh liofiliziranih probiotičnih izdelkov v obliki kapsul, ki so vsebovali seve *L. bulgaricus* BF in *S. thermophilus* BF, v simuliranih pogojih prebavil. Analize smo izvajali v obdobju od februarja do maja 2008.

Ugotavljali smo, kako dobro posamezni sevi vrste *L. bulgaricus* (7 sevov) in vrste *S. thermophilus* (2 seva), nagojeni v sveži kulturi, preživijo v simuliranem želodčnem soku z različnimi vrednostmi pH in dodatkom pepsina, v simuliranem žolčnem soku z različnimi koncentracijami žolča in v simuliranem črevesnem soku z dodatkom pankreatina.

Ker smo želeli ugotoviti, ali bakterijski sevi iz liofiliziranih izdelkov v enakih pogojih preživijo bolje kot sevi iz svežih kultur, smo ugotavljali njihovo preživelost v simuliranem želodčnem in črevesnem soku. Ker so pomožne snovi v kapsuli povzročale preveliko motnost pri merjenju absorbance, v simuliranem žolčnem soku nismo mogli oceniti sposobnosti preživetja bakterij.

Testne seve smo v simuliranih prebavnih sokovih tretirali v takšnih časovnih intervalih, kot poteka v povprečju zadrževanje hrane v želodcu, dvanajsterniku in tankem črevesu človeka. Za ugotavljanje števila živih bakterij v simuliranem želodčnem in črevesnem soku smo uporabili konvencionalno metodo štetja kolonij na hranilnih selektivnih podlogah. Preživetje bakterij v simuliranem žolčnem soku smo ugotavljali z merjenjem absorbance pri 650 nm.

V simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH 1 je število testnih sevov laktobacilov in streptokokov padlo pod mejo detekcije, v soku z vrednostjo pH 2 pa so preživeli le štirje sevi vrste *L. bulgaricus* (*L. bulgaricus* R1, *L. bulgaricus* OB2, *L. bulgaricus* TS in *L. bulgaricus* C1) od sedmih testiranih, medtem ko pri dveh bakterijskih sevih vrste *S. thermophilus* rasti nismo zasledili. Bakterijski sevi obeh vrst so najboljše preživeli v simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH 3 in 6,5, saj je bilo pri vseh sevih po tretiranju prisotnih več kot  $10^6$  ke/ml soka.



Glede na podatke o preživelosti obeh vrst v simuliranem žolčnem soku lahko sklepamo, da so tako sevi *L. bulgaricus* kot *S. thermophilus*, ki smo jih testirali, izredno občutljivi že za nizke koncentracije žolča, kar je po mnenju strokovnjakov značilno za bakterije, ki niso intestinalnega izvora.

V simuliranem črevesnem soku sta najbolje preživela seva *L. bulgaricus* CH in *L. bulgaricus* OB2, katerih začetno število je padlo za 2 do 3 log enote, v enakih pogojih pa sta preživela tudi oba seva vrste *S. thermophilus*, vendar je začetno število padlo za 4 do 6,5 log enot.

Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko povzamemo, da od vseh devetih sevov, testiranih v naši raziskavi, v simuliranih pogojih prebavil najbolje preživi sev *L. bulgaricus* OB2, ki je bil izoliran iz domačega jogurta, narejenega iz ovčjega mleka.

Pri testiranju treh liofiliziranih izdelkov smo ugotovili, da je bilo število bakterij seva *L. bulgaricus* BF zelo blizu deklarirane koncentracije  $10^6$  ke/g. V primerjavi z bakterijami iz sveže kulture so liofilizirane bakterije v prehranskih dopolnilih (izdelkih) bolje preživele v simuliranem želodčnem soku z vrednostmi pH 2 in 3, pa tudi v simuliranem črevesnem soku.

V vseh treh izdelkih, ki smo jih testirali, smo ugotovili prisotnost vrste *S. thermophilus* ( $10^8$  ke/g), ki pa ni bil naveden v nobeni od deklaracij. Po informacijah, ki smo jih dobili od proizvajalca, naj bi šlo za sev *S. thermophilus* BF. Liofilizirane bakterije seva *S. thermophilus* BF so pokazale v izdelku boljšo sposobnost preživetja v simuliranem želodčnem soku z vrednotjo pH 2, medtem ko v simuliranem črevesnem soku na gojišču nismo zasledili števnih kolonij. Dodatek pektina in biotorina v izdelkih na preživetje liofiliziranih bakterij tega seva v simuliranih prebavnih sokovih ni imel bistvenega vpliva.

V splošnem velja, da naj bi probiotičen izdelek vseboval vsaj  $10^6$  ke/ml ali ke/g probiotičnih bakterij, dnevno pa naj bi za pozitivni učinek na zdravje, človek zaužil  $10^8$  do  $10^9$  ke probiotičnih bakterij. Organizaciji FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations) in WHO (World Health Organization) kot pomembni lastnosti pri prehodu

probiotičnih bakterij skozi prebavni trakt navajata odpornost bakterij na želodčno kislino in žolčne soli, ki so prisotne v žolču.

Glede na vse večje zanimanje potrošnikov za probiotične izdelke in njihove pozitivne učinke na zdravje bi bilo smiselno podati točne smernice, po katerih bi se probiotične bakterije ločile od ostalih, v prehrabeni industriji pomembnih bakterij in probiotični izdelki od izdelkov, ki so za zdravje potrošnikov glede na svojo sestavo prav tako pomembni. Na ta način bi na trgu izločili zavajanje potrošnika in naziv probiotičnega izdelka podelili resnično tistim, ki bi ustrezali znanstvenim kriterijem.

## 7 VIRI

Adolfsson O., Meydani S.N., Russel R.M. 2004. Yogurt and gut function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80: 245-256.

Alander M., Smet I., Nollet L., Verstraete W., Wright A., Mattila-Sandholm A. 1999. The effect of probiotic strains on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *International Journal of Food Microbiology*, 46: 71-79.

Anal A.K., Singh H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and target delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 240-251.

Begley M., Gahan C.G.M., Hill C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 625-651.

Brigidi P., Swennen E., Vitali B., Rossi M., Matteuzzi D. 2003. PCR detection of *Bifidobacterium* strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 203-209.

Bunthof C.J., Abee T. 2002. Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2934-2942.

Burns P., Vinderola G., Binetti A., Quiberoni A., Reyes-Gavilan C.G., Reinheimer J. 2008. Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *International Dairy Journal*, 18: 377-385.

Del Campo R., Bravo D., Canton R., Ruiz Garbajosa P., Garcia Albiach R., Montesi Libois A., Yuste F.J., Abraira V., Baquero F. 2005. Scarc evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 547-549.

Capela P., Hay T.K.C., Shah N.P. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39: 203-211.

Chandramouli V., Kailasapathy K., Peiris P., Jones M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56: 27-35.

Cukjati Trnovšek I. 2001. Tržni potencial pro-, pre- in sinbiotikov (nutricevtika, farmacevtika). V: Probiotiki in možnosti njihove uporabe: zbornik predavanj, Ljubljana, 8. marec 2001. Pavčič M., Vitezić N. (ur.). Ljubljana, Zbornica nutricionistov in dietetikov: 55-61.

Elli M., Callegari M.L., Ferrari S., Bessi E., Cattiveli D., Soldi S., Morelli L., Goupil Feuillerat N., Antoine J.M. 2006. Survival of yogurt bacteria in the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5113-5117.

FAO/WHO. 2002. Guidelines for evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for evaluation of probiotics in food. Rome, FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations.  
<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> (januar 2005): 8 str.

Farnworth E.R. 2008. The evidence to support health claims for probiotics. *Journal of Nutrition*, 138: 1250-1254.

Fasoli S., Marzotto M., Rizzoti L., Rossi F., Dellagio F., Torrini S. 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 59-70.

Fooks L.J., Fuller R., Gibson G.R., 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9: 53-61.

Gibson G. R., Rouzaud G., Brostoff J., Rayment N. 2005. Final technical report for FSA project ref G01022. An evaluation of probiotic effects in the human gut: microbial aspects. London, FSA- Food Standards Agency.

[http://www.foodbase.org.uk//admintools/reportdocuments/55\\_100\\_G01022.pdf](http://www.foodbase.org.uk//admintools/reportdocuments/55_100_G01022.pdf)(januar, 2008): 22 str.

Gueimonde M., Delgado S., Mayo B., Ruas-Masiedo P., Margolles A., Reyes-Gavilan G.C. 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. Food Research International, 37: 839-850.

Haller D., Colbus H., Gaenzle M.G., Scherenbacher P., Bode C., Hammes W.P. 2001. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and fermented food origin. Systematic and Applied Microbiology, 24: 218-226.

Holzapfel W.H., Schillinger U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. Food Research International, 35, 2/3: 109-116.

IDF standard 100B. 1991. Milk and milk products: Enumeration of microorganisms- Colony count technique at 30 °C. Brussels, International Dairy Federation: 3 str.

Iyer C., Kailasapathy K. 2004. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under *in vitro* acidic and bile salt conditions and in yogurt. Journal of Food Science, 70: 18-23.

Kociubinsky G., Perez P., de Antoni G. 1999. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal of Food Protection, 62: 905-912.

Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal, 13:3-13.

Lahtinen S.J., Anokoski H., Reinikainen J.P., Gueimonde M., Nurmi J., Ouwehand A.C., Salminen S.J. 2008. Degradation of 16s rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 693-698.

Lahtinen S.J., Ouwenhand C.A., Reinikainen P.J., Korpela J.M., Sandholm J., Salminen S.J. 2006. Intrinsic properties of so-called dormant probiotic bacteria, determined by flow cytometric viability assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5132-5134.

Lahtinen S.J., Gueimonde M., Ouwenhand C.A., Reinikainen P.J., Salminen S.J. 2005. Probiotic bifidobacteria may become dormant during storage. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1662-1663.

Marteau P., Minekus M., Havenaar R., Huis in't Veld J.H.J. 1996. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, 80: 1031-1037.

Mater D.D.G., Bretigny L., Firmesse O., Flores M.J., Mogenet A., Bresson J.L., Corthier G. 2005. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiology Letters*, 250: 185-187.

Palencia P.F., Lopez P., Corbi A.L., Pelaez C., Requena T. 2008. Probiotic strains: Survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research Technology*, 227: 1475-1484.

Pedrosa M.C., Bolner B.B., Goldin B.R., Barakat S., Dallal G.E., Russel R.M. 1995. Survival of yogurt- containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61: 353-359.

Picot A., Lacroix C. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14: 505-515.

Rogelj I. 1997. Fermentirani mlečni izdelki-probiotična hrana? V: Tehnologija, hrana, zdravje : knjiga del : vol.1 1. slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo. Bled, 21-25 april. Raspor P., Pitako D., Hočevar I. (ur.) Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih sodelavcev : 31-38.

Rogelj I., Perko B. 2003. Mikrobiologija mleka in mlečnih izdelkov. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 511-578.

Rogelj I. 2001. Probiotiki, prebiotiki in sinbiotiki. V: Probiotiki in možnosti njihove uporabe: Zbornik predavanj, Ljubljana, 8. marec 2001. Pavčič M., Vitezić N. (ur.). Ljubljana, Zbornica nutricionistov in dietetikov: 6-15.

Rogelj I., Bogovič Matijašič B. 2004. Probiotiki in varnost. V: Varnost živil. 22 Bitenčevi živilski dnevi, Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 181-189.

Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Mättö J., Mattila T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197-215.

Saarela M., Virkajäuri, Alakomi H.L., Mattila Sandholm T., Vaari A., Suomalainen T., Mättö J. 2005. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 1330-1339.

Santosa S., Farnworth E., Jones P. 2006. Probiotics and their potential health claims. *Nutrition Reviews*, 64, 6: 265-274.

Senok A.C., Ismaeel A.Y., Botta G.A. 2005. Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology Infection*, 11: 958-966.

Smith J.L. 2003. The role of gastric acid in preventing food and infection borne disease and how bacteria overcome acid conditions. *Journal of Food Protection*, 66: 1292-1303.

Siuta-Cruce P., Goulet J. 2001. Improving probiotic survival rates. *Food Technology*, 55: 36, 38-40, 42.

Sultana K., Godward G., Reyholds N., Arumugaswamy R., Peiris P., Kailasapathy K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 47-55.

Taranto M.P., Perez Martinez G., Font de Valdez G. 2006. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology*, 157: 720-725.

Vasiljevic T., Shah N. P. 2008. From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18: 714-728.

Vinderola C.G., Reinheimer J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36: 895-904.

Wallace T. D., Bradley S., Buckley N.D., Green-Johnson J.M. 2002. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection*, 66: 466-472.



## PRILOGE

Priloga A1: Povprečno število testnih sevov (log ke/ml) pred in po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom različnih vrednosti pH (log vrednosti predstavljajo povprečne rezultate dveh ponovitev testa)

Sev	T0	T0,SD	pH1	pH2	pH2,SD	pH3	pH3,SD	pH6,5	pH6,5SD
<i>L. bulgaricus</i> R1	8,47	0,03	< 3	6,56	0,74	7,80	0,34	7,84	0,35
<i>L. bulgaricus</i> OB2	8,69	0,08	< 3	6,43	n.p.	8,03	1,10	7,68	0,28
<i>L. bulgaricus</i> TS	9,16	0,17	< 3	4,95	0,06	7,65	0,66	7,40	0,28
<i>S. thermophilus</i> BF	8,74	0,05	< 3	< 3	n.p.	7,92	0,17	8,02	0,03
<i>L. bulgaricus</i> C1	8,99	0,18	< 3	4,37	0,04	7,95	0,18	7,95	0,33
<i>L. bulgaricus</i> CH	9,12	0,05	< 3	< 3	n.p.	8,08	0,05	7,98	0,28
<i>L. bulgaricus</i> L21	9,34	0,06	< 3	< 3	n.p.	8,00	0,00	7,77	0,10
<i>S. thermophilus</i> C1	9,10	0,08	< 3	< 3	n.p.	8,10	0,14	8,16	0,11
<i>L. bulgaricus</i> BF	9,21	0,13	< 3	< 3	n.p.	8,37	0,01	8,36	0,06

Legenda:

T0 začetno število bakterij v log ke/ml

pH1 število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 1

pH2 povprečno število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 2

pH3 število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 3

pH6,5 število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 6,5

SD standardna deviacija

n.p. ni podatka

Priloga A2: Razmerje med končnim in začetnim številom testnih sevov po tretiranju z želodčnim sokom različnih vrednosti pH (vrednosti predstavljajo povprečne rezultate dveh ponovitev testa)

Sev	$r_{pH1}$	$r_{pH2}$	$SD_{pH2}$	$r_{pH3}$	$SD_{pH3}$	$r_{pH6,5}$	$SD_{pH6,5}$
<i>L. bulgaricus</i> R1	$<10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-2}$	0,03	0,26	0,19	0,28	0,21
<i>L. bulgaricus</i> OB2	$<10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-3}$	n.p.	0,76	1,03	0,11	0,08
<i>L. bulgaricus</i> TS	$<10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-5}$	n.p.	0,07	0,08	0,02	0,01
<i>S. thermophilus</i> BF	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$	n.p.	0,17	0,08	0,20	0,04
<i>L. bulgaricus</i> C1	$<10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$	n.p.	0,11	0,08	0,13	0,12
<i>L. bulgaricus</i> CH	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$	n.p.	0,10	0,02	0,09	0,06
<i>L. bulgaricus</i> L21	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$	n.p.	0,05	0,01	0,03	0,00
<i>S. thermophilus</i> C1	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$	n.p.	0,08	0,01	0,12	0,01
<i>L. bulgaricus</i> BF	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$	n.p.	0,15	0,04	0,15	0,06

Legenda:

$r_{pH1}$  razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 1 in začetnim številom celic (ke/ml)

$r_{pH2}$  razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 2 in začetnim številom celic (ke/ml)

$r_{pH3}$  razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 3 in začetnim številom celic (ke/ml)

$r_{pH6,5}$  razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 6,5 in začetnim številom celic (ke/ml)

SD standardna deviacija

n.p. ni podatka

Priloga A3: Preživetje testnih sevov v simuliranem črevesnem soku (log vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)

sev	T0	SD	T2h	SD
<i>L. bulgaricus</i> R1	9,00	0,40	4,77	0,37
<i>L. bulgaricus</i> OB2	8,68	0,06	5,85	0,21
<i>L. bulgaricus</i> TS	9,16	0,46	2,80	0,44
<i>S. thermophilus</i> BF	8,56	0,09	5,19	0,14
<i>L. bulgaricus</i> C1	9,29	0,61	3,48	0,42
<i>L. bulgaricus</i> CH	9,45	0,51	6,96	0,04
<i>L. bulgaricus</i> L21	9,04	0,79	4,41	0,62
<i>S. thermophilus</i> C1	8,58	0,06	2,47	0,37
<i>L. bulgaricus</i> BF	9,47	0,40	4,28	0,04

Legenda:

T0 začetno število bakterij v log ke/ml

T2h število bakterij v log ke/ml po 2-urnem tretiranju s simuliranim črevesnim sokom

SD standardna deviacija

Priloga A4: Koeficienti inhibicije testnih sevov po izpostavitvi simuliranemu žolčnemu soku (vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)

sev/ $c_{inh.}$	$c_{inh. 1}$	SD	$c_{inh. 2}$	SD	$c_{inh. 3}$	SD
<i>L. bulgaricus</i> R1	0,66	0,13	0,95	0,01	0,95	0,07
<i>L. bulgaricus</i> OB2	0,81	0,23	1,12	0,18	0,72	0,28
<i>L. bulgaricus</i> TS	0,68	0,08	1,00	0,02	1,19	0,47
<i>S. thermophilus</i> BF	0,74	0,36	0,87	0,12	0,55	0,65
<i>L. bulgaricus</i> C1	0,85	0,03	0,98	0,03	0,96	0,06
<i>L. bulgaricus</i> CH	0,66	0,04	1,02	0,13	0,92	0,01
<i>L. bulgaricus</i> L21	0,74	0,01	0,93	0,11	0,93	0,04
<i>S. thermophilus</i> C1	0,79	0,06	0,85	0,16	0,75	0,32
<i>L. bulgaricus</i> BF	0,68	0,14	0,98	0,03	0,92	0,01

Legenda:

$c_{inh. 1}$  koeficient inhibicije (simuliran žolčni sok z 0,5 g/l žolčnih soli)

$c_{inh. 2}$  koeficient inhibicije (simuliran žolčni sok z 1,0 g/l žolčnih soli)

$c_{inh. 3}$  koeficient inhibicije (simuliran žolčni sok s 3,0 g/l žolčnih soli)

$c_{inh.} < 0,4$  bakterije so odporne proti žolčnim solem

SD standardna deviacija

Priloga A5: Izmerjene vrednosti  $A_{650}$  pred in po tretiranju sevov s simuliranim žolčnim sokom v prvem preskusu

sev	MRS		MRS + 0,5 g/l Oxgall		MRS + 1 g/l Oxgall		MRS + 3 g/l Oxgall	
	$A_0$	$A_8$	$A_0$	$A_8$	$A_0$	$A_8$	$A_0$	$A_8$
<i>L. bulgaricus</i> R1	0,323	0,809	0,285	0,407	0,316	0,335	0,380	0,427
<i>L. bulgaricus</i> OB2	0,328	0,395	0,264	0,266	0,294	0,277	0,348	0,380
<i>L. bulgaricus</i> TS	0,340	0,772	0,292	0,403	0,319	0,314	0,361	0,427
<i>S. thermophilus</i> BF	0,238	0,284	0,171	0,195	0,195	0,205	0,249	0,291
<i>L. bulgaricus</i> C1	0,448	1,154	0,386	0,481	0,415	0,442	0,458	0,517
<i>L. bulgaricus</i> CH	0,393	1,132	0,449	0,721	0,332	0,385	0,436	0,487
<i>L. bulgaricus</i> L21	0,345	0,794	0,306	0,422	0,331	0,327	0,379	0,422
<i>S. thermophilus</i> C1	0,219	0,242	0,151	0,157	0,177	0,183	0,271	0,306
<i>L. bulgaricus</i> BF	0,395	0,982	0,339	0,585	0,380	0,403	0,495	0,549

Legenda:

MRS + 0,5 g/l Oxgall tekoče gojišče MRS z dodanim dehidriranim žolčem (0,5 g/l)

MRS + 1 g/l Oxgall tekoče gojišče MRS z dodanim dehidriranim žolčem (1 g/l)

MRS + 3 g/l Oxgall tekoče gojišče MRS z dodanim dehidriranim žolčem (3 g/l)

$A_0$  absorbanca izmerjena pri 650 nm na začetku preskusa

$A_8$  absorbanca izmerjena pri 650 nm po 8h

Priloga A6: Izmerjene vrednosti  $A_{650}$  pred in po tretiranju sevov s simuliranim žolčnim sokom v drugem preskusu

sev	MRS		MRS + 0,5 g/l Oxgall		MRS + 1 g/l Oxgall		MRS + 3 g/l Oxgall	
	$A_0$	$A_8$	$A_0$	$A_8$	$A_0$	$A_8$	$A_0$	$A_8$
<i>L. bulgaricus</i> R1	0,394	0,900	0,310	0,526	0,340	0,369	0,987	0,986
<i>L. bulgaricus</i> OB2	0,352	0,524	0,271	0,333	0,280	0,282	0,677	0,693
<i>L. bulgaricus</i> TS	0,420	1,069	0,315	0,560	0,343	0,359	0,814	0,477
<i>S. thermophilus</i> BF	0,159	0,351	0,153	0,157	0,161	0,171	0,169	0,167
<i>L. bulgaricus</i> C1	0,464	1,157	0,375	0,491	0,387	0,389	0,848	0,849
<i>L. bulgaricus</i> CH	0,394	0,934	0,315	0,480	0,346	0,280	1,076	1,125
<i>L. bulgaricus</i> L21	0,477	1,012	0,353	0,507	0,356	0,440	0,777	0,802
<i>S. thermophilus</i> C1	0,140	0,423	0,270	0,184	0,143	0,156	0,142	0,150
<i>L. bulgaricus</i> BF	0,462	1,085	0,255	0,390	0,265	0,265	0,774	0,819

Legenda:

MRS + 0,5 g/l Oxgall tekoče gojišče MRS z dodanim dehidriranim žolčem (0,5 g/l)

MRS + 1 g/l Oxgall tekoče gojišče MRS z dodanim dehidriranim žolčem (1 g/l)

MRS + 3 g/l Oxgall tekoče gojišče MRS z dodanim dehidriranim žolčem (3 g/l)

$A_0$  absorbanca izmerjena pri 650 nm na začetku preskusa

$A_8$  absorbanca izmerjena pri 650 nm po 8h

Priloga B1: Preživetje seva *Lactobacillus bulgaricus* BF, vključenega v izdelek, v simuliranem želodčnem soku različnih vrednosti pH (log vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)

Probiotični izdelek	T0	T0 <sub>SD</sub>	pH <sub>1</sub>	pH <sub>1,SD</sub>	pH <sub>2</sub>	pH <sub>2,SD</sub>	pH <sub>3</sub>	pH <sub>3,SD</sub>	pH <sub>6,5</sub>	pH <sub>6,5,SD</sub>
Pripravek BF	4,7	0,1	<2	n.p.	2,4	0,01	2,6	0,04	3,6	0,11
Pripravek BF + pektin	4,9	0,7	<2	n.p.	2,6	0,01	2,8	0,04	3,9	0,15
Biotorin BF	4,9	0,5	<2	n.p.	<2	n.p.	<2	n.p.	3,7	0,70

Legenda:

T0 začetno število bakterij v log ke/ml

pH<sub>1</sub> število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 1

pH<sub>2</sub> število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 2

pH<sub>3</sub> število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 3

pH<sub>6,5</sub> število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 6,5

SD standardna deviacija

n.p. ni podatka

Priloga B2: Preživetje seva *Streptococcus thermophilus* BF, vključenega v izdelek, v simuliranem želodčnem soku različnih vrednosti pH (log vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)

Probiotični izdelek	T0	T0 <sub>SD</sub>	pH <sub>1</sub>	pH <sub>1,SD</sub>	pH <sub>2</sub>	pH <sub>2,SD</sub>	pH <sub>3</sub>	pH <sub>3,SD</sub>	pH <sub>6,5</sub>	pH <sub>6,5,SD</sub>
Pripravek BF	7,44	0,57	<2	n.p.	5,74	0,18	6,07	0,19	6,51	0,15
Pripravek BF + pektin	7,35	0,76	<2	n.p.	5,83	0,03	6,20	0,28	6,56	0,02
Biotorin BF	6,99	1,24	<2	n.p.	5,91	0,11	6,32	0,16	6,58	0,11

Legenda:

T0 začetno število bakterij v log ke/ml

pH<sub>1</sub> število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 1

pH<sub>2</sub> število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 2

pH<sub>3</sub> število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 3

pH<sub>6,5</sub> število bakterij v log ke/ml po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 6,5

SD standardna deviacija

n.p. ni podatka

Priloga B3: Preživetje seva *Lactobacillus bulgaricus* BF, vključenega v izdelek, v simuliranem črevesnem soku (log vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh ponovitev testa)

Probiotični izdelek	T0	SD	T2h	SD
Pripravek BF	5,51	0,76	3,75	0,57
Pripravek BF+ pektin	5,33	0,60	3,69	0,72
Biotorin BF	5,24	0,47	3,89	1,10

Legenda:

T0 začetno število bakterij v log ke/ml

T2h število bakterij v log ke/ml po 2-urnem tretiranju s simuliranim črevesnim sokom

SD standardna deviacija

Priloga B4: Razmerje med končnim in začetnim številom seva *L. bulgaricus* BF, vključenega v izdelek, po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom različnih vrednosti pH

Probiotični izdelek	r <sub>pH1</sub>	r <sub>pH1, SD</sub>	r <sub>pH2</sub>	r <sub>pH2, SD</sub>	r <sub>pH3</sub>	r <sub>pH3, SD</sub>	r <sub>pH6,5</sub>	r <sub>pH6,5, SD</sub>
Pripravek BF	<10 <sup>-3</sup>	n.p.	5·10 <sup>-3</sup>	n.p.	8·10 <sup>-3</sup>	n.p.	0,08	0,04
Pripravek BF+ pektin	<10 <sup>-3</sup>	n.p.	5·10 <sup>-3</sup>	n.p.	8·10 <sup>-3</sup>	n.p.	0,11	0,11
Biotorin BF	<10 <sup>-3</sup>	n.p.	<10 <sup>-3</sup>	n.p.	<10 <sup>-3</sup>	n.p.	0,06	0,01

Legenda:

r<sub>pH1</sub> razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 1 in začetnim številom celic (ke/ml)

r<sub>pH2</sub> razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 2 in začetnim številom celic (ke/ml)

r<sub>pH3</sub> razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 3 in začetnim številom celic (ke/ml)

r<sub>pH6,5</sub> razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 6,5 in začetnim številom celic (ke/ml)

SD standardna deviacija

n.p. ni podatka

Priloga B5: Razmerje med končnim in začetnim številom seva *S. thermophilus* BF, vključenega v izdelek, po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom različnih vrednosti pH

Probiotični izdelek	$r_{pH1}$	$r_{pH1, SD}$	$r_{pH2}$	$r_{pH2, SD}$	$r_{pH3}$	$r_{pH3, SD}$	$r_{pH6,5}$	$r_{pH6,5, SD}$
Pripravek BF	$<10^{-6}$	n.p.	0,04	0,04	0,07	0,06	0,20	0,36
Pripravek BF + pektin	$<10^{-6}$	n.p.	0,05	0,09	0,09	0,08	0,30	0,84
Biotorin BF	$<10^{-5}$	n.p.	0,20	0,23	0,63	0,37	1,25	0,69

Legenda:

- $r_{pH1}$  razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 1 in začetnim številom celic (ke/ml)
- $r_{pH2}$  razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 2 in začetnim številom celic (ke/ml)
- $r_{pH3}$  razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 3 in začetnim številom celic (ke/ml)
- $r_{pH6,5}$  razmerje med številom celic (ke/ml) po tretiranju s simuliranim želodčnim sokom z vrednostjo pH 6,5 in začetnim številom celic (ke/ml)
- SD standardna deviacija
- n.p. ni podatka

## ZAHVALA