

WPŁYNIE LEPIEJ

Livingfood™

**BADANIA NAD OCENĄ JAKOŚCI
I BIOFUNKCJONALNOŚCIĄ
PRODUKTÓW PROBIOTYCZNYCH
FIRMY LIVING FOOD SP. Z O.O.**



Living Food Quality®

**BADANIA NAD OCENĄ JAKOŚCI
I
BIOFUNKCJONALNOŚCIĄ
PRODUKTÓW PROBIOTYCZNYCH
FIRMY
LIVING FOOD SP. Z O. O.**

**PRODUCENTA
PROBIOTYCZNYCH,
EKOLOGICZNYCH
PRODUKTÓW I SUPLEMENTÓW DIETY**

„Znaczące dzieła rodzą się zwykle z marzeń i ambicji. Do ich urzeczywistnienia potrzebne są jeszcze dwie rzeczy: wiara w sukces oraz zwykłe szczęście.”

(Prof. Włodzimierz Grajek)

Niniejsze opracowanie powstało przy współpracy z pracownikami naukowymi Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu – dr hab. Darii Szymanowskiej-Powałowskiej, prof. nadzw. z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności i dr hab. Joanny Kobus-Cisowskiej, prof. nadzw. z Katedry Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej.



SPIS TREŚCI

1. Wprowadzenie
2. Bakterie fermentacji mlekowej – ogólna charakterystyka
 - 2.1 Systematyka
 - 2.2 Metabolizm
 - 2.3 Charakterystyka bakterii fermentacji mlekowej, w tym szczepów bakterii wchodzących w skład produktów probiotycznych firmy Living Food Sp. z o.o.
 - 2.4 Wykorzystanie bakterii fermentacji mlekowej w przemyśle spożywczym
 - 2.4.1 Przemysł mleczarski
 - 2.4.2 Fermentowane surowce roślinne
 - 2.4.3 Fermentacja pieczywa
 - 2.5 Główne metabolity bakterii fermentacji mlekowej
 - 2.6 Preparaty probiotyczne
 - 2.7 Literatura
3. Wyniki badań jakości i biofunkcjonalności produktów probiotycznych
 - 3.1 Ocena jakości produktów probiotycznych
 - 3.1.1 Liczebność drobnoustrojów w naszych produktach
 - 3.1.2 Ocena makroskopowa kolonii bakterii probiotycznych
 - 3.1.3 Profil metabolitów drobnoustrojów probiotycznych obecnych w naszych produktach
 - 3.1.4 Aktywność antymikrobiologiczna drobnoustrojów i ich metabolitów obecnych w produktach względem mikroorganizmów wskaźnikowych
 - 3.1.5 Stabilność jakościowa produktów probiotycznych w czasie przechowywania
 - 3.2 Ocena biofunkcjonalności produktów probiotycznych
 - 3.2.1 Wpływ trawienia *in vitro* na liczebność drobnoustrojów probiotycznych obecnych w produktach
 - 3.2.2 Wpływ drobnoustrojów probiotycznych obecnych w produktach na prawidłowy mikrobiom jelitowy człowieka i mikrobiom w stanie dysbiozy
 - 3.2.3 Ocena zdolności adhezji drobnoustrojów probiotycznych obecnych w produktach do komórek nabłonka w modelu *in vitro* – badania na liniach komórkowych

1. WPROWADZENIE

Living Food – naszym celem jest dobre zdrowie konsumentów.

Firma Living Food Sp. z o.o. z siedzibą w Trzcielu została zarejestrowana 11 lutego 2010 roku i od początku swojej działalności specjalizuje się w produkcji żywności probiotycznej. Przedsiębiorstwo jest wpisane do rejestru zakładów podlegających urzędowej kontroli organów Państwowej Inspekcji Sanitarnej pod numerem 623/21/11/0404/15 jako: Zakład Produkcji Probiotycznych Ekologicznych Produktów Spożywczych LIVING FOOD SP. Z O.O. ul. Graniczna 15, 66-320 Trzciel.

Do tej pory firma wdrożyła kilkadziesiąt spożywczych preparatów probiotycznych i suplementów diety, a swoją produkcję zapoczątkowała asortymentem bezmlecznych koncentratów i napojów probiotycznych JOY DAY. Nasze najnowsze osiągnięcie to gama produktów funkcjonalnych otrzymanych w efekcie bioprocusów, w oparciu o zestaw szczepów probiotycznych, kwas alfa-ketoglutarowy (efekt biosyntezy mikrobiologicznej) i kompleks witaminowo - mineralny pochodzący z wyselekcjonowanych, przefermentowanych surowców roślinnych.

Firma Living Food Sp. z o.o. jest jedną z nielicznych w Unii Europejskiej, produkującą ekologiczne, probiotyczne produkty spożywcze i probiotyczne suplementy diety w postaci płynnej zawierające żywe, aktywne bakterie probiotyczne, zdolne do natychmiastowego zasiedlenia przestrzeni przewodu pokarmowego (głównie jelit). Doskonałe wyniki uzyskiwane są dzięki odpowiedniemu zaangażowaniu załogi oraz innowacyjnej, kaskadowej metodzie hodowli odpowiednich zestawów bakterii probiotycznych i obecności ich biofunkcjonalnych postbiotyków. Cały system produkcji i kontrola produktów oparte są o procedury obowiązujące we wdrożonych systemach GMP, GHP oraz HACCP. Nad prawidłowym systemem i jakością produkcji czuwa wykwalifikowany i sprawdzony personel.

W ciągu wieloletniej działalności, dzięki innowacyjnym wdrożeniom opartym na naturalnej biotechnologii, otrzymaliśmy liczne wyróżnienia i nagrody, a wśród konsumentów zyskaliśmy uznanie i zaufanie. W roku 2012 uzyskaliśmy certyfikację ekologiczną i od tego czasu produkujemy ekologiczne preparaty probiotyczne. Przykładamy wielką uwagę do jakości naszych produktów, bogactwa ich bioaktywnych składników, a także zachowania naturalnej witalności znajdujących się w produktach, żywych szczepów bakterii probiotycznych.

Nasze kilkunastoletnie doświadczenie w produkcji płynnych produktów probiotycznych zaowocowało szerokim asortymentem unikatowych preparatów,

które od wielu lat służą ludziom zainteresowanym profilaktyką i suplementacją probiotyczną. Każdy z produkowanych przez nas preparatów charakteryzuje się unikatowym składem i powstaje zgodnie z opracowywaną przed laty, a nadal udoskonalaną recepturą. Od początku naszej działalności skupialiśmy się nie tylko na procesie technologicznym naszych produktów probiotycznych. Interesował nas przede wszystkim najdelikatniejszy i zarazem najsilniejszy, a przede wszystkim najważniejszy ich element – drobnoustroje o potencjale probiotycznym. W miarę upływu lat, śledząc możliwości współczesnej nauki, studiując literaturę naukową, korzystając z coraz ciekawszej oferty analitycznej dostępnej na rynku, rozwijając współpracę z najlepszymi jednostkami naukowymi w Polsce, realizując mniejsze i większe projekty badawczo-rozwojowe, udoskonaliliśmy nasze probiotyczne produkty. Stały rozwój, to jeden z naszych priorytetów, dlatego nadal prowadzone są prace badawczo-rozwojowe oraz wdrożeniowe, dzięki którym coraz szerzej poznajemy pozytywny wpływ naszych preparatów na organizm człowieka, głównie na jego mikrobiom jelitowy. Od zawsze stawialiśmy na doskonalenie jakości, która jest przez nas rozumiana bardzo szeroko. **Przy tym na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wskazywana przez wielu liczebność drobnoustrojów probiotycznych to wskaźnik istotny, choć niewiele mówiący o biofunkcjonalności danego produktu.** To co wyróżnia nasze produkty to nie tylko żywe, aktywne i witalne drobnoustroje o potencjale probiotycznym, których zespoły tworzą odpowiednio wyselekcjonowane szczepy o udowodnionych właściwościach prozdrowotnych, ale także ich metabolity i aktywne związki stanowiące efekt procesu fermentacji celowo wytypowanych, ekologicznych surowców. Nie stanowi tajemnicy, że proces technologiczny otrzymywania płynnych produktów probiotycznych nie jest zadaniem łatwym. Wybór surowców i ich dostawców, weryfikacja ich jakości, pracochłonna obróbka wstępna wykorzystywanych substratów, zachowanie odpowiednich reżimów higienicznych, kontrola analityczna procesu namnażania i fermentacji w całym cyklu produkcyjnym łącznie z etapem stabilizacji produktów i ich magazynowania to najważniejsze, choć nie jedyne elementy linii technologicznej, które połączone w sekwencje zdarzeń prowadzą do otrzymania naszych produktów. Ufamy, że nasza praca i codzienne zaangażowanie całego zespołu przyczynia się do tworzenia wyjątkowych produktów probiotycznych dostępnych na polskim, europejskim, a nawet światowym rynku. Nasze produkty cieszą się coraz większym zainteresowaniem tak w rodzimym kraju, jak i poza jego granicami. Eksportujemy nasze płynne produkty probiotyczne do Skandynawii, Austrii, Niemiec, Hiszpanii, Anglii, ale także do Azji, gdzie cieszą się coraz większym uznaniem.

2. BAKTERIE FERMENTACJI MLEKOWEJ – OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Bakterie fermentacji mlekowej (ang. Lactic acid bacteria, LAB) stanowią grupę mikroorganizmów najczęściej wykorzystywanych w produkcji żywności. Posiadają wiele atrakcyjnych cech decydujących o ich zastosowaniu w przemyśle (Gajewska i Błaszczuk, 2012). Ponadto niektóre z nich mają potwierdzone właściwości prozdrowotne (Słońska i Klimuszko, 2010). Wszystkie bakterie fermentacji mlekowej to drobnoustroje gram dodatnie, nie wytwarzające katalazy ani przetrwalników (Libudzisz, 2013). Bakterie fermentacji mlekowej charakteryzują wysokie wymagania pokarmowe (Jurkowski i Błaszczuk, 2012). Wykazują zdolność do fermentacji cukrów w warunkach beztlenowych w wyniku czego syntetyzują kwas mlekowy (Libudzisz, 2013). Ze względu na rodzaj metabolizmu, bakterie fermentacji mlekowej dzieli się na homo- i heterofermentatywne (Górecki i Bardowski, 2011), natomiast ze względu na optymalną dla ich wzrostu temperaturę na termofile i mezofile (Jurkowski i Błaszczuk, 2012). Mezofile wytwarzają kwas mlekowy w stężeniu 1,5%, zaś termofile do 3% (Libudzisz, 2013). Dla bakterii fermentacji mlekowej optymalne pH to zakres od 4.0 do 9.6 (Gajewska i Błaszczuk, 2012). Wszystkie bakterie fermentacji mlekowej zaliczane są to obligatoryjnych lub fakultatywnych beztlenowców (Jurkowski i Błaszczuk, 2012). Mikroorganizmy w obrębie tej grupy wykazują między sobą istotne różnice, które dotyczą w szczególności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* (Libudzisz, 2013). Powszechnym środowiskiem występowania bakterii fermentacji mlekowej, w zależności od gatunku, są rośliny, mleko, a część z nich zasiedla również przewód pokarmowy ludzi i zwierząt (Górecki i Bardowski, 2011).

2.1 Systematyka

Bakterie fermentacji mlekowej klasyfikowane są w obrębie dwóch różnych typów, a mianowicie są to: typ trzynasty – *Firmicutes* oraz czternasty – *Actinobacteria*. Do typu *Actinobacteria* spośród wszystkich bakterii fermentacji mlekowej zaliczane są tylko te z rodzaju *Bifidobacterium*, zaś pozostałe należą do typu trzynastego. Rodzaj *Bifidobacterium* zaliczany jest do rodziny *Bifidobacteriaceae*, rzędu *Bifidobacteriales* oraz klasy *Actinobacteria*. Natomiast wśród typu *Firmicutes* wyróżniamy dwa rzędy, w których sklasyfikowana jest reszta bakterii fermentacji mlekowej. Rząd pierwszy to *Bacillus*, który obejmuje tylko jedną rodzinę – *Sporolactobacillaceae* i jeden rodzaj bakterii fermentacji mlekowej – *Sporolactobacillus*.

Drugi rząd to *Lactobacillales* na który składa się sześć rodzin i trzydzieści trzy rodzaje bakterii mlekowych. Pierwsza rodzina to *Lactobacillaceae* i należą do niej rodzaje: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* i *Pediococcus*. Druga to *Aerococcaceae* obejmująca siedem rodzajów bakterii: *Aerococcus*, *Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella* oraz *Ignavigranum*. W trzeciej – *Carnobacteriaceae* zebranych jest dwanaście rodzajów bakterii fermentacji mlekowej: *Carnobacterium*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopostipes*, *Desemzia*, *Dolosigranum*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilacobacillus* i *Trichococcus*. Czwarta rodzina nosi nazwę *Enterococcaeae* i zawiera rodzaje *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, a także *Vagococcus*. *Leuconostocaceae*, czyli rodzina piąta obejmuje tylko trzy rodzaje *Leuconostoc*, *Oecococcus* i *Weisella*. Ostatnia z nich to *Streptococcaceae* i składające się na nią rodzaj *Streptococcus* i *Lactococcus*. Wszystkie bakterie mlekowe z typu *Firmicutes* zaliczane są do jednej klasy – *Bacilli* (Moneta i Piątkiewicz, 2010; Gajewska i Błaszczuk, 2012; Jurkowski i Błaszczuk, 2012; Vos i in., 2009).

2.2 Metabolizm

Bakterie fermentacji mlekowej ze względu na sposób wykorzystania składników pokarmowych można sklasyfikować na homo- i heterofermentatywne. Bakterie obligatoryjnie homofermentatywne wytwarzają przede wszystkim kwas mlekowy, ale także niewielkie stężenia innych metabolitów. Natomiast w przypadku bakterii heterofermentatywnych oprócz kwasu mlekowego syntetyzowany jest także szereg innych substancji jak kwas octowy, etanol, ditlenek węgla, diacetyl (Trojanowska i in., 2009). Szczepozależna jest także syntetyzowana przez bakterie fermentacji mlekowej forma kwasu mlekowego - L(+) bądź D(-) (Narayanan i in., 2004). Głównym surowcem wykorzystywanym przez bakterie kwasu mlekowego są węglowodany, a dokładniej cukry sześciowęglowe (Gajewska i Błaszczuk, 2012). Oba typy bakterii mają także zdolność do fermentacji cukru mlecznego, czyli laktozy (Libudzisz, 2013). Homofermentatywne bakterie fermentacji mlekowej metabolizują glukozę w szlaku Embdena-Meyerhofa-Parnasa (EMP) (Jurkowski i Błaszczuk, 2012). W końcowym etapie glikolizy powstają dwie cząsteczki pirogronianiu, które w wyniku zachodzących reakcji redoks są redukowane do końcowego produktu fermentacji, czyli kwasu mlekowego (Gajewska i Błaszczuk, 2012). W przypadku heterofermentacji glukoza fermentowana jest w szlaku pentozofosforanowym. Różnica ta związana jest z faktem, iż heterofermentatywne bakterie fermentacji mlekowej nie posiadają pewnych enzymów niezbędnych do prowadzenia procesu

glikolizy. W wyniku zachodzących reakcji powstaje kolejno: glukoza-6-fosforan, kwas 6-fosforo-glukonowy, następnie z niego ditlenek węgla i rybulozo-5-fosforan. Ten ostatni jest przekształcany do ksylulozo-5-fosforanu, z którego to otrzymywany jest aldehyd 3-fosfo-glicerynowy i acetylofosforan. Z pierwszego związku powstaje kwas mlekowy, zaś z drugiego w zależności od warunków środowiskowych kwas octowy bądź etanol. Aby powstał kwas octowy konieczna jest obecność tlenu, natomiast w przypadku jego braku powstaje etanol (Libudzisz, 2013; Jurkowski i Błaszczuk, 2012). Warto zaznaczyć, że bakterie fermentacji mlekowej oprócz metabolizowania cukrów, posiadają także zdolność do fermentacji innych związków jak tłuszcze, co w konsekwencji wpływa na aromat artykułów mleczarskich. Natomiast niedobór aminokwasów koniecznych do wzrostu, mobilizuje bakterie fermentacji mlekowej do degradacji białek obecnych w środowisku. Ten mechanizm ma także pozytywne znaczenie w kontekście przemysłu spożywczego, ponieważ pozwala pozyskać odpowiednie cechy organoleptyczne (Gajewska i Błaszczuk, 2012).

2.3 Charakterystyka bakterii fermentacji mlekowej, w tym szczepów bakterii wchodzących w skład produktów probiotycznych firmy Living Food Sp. z o.o.

Rodzaj *Lactobacillus*

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* są to bakterie fermentacji mlekowej należące do klasy *Bacilli*, rzędu *Lactobacillales* i rodziny *Lactobacillaceae* (Moneta i Piątkiewicz, 2010). Mają postać pałeczek i zaliczane są do fakultatywnych beztlenowców (Jurkowski i Błaszczuk, 2012). Nie wytwarzają endospor ani katalazy (Słońska i Klimuszko, 2010), są kwasolubne (Trojanowska i in., 2009). Bakterie tego rodzaju są zróżnicowane pod względem strukturalnym (Libudzisz, 2013). Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* z uwagi na syntetyzowane metabolity zostały podzielone na trzy typy. Do pierwszego należą bakterie homofermentatywne. Drugi typ to bakterie względnie heterofermentatywne, zaś do ostatniej grupy zaliczane są drobnoustroje bezwzględnie heterofermentatywne (Słońska i Klimuszko, 2010). Do tego rodzaju należą zarówno szczepy termofilne jak i mezofilne (Libudzisz, 2013). Naturalnie występują w rozkładających się surowcach roślinnych czy fekaliami m.in. z uwagi na fakt, iż stanowią element mikrobiomu jelitowego człowieka i zwierząt (Gajewska i Błaszczuk, 2012). Dzięki swoim właściwościom znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* są wykorzystywane do produkcji mlecznych napo-

jów fermentowanych, kiszzonej kapusty i ogórków czy pieczywa (Libudzisz, 2013; Trojanowska i in., 2009). Rodzaj *Lactobacillus* posiada status GRAS (ang. generally recognized as safe) (Słońska i Klimuszko, 2010), co oznacza „bezpieczne w stosowaniu”. Niektóre szczepy należące do tego rodzaju mają udowodnione właściwości prozdrowotne i zaliczane są do probiotyków. Są to gatunki *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii* czy *Lactobacillus plantarum* (Gajewska i Błaszczuk, 2012). Warto również zaznaczyć, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* są wykorzystywane w przemyśle do produkcji bakteriocyn (Steinka, 2009).

W naszych produktach także występują przedstawiciele rodzaju *Lactobacillus*, m.in.:

- ***Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103)** – charakteryzuje się pozytywnym wpływem na układ immunologiczny (właściwości antyalergiczne) i układ pokarmowy w tym sprzyja skutecznemu leczeniu nieswoistego zapalenia jelit, a także zmniejsza częstość występowania biegunki. Suplementy zawierające szczep *L. rhamnosus* GG mają pozytywny wpływ na terapię przeciwko *Helicobacter pylori*, a podawane niemowlętom sprzyjają dobremu ich rozwojowi.
- ***Lactobacillus rhamnosus* LR 04 (DSM 16605)** – charakteryzuje się wysoką skutecznością w leczeniu przewlekłych biegunek u osób starszych, przyczynia się do zmniejszenia częstości występowania i nasilenia chorób układu oddechowego, wykazuje silną aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciwko szczepom z gatunku *E. coli*.
- ***Lactobacillus rhamnosus* LR 05 (DSM 19739)** - charakteryzuje się właściwościami przeciwzapalnymi i immunologicznymi, stosowany w leczeniu alergii.
- ***Lactobacillus rhamnosus* LR 06 (DSM 21981)** - wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciwko bakteriom, w tym szczepom z gatunku *E. coli*, a także aktywnością przeciwgrzybową; wpływa na redukcję bakterii redukujących siarczany, przez co korzystnie oddziałuje na stan zdrowia osób z halitozą.
- ***Lactobacillus rhamnosus* ATB-LRS905 (LMG 25626)** - szczep produkujący beta-galaktozydazy, enzymy wspierające trawienie laktozy u osób z nietolerancją na ten cukier; stymuluje prawidłową odpowiedź immunologiczną, a dzięki zdolności do wytwarzania nadtlenu wodoru wykazuje działanie bakteriobójcze.

- ***Lactobacillus casei* 101/37 (LMG P- 17504)** – charakteryzuje się właściwościami immunomodulacyjnymi i przyczynia się do łagodzenia objawów IBS.
- ***Lactobacillus acidophilus* LA 1 (LMG P- 21904)** - przyczynia się do utrzymania prawidłowego stanu przewodu pokarmowego u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.
- ***Lactobacillus acidophilus* LA02 (DSM 21717)** - wykazuje działanie związane z tworzeniem i utrzymaniem biofilmu pochwy, utrudniając tym samym przetrwanie drożdżakom i innym grzybom, redukuje stany zapalne dróg rodnych; łagodzi objawy zespołu jelita nadwrażliwego oraz reguluje procesy wchłaniania ze światła jelit.
- ***Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB 2 (LMG P-21905)** – wykorzystywany w utrzymaniu remisji u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, przyczynia się do łagodzenia objawów IBS.
- ***Lactobacillus plantarum* LP 02 (LMG P- 21020)** – charakteryzuje się aktywnością przeciwdrobnoustrojową przeciwko szczepom z gatunku *E. coli*; przyczynia się do zmniejszenia częstości występowania chorób układu oddechowego.
- ***Lactobacillus plantarum* LP 01 (LMG P-21021)** – charakteryzuje się właściwościami związanymi z łagodzeniem objawów zespołu jelita nadwrażliwego, a także pozwala na zwiększenie częstości wypróżnień u dzieci z czynnościowymi zaparciami; charakteryzuje się silnymi właściwościami antymikrobiologicznymi przeciwko szczepom bakterii z gatunku *E. coli*.
- ***Lactobacillus plantarum* LP 09 (DSM 25710)** - wykazuje korzystne działanie w leczeniu hipercholesterolemii oraz wykazuje działanie inhibujące wobec bakterii z gatunku *L. monocytogenes*.
- ***Lactobacillus fermentum* LF 2 (LMG 27299)** – charakteryzuje się zdolnością do wytwarzania wysokich stężeń egzopolisacharydu (EPS), co w konsekwencji przyczynia się do obniżania poziomu cholesterolu we krwi; ponadto wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, przeciwrzodowe oraz immunomodulacyjne.
- ***Lactobacillus pentosus* LPS 01 (LMG P-21019)** - charakteryzuje się aktywnością przeciwdrobnoustrojową przeciwko szczepom bakterii z gatunku *E. coli* i przeciwko grzybom.
- ***Lactobacillus reuteri* LRE 02 (DSM 23878)** - wykazuje aktywność antyoksydacyjną.

- ***Lactobacillus paracasei* LPC 00 (LMG P- 21380)** - sprzyja przywracaniu równowagi mikrobioty jelitowej (eliminacja stanu dysbiozy) oraz charakteryzuje się produkcją ryboflawiny.

Rodzaj *Bifidobacterium*

Rodzaj *Bifidobacterium* różni się znacząco pod względem filogenetycznym od pozostałych bakterii fermentacji mlekowej (Jurkowski i Błaszczuk, 2012). Bakterie te należą do klasy *Actinobacteria*, rzędu *Bifidobacteriales* i rodziny *Bifidobacteriaceae* (Moneta i Piątkiewicz, 2010). Są to termofilne pałeczki (Samet i Bronk, 2008; Libudzisz, 2013), zaliczane do bezwzględnych beztlenowców (Jurkowski i Błaszczuk, 2012). *Bifidobacterium* prowadzą heterofermentację mlekową w wyniku czego produkowany jest głównie kwas octowy i kwas mlekowy (Zielińska i in., 2012). Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* naturalnie zasiedlają jelita ludzi i zwierząt, skąd są izolowane (Libudzisz, 2013). Charakteryzuje je udowodnione, korzystne oddziaływanie na organizm człowieka i są zaliczane do probiotyków (Steinka, 2011). W przemyśle spożywczym znajdują zastosowanie głównie w przemyśle mleczarskim (Libudzisz, 2013).

W naszych produktach także występują przedstawiciele rodzaju *Bifidobacterium*, m.in.:

- ***Bifidobacterium breve* BL 10 (LMG P- 17500)** – pozytywnie oceniany w utrzymaniu remisji u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, przyczynia się do łagodzenia objawów IBS.
- ***Bifidobacterium breve* BR 03 (DSM 16604)** - przyczynia się do zwiększenia liczby wypróżnień; wykazuje właściwości przeciwzapalne i aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciwko szczepom bakterii z gatunku *E. coli*, przyczynia się do przywrócenia równowagi mikrobiomu w zespole jelita drażliwego, łagodzi objawy astmy, celiakii i atopowego zapalenia skóry, a także sprzyja procesom regeneracji po treningach.
- ***Bifidobacterium breve* Bbr 8 (LMG P-17501)** – charakteryzuje się pozytywnym działaniem w utrzymaniu remisji u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego; przyczynia się do łagodzenia objawów IBS.
- ***Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi 1 (LMG P- 17502)** – charakteryzuje się pozytywnym działaniem w utrzymaniu remisji u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego; przyczynia się do łagodzenia objawów IBS.

- ***Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BS 01 (LMG P - 21384)** – przyczynia się do zwiększenia częstości wypróżnień u dzieci z czynnościowymi zaparciami i do zmniejszenia częstości występowania chorób układu oddechowego.
- ***Bifidobacterium longum* BL 03 (DSM 16603)** – przyczynia się do zwiększenia częstości wypróżnień u dzieci z czynnościowymi zaparciami.
- ***Bifidobacterium longum* ATB-BLM802 (LMG 26652)** - szczep produkujący beta-galaktozydazę, enzymy pomagające w trawieniu laktozy u osób z nietolerancją.
- ***Bifidobacterium longum* W 11 (LMG P-21586)** – przyczynia się do zwiększenia częstotliwości oddawania stolca u pacjentów z zaparciami oraz zmniejszenia bólu brzucha i łagodzi wzdęcia a także dolegliwości związane z antybiotykoterapią; wspomaga leczenie encefalopatii wątrobowej.
- ***Bifidobacterium bifidum* BB 01 (DSM 22892)** – neutralizuje stan dysbiozy mikrobiomu jelitowego.
- ***Bifidobacterium breve* ATB-BBE804 (LMG 13208)** - posiada zdolność biotransformacji kwasu linolowego (LA) w sprzężony kwas linolowy (CLA).

Rodzaj *Streptococcus*

Bakterie z gatunku *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, dawniej *Streptococcus thermophilus*, należą do typu *Firmicutes*, klasa *Bacilli*, rząd *Lactobacillales*, rodzina *Streptococaceae*, rodzaj *Streptococcus*. Są to gram-dodatnie, termofilne bakterie o optymalnej temperaturze wzrostu wynoszącej 45°C, zaliczne do paciorkowców. Bakterie *Streptococcus salivarius ssp. Thermophilus* znalazły zastosowanie w przemyśle spożywczym, w produkcji jogurtów, serów i innych przetworów fermentowanych. Głównym efektem metabolizmu tej grupy bakterii jest biosynteza mleczanu z laktozy, dzięki czemu bardzo dobrze funkcjonują w środowisku mlecznym. Bakterie *Streptococcus salivarius* produkują czynnik bakteriocynogeniczny i ureazę, a także wykazują zdolność do syntezy polisacharydów (np. kwasu hialuronowego) oraz tolerują środowisko tlenowe.

W naszych produktach także występują przedstawiciele rodzaju *Streptococcus*, *m.in.:*

- ***Streptococcus thermophilus* 9Y (LMG P-17225)** – wykazuje aktywność w modulacji odpowiedzi immunologicznej, przyczynia się do utrzymania

remisji u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i łagodzenia objawów IBS.

- ***Streptococcus thermophilus* Z 57 (LMG P-21908)** - przyczynia się do łagodzenia objawów IBS.
- ***Streptococcus thermophilus* FP 4 (DSM 18616)** - sprzyja regeneracji organizmu po treningach i przyczynia się do zmniejszenia napięcia mięśni po ćwiczeniach siłowych.

Rodzaj *Leuconostoc*

Rodzaj *Leuconostoc* to ziarniaki zaliczane podobnie jak *Lactobacillus* do klasy *Bacilli* i rzędu *Lactobacillales*. Różnią się jednak rodziną. *Leuconostoc* należy bowiem do rodziny *Leuconostocaceae* (Moneta i Piątkiewicz, 2010; Jurkowski i Błaszczuk, 2012; Trojanowska i in., 2009). Są to gram dodatnie obligatoryjnie heterofermentatywne mezofile (Trojanowska i in., 2009; Libudzisz, 2013). Należą do względnych beztlenowców i są katalazoujemne (Hemme i Foucaud-Scheunemann, 2004). Podstawowymi metabolitami wytwarzanymi przez bakterie z rodzaju *Leuconostoc* jest kwas mlekowy (enancjomer D -) oraz alkohol etylowy (Libudzisz, 2013). Bakterie z rodzaju *Leuconostoc* występują powszechnie na powierzchni roślin zielonych (Hemme i Foucaud-Scheunemann, 2004). Zastosowanie znajdują w przemyśle mleczarskim, gdzie wykorzystywane są do produkcji mlecznych napojów fermentowanych, śmietany, serów dojrzewających czy masła (Holland, 2011). Niektóre szczepy mają zdolność do wytwarzania ditlenku węgla co powoduje powstawanie dziur w serze (Libudzisz, 2013). Bakterie z rodzaju *Leuconostoc* syntetyzują diacetyl, który odpowiada za charakterystyczny „maślany” zapach (Holland, 2011). Czasami obecność bakterii rodzaju *Leuconostoc* jest niekorzystna. Mogą stanowić czynnik powodujący śluzowacenie wyrobów przemysłu cukrowniczego (Hemme i Foucaud-Scheunemann, 2004).

Rodzaj *Lactococcus*

Rodzaj *Lactococcus* reprezentują gram dodatnie bakterie zaliczane, tak jak i pozostałe bakterie fermentacji mlekowej, do klasy *Bacilli* i rzędu *Lactobacillales*. W tym przypadku bakterie przynależą do rodziny *Streptococcaceae* (Moneta i Piątkiewicz, 2010; Trojanowska i in., 2009). Prowadzą homofermentację mlekową i klasyfikowane są jako mezofile (Jurkowski i Błaszczuk, 2012; Petrov i in., 2008). Głównym metabolitem produkowanym przez ten rodzaj bakterii jest

kwas L (+) mlekowy (Petrov i in., 2008). *Lactococcus lactis* to gatunek z rodzaju *Lactococcus*, który ma istotne znaczenie w przetwórstwie żywności (Petrov i in., 2008). W największym stopniu wykorzystywany jest przez przemysł mleczarski, jednak uczestniczy także w produkcji fermentowanych surowców roślinnych (Odamki i in., 2011; Libudisz, 2013). Ponadto gatunek *Lactococcus lactis* jest producentem nizyny, stosowanej w przemyśle spożywczym jako konserwant żywności (Jurkowski i Błaszczuk, 2012; Dz. U. nr 232 poz. 1525). Dodatkowo stwierdzono jego pozytywne oddziaływanie na przeżywalność bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* (Yonezawa i in., 2010).

2.4 Wykorzystanie bakterii fermentacji mlekowej w przemyśle spożywczym

Bakterie fermentacji mlekowej znajdują zastosowanie w przetwórstwie żywności od setek tysięcy lat. Pierwotnie, ludzie nie zdawali sobie sprawy, że to właśnie drobnoustroje są odpowiedzialne za powstawanie różnego rodzaju produktów (Czarnecki i Czarnecka, 2006). Obecnie mikroorganizmy są szeroko wykorzystywane we wszystkich gałęziach przemysłu spożywczego. Dzięki nim uzyskujemy obszerny asortyment artykułów spożywczych o specyficznych cechach smakowo-zapachowych oraz pozytywnym wpływie na funkcjonowanie organizmu człowieka (Babuchowski i Wzorek, 2003). Bakterie fermentacji mlekowej występują w mlecznych napojach fermentowanych, a także w wędlinach (Chabłowska i in. 2009). Najczęściej kultury bakterii fermentacji mlekowej dodawane są do surowca poddawanego obórcie w postaci starterów, zawierających dokładnie wyselekcjonowane szczepy o określonym działaniu (Jurkowski i Błaszczuk, 2012). Czasami prowadzona jest fermentacja spontaniczna przy udziale mikroorganizmów naturalnie bytujących w surowcu, jednak w tym przypadku nie ma pełnego nadzoru nad przebiegiem procesu, co z kolei może uniemożliwić uzyskanie serii wyrobów o identycznych właściwościach (Zaręba i Ziarno, 2011). Aczkolwiek nierzadko autochtoniczny zespół drobnoustrojów surowca wprowadzany jest do kultur starterowych (Chabłowska i in. 2009). Bakterie fermentacji mlekowej wytwarzają wiele metabolitów, które wykazują działanie konserwujące w stosunku do żywności. Przykładem może być produkowany przez nie kwas mlekowy, który znacznie obniża pH środowiska, co z kolei zapobiega rozwojowi niepożądanych drobnoustrojów. Istotne znaczenie ma także nadtlenek wodoru czy bakteriocynty, a w szczególności nizyna. Ponadto bakterie fermentacji mlekowej zapobiegają degradacji witamin i zwiększają wchłanianie składników

odżywczych (Zaręba i Ziarno, 2011). Szczególne znaczenie mają bakterie fermentacji mlekowej o charakterze probiotyków, pozwalające na uzyskanie produktów spożywczych o działaniu prozdrowotnym (Libudzisz, 2013).

2.4.1 Przemysł mleczarski

Przemysł mleczarski w największym stopniu wykorzystuje potencjał bakterii fermentacji mlekowej. Także wśród konsumentów, wyroby tego typu cieszą się dużą popularnością tym bardziej, że cechuje je duża różnorodność (Nowak i in., 2007). Występują zarówno w postaci stałej jak i płynnej. Do najbardziej popularnych artykułów przemysłu mleczarskiego, które możemy spotkać w postaci stałej należą różnego rodzaju sery żółte oraz ser biały. Natomiast wśród płynnych należy wskazać kefir, maślankę, kumys, jogurt, ukwaszone mleko (Babuchowski i Wzorek, 2003) oraz napoje takie jak biojogurt, mleko acidofilne czy mleko bifidusowe (Grzegorzczuk, 2010). Mleczne napoje fermentowane dzielą się na cztery generacje. Do pierwszej z nich zaliczamy między innymi zsiadłe mleko uzyskiwane w wyniku spontanicznej fermentacji mikroorganizmów autochtonicznych mleka, czyli bakterii należących głównie do rodzaju *Lactobacillus* (Libudzisz, 2013). Drugi typ to produkty typu kefir, jogurt czy kumys. Produkowane są z wykorzystaniem odpowiednich kultur starterowych (Mojka, 2013). Zarówno kefir jak i kumys produkuje się z wykorzystaniem procesu fermentacji mlekno-alkoholowej. Różnią się one przede wszystkim surowcem z którego są wytwarzane. Kumys tradycyjnie uzyskuje się z mleka kobyłego bądź wielbłądziego, natomiast kefir z mleka krowiego (Kołożyn-Krajewska i Sikora, 2004; Mojka, 2013). Bakteriami stosowanymi w produkcji kefiru są najczęściej bakterie z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Leuconostoc*, zaś do otrzymywania kumysu najpopularniejszy jest gatunek *Lactobacillus delbrueckii* sp. bulgaricus (Stankiewicz, 2009). Tymczasem, aby uzyskać popularny jogurt dodawane do mleka są gatunki *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* (Babuchowski i Wzorek, 2003). Napoje III generacji oprócz wspomnianych wcześniej gatunków zawierają bakterie probiotyczne jak *Lactobacillus casei* (Mojka, 2013). Na rynku konsument może łatwo rozpoznać napoje należące do III generacji, ponieważ w nazwie posiadają przedrostek „bio” (Kołożyn-Krajewska i Sikora, 2004). Czwarta generacja mlecznych napojów fermentowanych to ta, do której zalicza się mleko acidofilne i mleko bifidusowe. Produkowane są wyłącznie z zastosowaniem bakterii fermentacji mlekowej o potencjale probiotycznym (Jałosińska, 2007). Mleko acidofilne uzyskujemy dzięki procesowi prowadzonemu przez *Lactoba-*

cillus acidophilus (Stankiewicz, 2007), natomiast mleko bifidusowe przy udziale bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* (Grzegorzczuk, 2010). Fermentowane wyroby przemysłu mleczarskiego o konsystencji stałej, uzyskuje się przez dodatek starannie dobranych kultur starterowych. Swoje zastosowanie mają one głównie przy produkcji serów żółtych dojrzewających i serów białych. W serach twardych występują paciorkowce z rodzaju *Lactococcus* (Libudzisz, 2013). W zależności od rodzaju sera stosuje się dodatkowo inne bakterie fermentacji mlekowej, na przykład pałeczki z rodzaju *Lactobacillus*, a także pleśnie i drożdże (Babuchowski i Wzorek, 2003). W produkcji sera białego wykorzystuje się głównie paciorkowce *Lactococcus lactis*, które są odpowiedzialne za proces koagulacji mleka (Babuchowski i Wzorek, 2003).

2.4.2 Fermentowane surowce roślinne

Zarówno owoce jak i warzywa stanowią niezbędny element diety każdego człowieka. Dostarczają wielu składników odżywczych, koniecznych do prawidłowego funkcjonowania organizmu (Babuchowski i Wzorek, 2003). Zaleca się ich spożywanie w ilości pięciu porcji dziennie, stanowiących łącznie około 400 gram. Mowa tu o surowych warzywach, które krótko zachowują świeżość i bardzo szybko ulegają zepsuciu (Lada, 2008). Dlatego szuka się sposobów na przedłużenie ich trwałości. Jedną z takich metod jest fermentacja mlekowa surowców roślinnych (Babuchowski i Wzorek, 2003). Taka forma ich utrwalania jest akceptowana przez konsumentów, ze względu na potwierdzone bezpieczeństwo spożycia i wyjątkowe cechy sensoryczne a także aspekt związany z tradycją (Trząskowska, 2013). Oprócz działania konserwującego, fermentacja prowadzona przez bakterie mlekowe pozwala na uzyskanie nowych grup produktów nie tylko o atrakcyjnych cechach sensorycznych, ale także o wysokiej zawartości witamin, przeciwutleniaczy i innych ważnych związków, które w przypadku innego typu utrwalania, np. obróbki termicznej mogą ulegać degradacji (Zaręba i Ziarno, 2011). Najczęściej na drodze fermentacji mlekowej surowców roślinnych uzyskuje się produkty kiszzone. Największą popularnością w naszym kraju cieszą się kiszzone ogórki i kapusta, nierzadko można też spotkać kiszzone buraki (Babuchowski i Wzorek, 2003). W Polsce i wielu innych krajach, fermentacji poddaje się także soki owocowe i warzywne. Produkty te zyskują cały czas na popularności, ze względu na problem związany z nietolerancją laktozy spotykaną u części populacji oraz rosnącą liczbę osób stosujących dietę wegańską (Zaręba i Ziarno, 2011). Coraz częściej utrwalanie przez zakwaszanie jest wykorzysty-

wane przy produkcji paszy dla zwierząt w gospodarstwach ekologicznych. W ten sposób pasza jest zabezpieczana przed rozwojem niepożądanych grup drobnoustrojów, a jej spożycie wpływa korzystnie na stan odżywienia zwierząt (Zielińska i in., 2013). Przy produkcji kiszonek wykorzystuje się na ogół drobnoustroje naturalnie zasiedlające surowce (Libudzisz, 2013). Zwykle w tych procesach uczestniczą takie gatunki jak *Lactobacillus brevis* czy *Lactobacillus plantarum* (Trojanowska i in., 2009), a także *Leuconostoc mesenteroides*. W kapuście nierzadko obecne są gatunki *Lactococcus lactis* oraz *Lactobacillus pentoaceticus* (Babuchowski i Wzorek, 2003). Natomiast w przypadku soków przygotowuje się odpowiednią kulturę starterową. Jej skład zależy od rodzaju przetwarzanych owoców i warzyw, jednak najczęściej są to szczepy zaliczane do probiotyków (Zaręba i Ziarno, 2011). Jak już wcześniej wspomniano, bakterie fermentacji mlekowej wpływają pozytywnie na jakość uzyskanych produktów końcowych. Głównie działaniem konserwującym wykazuje kwas mlekowy będący produktem metabolizmu bakterii fermentacji mlekowej (Chabłowska i in. 2009). Jego działanie związane jest bezpośrednio ze zwiększeniem kwasowości środowiska (Lada, 2008). Powstaje on w wyniku przemian węglowodanów. Ponadto nadaje kiszonom rzeński smak, zatrzymuje rozwój drobnoustrojów patogennych w jelitach przy jednoczesnej stymulacji wzrostu drobnoustrojów pożytecznych (Chabłowska i in. 2009). Oprócz tego fermentowane surowce roślinne mogą zawierać zwiększoną ilość witamin w porównaniu z surowcami, z których zostały otrzymane (Szydłowska i Kotożyn-Krajewska, 2010). Użytkują również charakterystyczny zapach i co ważne, są to produkty o obniżonej kaloryczności (Szydłowska i Kotożyn-Krajewska, 2010).

2.4.3 Fermentacja pieczywa

Najczęściej pieczywo produkuje się z mąki pszennej oraz żytniej. W Polsce największym uznaniem cieszy się chleb z mąki mieszanej, tj. pszenno-żytniej (Chabłowska i in. 2009). W przypadku produkcji pieczywa pszennego główną rolę odgrywają drożdże i prowadzona przez nie fermentacja alkoholowa. Natomiast bakterie kwasu mlekowego przyczyniają się do powstawania pieczywa żytniego oraz wyrobów otrzymywanych z wykorzystaniem mąk niechlebowych, jak np. owies czy jęczmień. Różnice te wynikają ze swoistych cech obu mąk (Babuchowski i Wzorek, 2003; Reys, 2003). Bakterie fermentacji mlekowej, a dokładniej produkowane przez nie metabolity, decydują o specyficznych cechach smakowo-zapachowych, a także wpływają na poprawę wartości odżywczej i lepszą przyswajalność składników mineralnych (Piasecka-Jóźwiak i in., 2006). Do produkcji pieczywa żytniego czy

mieszanego stosuje się specjalnie wyselekcjonowane kultury starterowe (Kawka i in., 2007). Rzadko wykorzystuje się jedynie mikroorganizmy autochtoniczne mąk (Piasecka-Jóźwiak i in., 2006). W skład kultur starterowych stosowanych w produkcji pieczywa żytniego oraz mieszanego przeważnie wchodzi pączki z rodzaju *Lactobacillus* oraz drożdże, przy czym ich stosunek liczbowy wynosi 100:1 (Reps, 2003). Tylko ich synergistyczne działanie pozwala na otrzymanie pieczywa wysokiej jakości. Szczególne znaczenie mają gatunki *Lactobacillus sanfranciscensis* i *Lactobacillus plantarum*. Pierwszy z nich hydrolizuje maltozę, drugi wpływa na sprężystość i wytrzymałość miąższu (Libudzisz, 2013). Oprócz tego w skład kultur starterowych wchodzi głównie bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Lactococcus* czy *Leuconostoc* (Piasecka-Jóźwiak i in., 2006). Bakterie mlekowe mają za zadanie ukwaszenie ciasta, co oprócz nadania charakterystycznego smaku, gwarantuje także pożądaną strukturę otrzymanego wyrobu (Libudzisz, 2013). Na popularności cały czas zyskuje pieczywo zawierające w swoim składzie zboża niechlebne. Zarówno owies, jak i jęczmień mają bardzo korzystne oddziaływanie na zdrowie człowieka, zwłaszcza przy istniejących już nieprawidłowościach (Rozmierska i in., 2013; Kawka i in., 2007).

2.5 Główne metabolity bakterii fermentacji mlekowej

Kwas mlekowy

Kwas mlekowy jest metabolitem wytwarzanym przez bakterie fermentacji mlekowej (Strus, 1998). Jego charakterystyczne działanie polega na zakwaszaniu środowiska. Obniżone pH wpływa hamująco na rozwój niepożądanych drobnoustrojów w produktach spożywczych (Śliżewska i in., 2006). Jego silne działanie konserwujące jest skutecznie wykorzystywane w przetwórstwie mięsny i owocowo-warzywnym (Walczycka, 2005; Trojanowska i in., 2009). Stanowi substancję dodatkową, prawnie dozwoloną do stosowania w żywności i określaną symbolem E 270 (Dz. U. nr 232 poz. 1525). Najbardziej pożądanym w produkcji przemysłowej jest enancjomer kwasu mlekowego L(+) (Libudzisz, 2013). Wytwarzany jest on głównie przez homofermentatywne bakterie fermentacji mlekowej należące do rodzaju *Lactobacillus* (Babuchowski i Wzorek, 2003), a w szczególności gatunki *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus delbrückii* (Trojanowska i in., 2009). Jako surowce do produkcji kwasu mlekowego stosuje się na ogół glukozę, sacharozę oraz odpady z przemysłu cukrowniczego i serowarskiego (Libudzisz, 2013).

Dekstrany

Dekstrany zaliczane do α -D-glukanów są produkowane przez bakterie fermentacji mlekowej, należące do egzopolisacharydów bakteryjnych (Górska i in., 2007). Produkowane są przez bakterie fermentacji mlekowej należące do rodzajów *Streptococcus* oraz *Leuconostoc*, głównie gatunku *Leuconostoc mesenteroides* (Quader i in., 2005). Niestety dekstran wytwarzany przez bakterie fermentacji mlekowej z rodzaju *Leuconostoc* wpływa negatywnie na właściwości soków dyfuzyjnych, stąd też unika się obecności tych bakterii w przemyśle cukrowniczym (Libudzisz, 2013).

Bakteriocyny

Bakteriocyny to kolejne produkty metabolizmu gram dodatnich bakterii fermentacji mlekowej (Steinka, 2009), które zostały podzielone na cztery klasy. Najpopularniejszą z nich jest należąca do pierwszej klasy, czyli do lantyo-biotyków – nizyna (Jurkowski i Błaszczuk, 2012). Substancja ta jako jedyna spośród wszystkich bakteriocyn posiada status GRAS, potwierdzający jej bezpieczeństwo użycia. W Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2010 roku w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych z późniejszymi zmianami z dnia 22 kwietnia 2011 roku, nizyna została określona jako konserwant o symbolu E 234. Zamieszczono w nim również informację o jej maksymalnej dozwolonej dawce w poszczególnych produktach żywnościowych (Dz. U. nr 232 poz. 1525; Dz. U. nr 91 poz. 525). Ogólnie związki te nie stanowią zagrożenia dla zdrowia człowieka, ponieważ są hydrolizowane przez enzymy przewodu pokarmowego do łatwo przyswajalnych i nieszkodliwych aminokwasów (Gwiazdowska i Trojanowska, 2005). Bakteriocyny posiadają silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, dzięki czemu znajdują zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu spożywczego, na przykład w przemyśle fermentacyjnym oraz mleczarskim (Jurkowski i Błaszczuk, 2012). Mają również właściwości zapobiegające rozwojowi grzybów strzępkowych (Gwiazdowska i Trojanowska, 2005; Steinka, 2009). Warto zaznaczyć, że w przetwórstwie mięsnym oprócz nizyny wykorzystywane są także bakteriocyny takie jak reuteryna, laktocyna czy sakacyna. Podstawowy kierunek ich wykorzystania to hamowanie rozwoju *Listeria monocytogenes* (Walczycka, 2005). Głównymi producentami bakteriocyn na skalę przemysłową są bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Lactococcus*, a także *Leuconostoc*. Tylko bakteriocyny wytworzone przez bakterie fermentacji mlekowej traktowane są przez przemysł spożywczy jako nieszkodliwe (Steinka, 2009). Za produkcję nizyny odpowiedzialne są paciorkowce *Lactococcus lactis*

(Gwiazdowska i Trojanowska, 2005). Nizyna wykazuje działanie hamujące na różnego rodzaju bakterie zarówno należące do bakterii fermentacji mlekowej, jak i typowe patogeny żywności, w tym bakterie z rodzaju *Salmonella*, *Listeria* czy *Clostridium*. W przypadku tych ostatnich dodatkowo uniemożliwia wytwarzanie przez nie przetrwalników (Słońska i Klimuszko, 2010).

2.6 Preparaty probiotyczne

Probiotyki według obecnie obowiązującej definicji ustalonej przez FAO/WHO to żywe drobnoustroje, które wywierają pozytywne oddziaływanie na organizm konsumenta (Nowak i in., 2010). Do probiotyków zaliczamy bakterie fermentacji mlekowej naturalnie bytujące w przewodzie pokarmowym człowieka, z którego są izolowane (Libudzisz, 2004). Najważniejsze działanie prozdrowotne probiotyków opiera się o zasiedlanie przewodu pokarmowego, zwiększanie odporności organizmu, minimalizację negatywnych skutków przyjmowania antybiotyków, jak na przykład występowanie biegunek, zapobieganie hipercholesterolemii czy produkcji enzymu rozkładającego laktozę, co jest szczególnie korzystne dla osób cierpiących na nietolerancję tego dwucukru. Ponadto przypisuje im się także działanie przeciwnowotworowe (Steinka, 2011; Heczko i in., 2005; Jach i in., 2013). Preparaty te oddziałują także na organizmy zwierząt, dlatego nierzadko znajdują zastosowanie w ich skarmianiu (Reps, 2003). Aby szczep mógł zostać uznany za probiotyczny, konieczne jest naukowe udowodnienie jego prozdrowotnych właściwości (Libudzisz, 2013). Aktualnie są one potwierdzone dla niewielu gatunków bakterii, głównie zaliczanych do rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Najbardziej rozpowszechnione w przemyśle spożywczym są szczepy *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus acidophilus* CRL639, *Lactobacillus casei* Shirota, a także *Streptococcus thermophilus* i inne (Jach i in., 2013; Heczko i in., 2005). Najczęściej dodawane są do mlecznych napojów fermentowanych (Libudzisz, 2013), ale zasięg ich użycia cały czas się powiększa. Nierzadko występują w produktach pochodzenia roślinnego, na przykład różnego rodzaju sokach (Zaręba i Ziarno, 2011). Także przemysł mięsny prowadzi badania nad ich wykorzystaniem w produkcji wędlin (Staruch i Walczycka, 2011). Do pożywienia są dodawane w postaci liofilizatów (Jack i in., 2013). Dla prawidłowego działania bakterii fermentacji mlekowej o charakterze probiotyków ważna jest ich liczebność oraz sposób obróbki technologicznej. Przyjmuje się, że minimalna liczba żywych bakterii probiotycznych w gotowym produkcie to 10^6 jtk/g lub ml produktu (Trafalska i Grzybowska, 2004).

2.7 Literatura

- Adnan A. F. M., Tan I. K. P., 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, nr 98, s. 1380-1385.
- Aguilar G., Morlon-Guyot J., Trejo-Aguilar T., Guyot J. P., 2000. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihottivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, nr 27, s. 406-413.
- Ahrné S., Nobaek S., Jeppsson B., Adlerberth I., Wold A. E., Molin G., 1998. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Journal of Applied Microbiology*, nr 85, s. 88-94.
- Albano H., Oliveira M., Aroso R., Cubero N., Hogg T., Teixeira P., 2007. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from "Alheiras" (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays. *Meat Science*, nr 76, s. 796-800.
- Albesharat R., Ehrmann M. A., Korakli M., Yazaji S., Vogel R. F., 2011. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*, nr 34, s. 148-155.
- Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small scale facility 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, nr 17, s. 454-461.
- Anyogu A., Awamaria B., Sutherland J. P., Ouoba L. I. I., 2014. Molecular characterisation and antimicrobial activity of bacteria associated with submerged lactic acid cassava fermentation. *Food Control*, nr 39, s. 119-127.
- Arici M., Bilgia B., Sagdic O., Ozdemir C., 2004. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. *Food Microbiology*, tom 21, nr 1, s. 19- 24.
- Babuchowski A., Wzorek W., 2003. Technologie fermentacyjne, w Bednarski W., Reps A.. *Biotechnologia żywności*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne.
- Benito M. J., Martín A., Aranda E., Pérez-Nevado F., Ruiz-Moyano S., Córdoba M. G., 2007. Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented Salchichón and Chorizo sausages. *Journal of Food Science*, nr 72, s. 193-201.
- Bernardeau M., Vernoux J. P., Henri-Dubernet S., Guéguen M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, tom 65, nr 5, s. 2326-2335.
- Bove P., Russo P., Capozzi V., Gallone A., Spano G., Fiocco D., 2013. *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: Carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiological Research*, nr 168, s. 351-359.
- Budzyńska A., Kaczmarek A., Gospodarek E., 2008. Diagnostyka molekularna bakteryjnych zakażeń krwi. *Borgis - Postępy Nauk Medycznych*, nr 12, s. 828-833.
- Chabłowska B., Piasecka-Józwiak K., Stecka K., 2009. Rola drobnoustrojów w produkcji żywności. Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa.
- Clarke S. C., Haigh R. D., Freestone P. P. E., Williams P. H., 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, tom 6, nr 3, s. 365-378.
- Clementi F., Aquilanti L., 2011. Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *Anaerobe*, nr 17, s. 394-398.
- Czarnecki Z., Czarnecka M., 2006. Tradycyjne wykorzystanie mikroorganizmów w produkcji żywności, w Gawęcki J., Libudzisz Z.. *Mikroorganizmy w żywności i żywieniu*, Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu.
- Danielsen M., 2002. Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. *Plasmid*, nr 48, s. 98-103.
- De Vriesa M. C., Vaughanb E. E., Kleerebezem a M., de Vos W. M., 2006. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, nr 16, s. 1018-1028.
- De Vuyst L., Degeest B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, nr 23, s. 153-177.
- De Vuyst L., Vandamme E.J., 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst L., Vandamme E.J. (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic and Professional, London.
- Dzierżanowska D., 2009. Mikroflora fizjologiczna człowieka. Opieka paliatywna nad dziećmi, tom 17, s. 157-161.

Dz. U. nr 232 poz. 1525: Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2010 roku w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych.

Dz. U. nr 91 poz. 525: Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2011 roku zmieniające rozporządzenie w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych.

Enan G., El-Essawy A.A., Uyttendaele M., Debevere J., 1996. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UGI isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG 1. International Journal of Food Microbiology, nr 30, s. 189-215.

Espirito-Santo A.P., Mouquet-Rivier C., Humblot C., Cazevielle C., Icard-Vernière C., Soccol C. R., Guyot J. P., 2014. Influence of cofermentation by amylolytic *Lactobacillus* strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gruels made of rice, soy milk and passion fruit fiber. Food Research International nr 57, s. 104-113.

Fernández L., Langa S., Martín V., Maldonado A., Jiménez E., Martín R., Rodríguez J. M., 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. Pharmacological Research, nr 69, s. 1-10.

Fiedurek J., 2014. Mikrobiom a zdrowie człowieka. Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Flórez A. B., Delgado S., Mayo B., 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. Canadian Journal of Microbiology, nr 51, s. 51-58.

Gajewska J., Błaszczuk M. K., 2012. Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). Postępy Mikrobiologii, tom 51, nr 1, s. 55-65.

Gómez D., Azón E., Marco N., Carramiñana J. J., Rota C., Ariño A. Yangüela J., 2014. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. Food Microbiology, nr 42, s. 61-65.

González L., Sandoval H., Sacristán N., Castro J. M., Fresno J. M., Tornadizo M. E., 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genetoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. Food Control, nr 18, s. 716-722.

Górecki R. K., Bardowski R. K., 2011. Molekularne mechanizmy oporności bakterii kwasu mlekowego na bakteriofagi. Postępy Mikrobiologii, tom 50, nr 4, s. 265-273.

Górska S., Grycko P., Rybka J., Gamian A., 2007. Egzopolisacharydy bakterii kwasu mlekowego – biosynteza i struktura. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, nr 61, s. 805-818.

Górska S., Jarzab A., Gamian A., 2009. Bakterie probiotyczne w przewodzie pokarmowym człowieka jako czynnik stymulujący układ odpornościowy. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, nr 63, s. 653-667.

Grajeta H., 2004. Żywność funkcjonalna w profilaktyce chorób układu krążenia. Advances in Clinical and Experimental Medicine, tom 13, nr 3, s. 503-510.

Grzegorzczak A., 2010. Z cyklu napoje fermentowane - Mleko acidofilne, lody jogurtowe, szampan serwatkowy. Część trzecia. Aptekarz Polski. Pismo Naczelnej Izby Aptekarskiej, nr 45/23.

Gu R. X., Yang Z. Q., Li Z. H., Chen S. L., Luo Z. L., 2008. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. Anaerobe, nr 14, s. 313-317.

Guidone A., Zotta T., Ross R. P., Stanton C., Rea M. C., Parente E., Ricciardi A., 2014. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: A multivariate screening study. LWT - Food Science and Technology, nr 56, s. 69-76.

Gwiazdowska D., Trojanowska K., 2005. Bakteriocynty – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. Biotechnologia, tom 68, nr 1, s. 114-130.

Halami P. M., Chandrashekar A., Nand K., 2000. *Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bactericidal and antibiotic assay. Letters in Applied Microbiology, tom 30, nr 3, s. 197-202.

Haller D., Colbus H., Ganzle 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, nr 24, s. 218-226.

Heczko P. B., Strus M., Jawień M., Szymański H., 2005. Medyczne zastosowanie probiotyków. Wiadomości lekarskie, nr 58, s. 11-12.

Heilig H. G. H. J., Zoetendal E. G., Vaughan E. E., Marteau P., Akkermans A. D. L., De Vos W. M., 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. Applied and Environmental Microbiology, tom 68, nr 1, s. 114-123.

Hemme D., Foucaud-Scheunemann K., 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technolo-

gy and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, nr 14, s. 467-494.

Herreros M. A., Sandoval H., González L., Castro J. M., Fresnoa J. M., Tornadizo M. E., 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, nr 22, s. 455-459.

Holland R., 2011. Lactic acid bacteria. *Leuconostoc* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition), s. 138-142.

Hosseini H., Hippe B., Denner E., Kollegger E., Haslberger A., 2012. Isolation, identification and monitoring of contaminant bacteria in Iranian Kefir type drink by 16S rDNA sequencing. *Food Control*, nr 25, s. 784-788.

Iranmanesh M., Ezzatpanah H., Mojgani N., 2013. Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *LWT - Food Science and Technology*, s. 1-5.

Jach M., Łoś R., Maj M., Malm A., 2013. Probiotyki – aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Postępy Mikrobiologii*, tom 52, nr 2, s. 161-170.

Jacobsen C.N., Rosenfeldt Nielsen V., Hayford A.E., Møller P.L., Michaelsen K.F., Poerregaard A., Sandström B., Tvede M., Jakobsen M., 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, nr 65, s. 4949-4956.

Jones R. J., Hussein H. M., Zagorec M., Brightwell G., Tagg J. R., 2008. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*, nr 25, s. 228-234.

Jałosińska M., 2007. Przeżywalność szczepu probiotycznego w napoju bananowo- mlecznym w zależności od dodatku różnych prebiotyków. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, tom 55, nr 6, s. 127-137.

Jang S., Lee J., Jung U., Choi H. S., Suh H. J., 2014. Identification of an anti- listerial domain from *Pediococcus pentosaceus* T1 derived from Kimchi, a traditional fermented vegetable. *Food Control*, nr 43, s. 42-48.

Jongnurakkun B., Wang Q., Xu S. H., Tada Y., Minamida K., Yasokawa D., Sugi M., Hara H., Asano K., 2008. *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, tom 106, nr 1, s. 69-73.

Jurkowski M., Błaszczuk M., 2012. Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna bakterii fermentacji mlekowej. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych*, tom 61, nr 3, s. 493-504.

Kang J. H., Lee M. S., 2005. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Pediococcus acidilactici* GMB7330 isolated from infant feces. *The Korean Journal of Microbiology*, nr 41, s. 152-156.

Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, nr 2, 123-140.

Kawka A., Rausch P., Świerczyński J., 2007. Możliwości stosowania kultur starterowych do produkcji pieczywa pszenno-jęczmiennego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, tom 55, nr 6, s. 219-233.

Klaenhammer, T. R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, nr 12, s. 39-85.

Klocke M., Mundt K., Idler C., McEniry J., O'Kiely P., Barth S., 2006. Monitoring *Lactobacillus plantarum* in grass silages with the aid of 16S rDNA-based quantitative real-time PCR assays. *Systematic and Applied Microbiology*, nr 29, s. 49-58.

Kołożyn-Krajewska D., 2010. Jakość mikrobiologiczna mięsa i jego przetworów. *Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*.

Kołożyn-Krajewska D., Sikora T., 2004. *Towaroznawstwo żywności*. Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne Spółka Akcyjna.

Kraszewska J., Wzorek W., Sztando E., Raczyńska-Cabaj A., 2005. Aktywność antagonistyczna bakterii fermentacji mlekowej z gatunku *Lactobacillus plantarum*. *Acta Scientiarum Polonorum*, tom 1, nr 4, s. 39-52. Lada E. H., 2008. *Agro biznes. Podstawy przetwórstwa spożywczego*. Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne Spółka Akcyjna.

Landeta G., Curiel J.A., Carrascosa A.V., Muñoz R., De las Rivas B., 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Science*, nr 95, s. 272-280.

Lee Y. J., Yu W. K., Heo T. R., 2003. Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *International Journal of Antimicrobial*, nr 21, s. 340-346.

Libudzisz Z., 2004. Mikroflora jelitowa człowieka a probiotyki. *Zakażenia*, nr 6, s. 49-51.

Libudzisz Z., 2013. Bakterie fermentacji mlekowej, w Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. Mikrobiologia techniczna. Tom 2. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności. Wydawnictwo Naukowe PWN.

Liu C., Zhang Z. Y., Dong K., Yuan J. P., Guop X. K., 2009. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, nr 22, s. 401-412.

Lutyńska A., Augustynowicz E., Wiatrzyk A., 2012. Problemy stosowania suplementów diety zawierających probiotyki. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, tom 93, nr 3, s. 493-498.

Martín R., Jiménez E., Olivares M., Marín M.L., Fernández L., Xaus J., Rodríguez J.M., 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International Journal of Food Microbiology*, nr 112, s. 35-43.

Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Martín M., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J. M., 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*, nr 143, s. 754-758.

Martins A., Riboli D. F. M., Pereira V. C., de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha M., 2014. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a Brazilian university hospital. *The Brazilian Journal of Infectious diseases*, tom 18, nr 3, s. 331-335.

Mathur S., Singh R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *International Journal of Food Microbiology*, nr 105, s. 281-295.

Messers W., De Vuyst L., 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs – a review. *International Journal of Food Microbiology*, nr 72, s. 31-43.

Mitsou E. K., Kirtzalidou E., Oikonomou I., Liosis G., Kyriacou A., 2008. Fecal microflora of Greek healthy neonates. *Anaerobe*, nr 14, s. 94-101.

Mojka K., 2013. Charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, tom 94, nr 4, s. 722-729.

Molin G., Jeppsson B., Ahrné S., Johansson M.-L., Nobaek S., Ståhl M., Bengmark S., 1993. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *Journal of Applied Bacteriology*, nr 74, s. 314-323.

Moneta J., Piątkiewicz A., 2010. Bakterie, w Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. Mikrobiologia techniczna. Tom 1. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania. Wydawnictwo Naukowe PWN.

Monteagudo-Mera A., Rodríguez-Aparicio L., Rúa J., Martínez-Blanco H., Navasa N., García-Armento M. R., Ferrero M. A., 2012. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, nr 4, s. 531-541.

Moraes P. M., Perin L. M., Ortolani M. B. T., Yamazi A. K., Viçosa G. N., Nero L. A., 2010. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT - Food Science and Technology*, tom 43, nr 9, s. 1320-1324.

Neffe-Skocińska K., Gierjekiewicz M., Kotożyn-Krajewska D., 2011. Optymalizacja warunków procesu fermentacji połącząc surowo dojrzewających z dodatkiem bakterii probiotycznych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, tom 79, nr 6, s. 36-46.

Nowak A., Śliżewska K., Libudzisz Z., 2010. Probiotyki – historia i mechanizmy działania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, tom 71, nr 4, s.5-19.

Nowak M., Trziszka T., Szołtysik M., 2007. Preferencje konsumentów mlecznych napojów fermentowanych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, tom 50, nr 1, s. 77-83.

Odamki T., Yonezawa S., Sugahara H., Xiao J., Yaeshima T, Iwatsuki K., 2011. A one step genotypic identification of *Lactococcus lactis* subspecies at the species/strain levels. *Systematic and Applied Microbiology*, nr 34, s. 429-434.

Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł., 2013. Odpowiedź bakterii fermentacji mlekowej na stres – stadium VBNC. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, tom 90, nr 5, s. 15-28.

Osmanagaoglu O., Beyatli Y., Gunduz U., 2001. Isolation and characterization of pediocin producing *Pediococcus pentosaceus* Pep1 from Vacuum-Packed Sausages. *Turkish Journal of Biology*, nr 25, s. 133-143.

Pan L., Hu X., Wang X., 2011. Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. *Food Control*, nr 22, s. 1316-1321.

Papagianni, M., Anastasiadou, S., 2009. Pediocins: the bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*, tom 8, nr 1, s. 1-16.

Petrov K., Urshhev Z., Petrova P., 2008. L(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. *Food Microbiology*, nr 25, s. 550-557.

- Piasecka-Jóźwiak K., Chabłowska B., Stówik E., Rozmierska J., Stecka K. M., 2006. Zastosowanie kultur starterowych (wyselekcjonowanych szczepów bakterii mlekowych) do poprawy jakości pieczywa mieszanego i żytniego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, tom 46, nr 1, s. 100-113.
- Pintado J., Guyot J. P., Raimbault M., 1999. Lactic acid production from mussel processing wastes with an amylolytic bacterial strain. *Enzyme and Microbial Technology*, nr 24, s. 590-598.
- Plumed-Ferrer C., Usiskyla A., Korhonen J., Von Wright A., 2013. Characterization of *Lactococcus lactis* isolates from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, nr 167, s. 592-599.
- Qader S. A., Iqbal L., Aman A., Shireen E., Azhar A., 2005. Production of dextran by newly isolated strains of *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4 and PCSIR-9. *Turkish Journal of Biochemistry*, tom 31, nr 1, s.21-26.
- Reddy G., Altaf Md., Naveena B. J., Venkateshwar M., Vijay Kumar E., 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – a review. *Biotechnology Advances*, nr 26, s. 22-34.
- Reps A., 2003. Biotechnologia składników żywności, w Bednarski W., Reps A.. *Biotechnologia żywności*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne.
- Rodak E., 2011. Antybiotykooporność bakterii kwasu mlekowego. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, tom 44, nr 2, s. 204-211.
- Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Poeta P., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C., 2006. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, nr 111, s. 234-240.
- Rozmierska J., Uzar A., Stecka K. M., Chabłowska B., Piasecka-Jóźwiak K., Stówik E., Szkudzińska-Rzeszowiak E., 2013. Zastosowanie kultur starterowych bakterii fermentacji mlekowej do produkcji pieczywa z wysokim udziałem mąki owsianej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, tom 86, nr 1, s. 166-180.
- Rubio R., Jofré A., Martín B., Aymerich T., Garriga M., 2014. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology*, tom 38, s. 303-311.
- Ruiz-Moyano S., Martín A., Benito M. J., Pérez-Navado F., Córdoba M. G., 2008. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, nr 80, s. 715-721.
- Samet A., Bronk M., 2008. *Bifidobacterium* – drobnoustroje probiotyczne. URL: <http://www.alergologia.org/spis-publicacji/44-iv-zimowe-warsztaty-sekcyj-dermatologicznej-pta-/719-Bifidobacterium-drobnoustroje-probiotyczne>
- Shibata K., Flores D. M., Kobayashi G., Sonomoto K., 2007. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. *Enzyme and Microbial Technology*, nr 41, s. 149-155.
- Şimşek Ö., Çon A. H., Tulumoğlu Ş., 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control*, nr 17, s. 263- 270.
- Sip A., Krasowska M., Więckowicz M., Grajek W., 2009. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, tom 62, nr 1, s. 5-26.
- Sip A., Więckowicz M., Olejnik-Schmidt A., Grajek W., 2012. Anti-Listeria activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food Control*, nr 26, s.117-124.
- Siragusa S., De Angelis M., Calasso M., Campanella D., Minervini F., Di Cagno R., Gobbetti M., 2014. Fermentation and proteome profiles of *Lactobacillus plantarum* strains during growth under food-like conditions. *Journal of proteomics*, nr 96, s. 366-380.
- Stońska A., Klimuszko D., 2010. Bakteriocynty probiotycznych pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*. *Postępy Mikrobiologii*, tom 10, nr 2, s. 87-96.
- Smith J. L., Palumbo S. A., 1981. Microorganisms as food additives. *Journal of Food Protection*, nr 44, s. 936-955.
- Solís G., De los Reyes-Gavilan C.G., Fernández N., Margolles A., Gueimonde M., 2010. Establishment and development of lactis acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*, nr 16, s. 307- 310.
- Staniewicz J., 2009. Jakość mleknych napojów fermentowanych suplementowanych dodatkiem pochodzenia roślinnego. *Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej w Gdyni*, nr 61, s. 39-44.
- Staruch L., Walczycka M., 2011. Projektowanie cech jakościowych mięsnych wyrobów fermentowanych poprzez dodatek kultur starterowych. *Żywność projektowana designed food*, część I, rozdział 12, s. 161-178.
- Steinka I., 2009. Innowacje technologiczne a bezpieczeństwo żywności. *Annales Academiae Medicae Gedanensis*, nr 39, s. 123-132.
- Steinka I., 2011. Wybrane aspekty stosowania probiotyków. *Annales Academiae Medicae Gedanensis*, nr 41, s. 97-108.

Strus M., 1998. Nowa metoda oceny antagonistycznego działania bakterii kwasu mlekowego (LAB) na wybrane, chorobotwórcze bakterie wskaźnikowe. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, nr 50, s. 123-130.

Szydłowska A., Kołożyn-Krajewska D., 2010. Zastosowanie bakterii potencjalnie probiotycznych do fermentacji przecieru z dyni. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, tom 73, nr 6, s. 109-119.

Śliżewska K., Biernasiak J., Libudzisz Z., 2006. Probiotyki jako alternatywa dla antybiotyków. *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej. Chemia spożywcza i biotechnologia*, z. 70, nr 984.

Todorov S. D., Dicks L.-M. T., 2009. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *International Journal of Food Microbiology*, nr 132, s. 117-126.

Trafalska E., Grzybowska K., 2004. Probiotyki – alternatywa dla antybiotyków? *Wiadomości lekarskie*, tom 57, nr. 9-10, s. 491-498.

Trojanowska K., Giebel H., Gołębiowska B., 2009. *Mikrobiologia żywności*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Trzaskowska M., 2013. Probiotyki w produktach pochodzenia roślinnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, tom 89, nr 4, s. 5-20.

Tsai C.-C., Lin P.-P., Hsieh Y.-M., 2008. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown *in vitro*. *Anaerobe*, nr 14, s. 61-67.

Vidhyasagar V., Jeevaratnam K., 2013. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties *in vitro*. *Journal of functional foods*, nr 5, s. 235-243.

Vishnu C., Seenayya G., Reddy G., 2002. Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, nr 18, s. 429- 433.

Vos P., Garrity G., Johnem D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B., 2009. *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*. Wydanie drugie, tom III – The Fimicutes. Wydawnictwo Springer.

Walczycka M., 2005. Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, tom 43, nr 2, s. 61-72.

Walter J., Hertel C., Tannock G. W., Lis C. M., Munro K., Hammes W. P., 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, tom 67, nr 6, s. 2578- 2585.

Yonezawa S., Xiao J. Z., Odamaki T., Ishida T., Miyaji K., Yamada A., Yaeshima T., Iwatsuki K., 2010. Improved growth of bifidobacteria by co- cultivation with *Lactococcus lactis* subspecies. *lactis*. *Journal of Dairy Science*, nr 93, s. 1815-1823.

Zaręba D., Ziarno M., 2011. Alternatywne probiotyczne napoje warzywne i owocowe. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, tom 54, nr 2, s. 160-168.

Zhou N., Zhang J. X., Fan M. T., Wang J., Guo G., Wei X. Y., 2012. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. *Journal of Dairy Science*, nr 95, s. 4775-4783.

Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D., Sidarenka A. V., Novik I. G., 2012. Wzrost i przeżywalność bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w napoju sojowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, tom 83, nr 4, s. 86-97.

Zielińska K., Fabiszewska A., Stecka K., Wróbel B., 2013. Rola bakterii fermentacji mlekowej w poprawie jakości mikrobiologicznej kiszzonek z runi łąkowej w gospodarstwach ekologicznych *Woda – Środowisko – Obszary Wiejskie*, tom 13, zeszyt 1, s. 171-182.

3. WYNIKI BADAŃ JAKOŚCI I BIOFUNKCJONALNOŚCI PRODUKTÓW PROBIOTYCZNYCH



3.1 Ocena jakości produktów probiotycznych

Jednym z kluczowych czynników, który decyduje o komercyjnym sukcesie produktu jest jego jakość. W przypadku płynnych produktów probiotycznych o jakości decyduje liczebność drobnoustrojów w całym okresie przydatności do spożycia, ich witalność, a także zachowane cechy sensoryczne produktu.

3.1.1 Liczebność drobnoustrojów w naszych produktach

Odpowiednia liczebność drobnoustrojów probiotycznych w produkcie warunkuje jego biofunkcjonalność, a także decyduje o jego pozycji rynkowej. W przedsiębiorstwie Living Food sp. z o.o. prężnie działa laboratorium mikrobiologiczne. Warto zaznaczyć, że od roku 2018 zostało ono znacznie rozbudowane. Nowoczesne wyposażenie i fachowa kadra codziennie czuwa nie tylko nad jakością produktów, ale także nad stanem higienicznym całego zakładu. Analizy mikrobiologiczne naszych produktów są wykonywane zarówno w kierunku drobnoustrojów pożądaných jak bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, ale także w kierunku drobnoustrojów niepożądanych jak drożdże, pleśnie, bakterie z rodzaju *Salmonella* sp., bakterie z rodzaju *Listeria* sp. czy pałeczki z grupy coli. Produkty są analizowane już na etapie produkcji (namnażanie i stabilizacja produktu), a także po zakończonym bioprociesie oraz wybiórczo, na etapie magazynowania.

Metodyka

Liczebność drobnoustrojów oznaczamy metodą zalewową Kocha. Dziesięć gramów próby jest zawieszanych w 90 ml 0,9% roztworu soli fizjologicznej i energicznie wytrząsanych. Z powstałej zawiesiny komórek wykonywane są rozcieńczenia dziesiętne od 10^{-1} do 10^{-8} . Z wybranych rozcieńczeń pobierany jest

1 ml roztworu i nanoszony na jałowe płytki Petriego. Następnie płytki są zalewane upłynnionymi i odpowiednio schłodzonymi pożywkami: MRS agar, BSM agar, PD agar, agar wzbogacony z glukozą. Do oznaczania drobnoustrojów patogennych wykorzystywane są uznawane metody normatywne. Po zestaleniu podłoża, próby są inkubowane przez 48-72 h w temperaturze odpowiedniej dla danej grupy drobnoustrojów. Hodowle bakterii fermentacji mlekowej i drożdży prowadzone są w warunkach tlenowych, natomiast bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w warunkach beztlenowych z wykorzystaniem anaerostatów.

Wyniki

**BAKTERIE Z RODZAJU
*LACTOBACILLUS***

min. 2.0×10^7 jtk/g

**BAKTERIE Z RODZAJU
*BIFIDOBACTERIUM***

min. 2.0×10^7 jtk/g

Wnioski

- Skład jakościowo-ilościowy naszych produktów spełnia wymagania stawiane produktom probiotycznym.

3.1.2 Ocena makroskopowa kolonii bakterii probiotycznych

Fenotyp kolonii bakterii świadczy o ich stanie fizjologicznym, w tym witalności. Ponadto każda grupa drobnoustrojów charakteryzuje się określonym typem wzrostu zarówno w podłożach płynnych, jak i w podłożach stałych. Wieloletnie doświadczenie i wnikliwa obserwacja fenotypu kolonii bakterii nierzadko pozwala nam scharakteryzować stan fizjologiczny drobnoustrojów, które ją tworzą. Kolonie dobrze widoczne, o intensywnej barwie i typowym zapachu świadczą o dobrej kondycji drobnoustrojów. Kolonie niewielkich rozmiarów, drobne, słabo widoczne mogą świadczyć o tym, że drobnoustroje, które wchodzi w jej skład zostały narażone na stres środowiskowy albo na etapie hodowli, albo w trakcie wykonywania oznaczenia. Stan fizjologiczny komórek drobnoustrojów probiotycznych nie jest bez znaczenia. Nawet gdy ich liczebność w produkcie jest wystarczająca, to słaba witalność może w konsekwencji uniemożliwić spełnienie pożądanej funkcji w organizmie. Różnice w fenotypie kolonii bakterii po-

zyskanych z płynnych produktów probiotycznych i liofilizatów dobrze obrazuje ostatnia fotografia w tym podrozdziale.

W przykładowym laboratorium mikrobiologicznym prowadzimy wnikliwe obserwacje kolonii bakterii oraz samych komórek podczas obserwacji mikroskopowych, co pozwala nam dokonać oceny kondycji drobnoustrojów zarówno w trakcie procesu produkcyjnego, jak i w czasie przechowywania gotowych produktów.

Metodyka

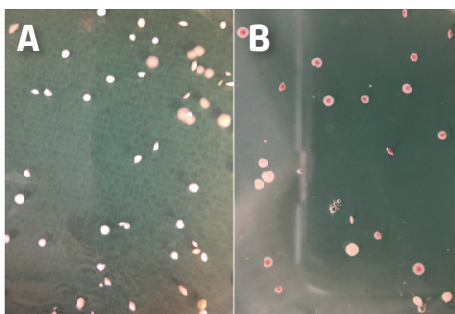
Do makroskopowej oceny mikroorganizmów wykorzystujemy metodę posiewu redukcyjnego na agarze MRS lub podłożu BSM agar. Szczególną uwagę zwracamy na pojedyncze kolonie w trzeciej i czwartej strefie posiewu. W opisie kolonii brane są pod uwagę takie wskaźniki jak wielkość, średnica, kształt, brzeg, powierzchnia, przejrzystość, barwa, otoczenie kolonii i charakter wzrostu.

Z wybranych pojedynczych kolonii wykonywane są preparaty mikroskopowe, które następnie są barwione metodą Grama. Obserwacje są prowadzone w jasnym polu, w mikroskopie firmy Zeiss, w powiększeniu 1000 razy.

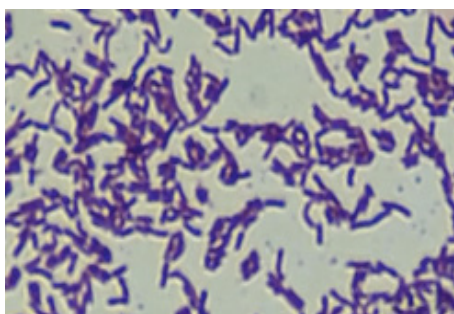
Wyniki

Tab. Ocena mikroskopowa bakterii na podstawie barwienia metodą Grama

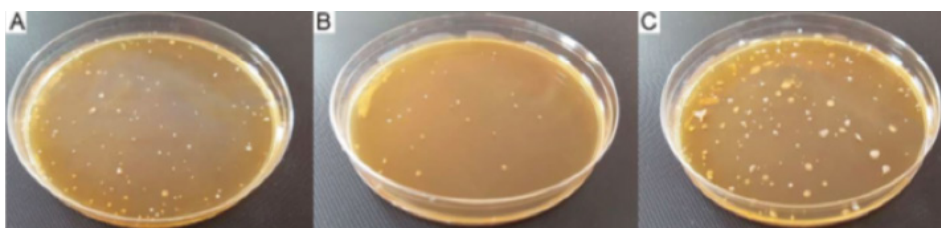
Gatunek/szczep	Morfologia	w 200 ml	Katalaza	Charakterystyka kolonii na podłożu stałym
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Laseczki gram dodatnie	łańcuszki	-	Mleczno - białe, ciężkowane, wrosnięte w podłoże
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR04	Laseczki gram dodatnie	łańcuszki	-	Mleczno - białe, ciężkowane, wrosnięte w podłoże
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR05	Laseczki gram dodatnie	łańcuszki	-	Mleczno - białe, ciężkowane, wrosnięte w podłoże
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA1	Laseczki gram dodatnie	łańcuszki	-	Mleczno - białe, ciężkowane, wrosnięte w podłoże
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> LB2	Laseczki gram dodatnie	łańcuszki	-	Mleczno - białe, ciężkowane, wrosnięte w podłoże
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP02	Laseczki gram dodatnie	łańcuszki	-	Mleczno - białe, ciężkowane, wrosnięte w podłoże
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP01	Laseczki gram dodatnie	łańcuszki	-	Mleczno - białe, ciężkowane, wrosnięte w podłoże
<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 2	Laseczki gram dodatnie	łańcuszki	-	Mleczno - białe, ciężkowane, wrosnięte w podłoże
<i>Bifidobacterium breve</i> BL10	Pateczki gram dodatnie	łańcuszki, palisady	-	Drobne okrągłe kolonie, brunatno-czerwone
<i>Bifidobacterium breve</i> Bbr8	Pateczki gram dodatnie	łańcuszki, palisady	-	Drobne okrągłe kolonie, brunatno-czerwone z białą otoczką
<i>Bifidobacterium longum</i> BL03	Pateczki gram dodatnie	łańcuszki, palisady	-	Drobne okrągłe kolonie, brunatno-czerwone z białą otoczką
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bi 1 MDX	Pateczki gram dodatnie	łańcuszki, palisady	-	Drobne okrągłe kolonie, brunatno-czerwone z białą otoczką
<i>Streptococcus thermophilus</i> Z57	Ziarniaki gram dodatnie	pacioreki	-	Drobne, okrągłe, białe
<i>Streptococcus thermophilus</i> 9Y	Ziarniaki gram dodatnie	pacioreki	-	Drobne, okrągłe, białe
<i>Lactobacillus casei</i> 101/37	Laseczki gram dodatnie	łańcuszki Y	-	Mleczno - białe, ciężkowane, wrosnięte w podłoże



Fot. Wzrost kolonii bakterii na podłożu stałym
a) *Lactobacillus* b) *Bifidobacterium*



Fot. Obraz mikroskopowy bakterii *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103)
(powiększenie mikroskopu 1000 x)



Fot. Obraz prezentujący różnice pomiędzy fenotypem kolonii drobnoustrojów probiotycznych

A i B – kolonie pochodzące z produktów liofilizowanych, C – kolonie pochodzące z produktów płynnych

Wnioski

- Drobnoustroje wchodzące w skład produktów charakteryzują się cechami typowymi dla grupy do której przynależą.

3.1.3 Profil metabolitów drobnoustrojów probiotycznych obecnych w naszych produktach

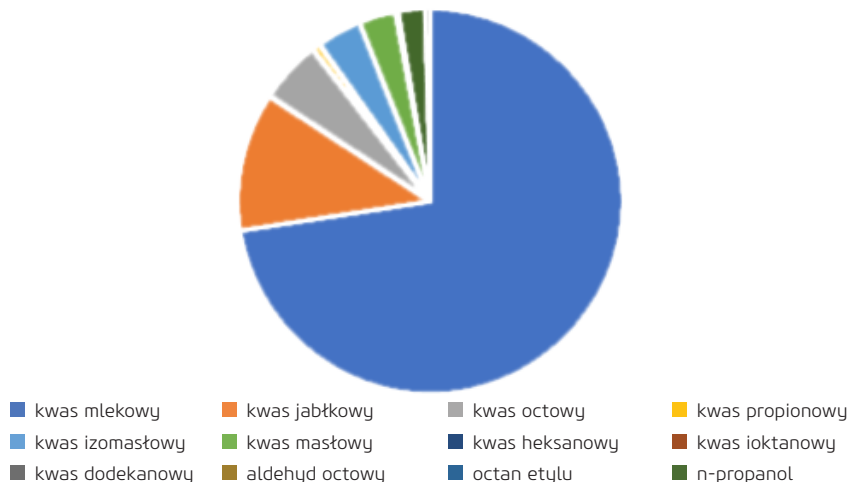
Każda grupa drobnoustrojów charakteryzuje się określonym profilem metabolitów, który wynika z ich metabolizmu. Drobnoustroje pobierają składniki odżywcze z podłoża w celu zachowania procesów życiowych, w tym rozmnażania. Metabolizując składniki pożywki syntetyzują metabolity takie jak kwasy organiczne, alkohole czy glicerol. Metabolity wydzielane na zewnątrz komórki są wykorzystywane przez drobnoustroje zdolne do ich produkcji, jako element systemu chroniącego komórkę lub zapewniającego homeostazę. Obecność metabolitów drobnoustrojów probiotycznych w gotowych produktach ma istotne

znaczenia w aspekcie ich biofunkcjonalności, a także gwarantuje ich stabilność i trwałość. Głównymi metabolitami drobnoustrojów probiotycznych jest kwas mlekowy, octowy i propionowy, stanowiące produkty homo- i heterofermentacji mlekowej. Najsilniejszymi właściwościami hamującymi rozwój drobnoustrojów charakteryzuje się kwas octowy. Skutecznie hamuje wzrost bakterii, pleśni i drożdży. Działanie kwasów organicznych w znacznym stopniu polega na obniżaniu pH środowiska do poziomu niekorzystnego dla patogenów, a także na zaburzaniu procesów metabolicznych zachodzących w komórkach drobnoustrojów niepożądanych oraz transportu aktywnego przez błony komórkowe. Innym ważnym metabolitem jest diacetyl. Jest to lotny, niepolarny diketon powstający z rozkładu pirogronianu. Wytwarzany jest przez niektóre szczepy z rodzaju *Lactobacillus*, *Leuconostoc* oraz *Streptococcus*. Wykazuje właściwości bakteriobójcze względem niektórych gram-ujemnych bakterii przez inaktywację szlaku metabolicznego argininy. W warunkach tlenowych bakterie mlekowe produkują także nadtlenek wodoru, którego obecność stanowi efekt działania oksydazy flawoproteinowej oraz peroksydazy NADH. Związek posiada silne właściwości antymikrobiologiczne, polegające na denaturacji enzymów komórkowych i peroksydacji lipidów błonowych, tym samym prowadząc do zaburzenia czynności błon komórkowych oraz zatrzymania wielu szlaków metabolicznych. Kolejnym istotnym metabolitem jest ditlenek węgla, który stanowi produkt uboczny heterofermentacji mlekowej, a wykazuje działanie bakteriobójcze, szczególnie przeciwko bakteriom gram-ujemnym. Bakteriocynty są substancjami o charakterze białkowym lub peptydowym, syntetyzowanymi przez większość szczepów bakterii, zarówno gram-dodatnich oraz gram-ujemnych. Synteza bakteriocyn ma miejsce w rybosomach, a bakteriocynogenne mikroorganizmy są odporne na wytwarzane przez siebie substancje.

Metodyka

Skład ilościowy i jakościowy produktów probiotycznych oznaczano techniką wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z wykorzystaniem chromatografu Agilent Technologies 1200 series. W skład układu chromatografu wchodził: automatyczny podajnik prób G1329B, podwójna pompa G1312B z detektorem refraktometrycznym G1362A. Rozdziału dokonywano na kolumnie Rezex ROA. Na kolumnę nanoszono 10 µl próby, fazę ruchomą stanowił 0,005 N H₂SO₄. Szybkość przepływu wynosiła 0,6 ml/min w temperaturze 40°C. Identyfikację oznaczanych związków chemicznych przeprowadzono metodą standardu zewnętrznego, mierząc pole powierzchni pod pikami (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem ChemStation for LC 3D systems, Agilent).

Wyniki



Rys. Profil metabolitów wchodzących w skład produktów probiotycznych

W produktach probiotycznych stwierdzono obecność 11 związków wykazujących biofunkcyjność i antyseptyczne właściwości: kwas walerianowy, kwas heptanowy, kwas octowy, kwas benzoesowy, ester etylowy, ester 2-metylobytylowy, ester 2-etyloheksylowy, ester metylowy, aldehyd benzoesowy, 1,2-propanediol i dodekalanol.

3.1.4 Aktywność antimikrobiologiczna drobnoustrojów i ich metabolitów obecnych w produktach względem mikroorganizmów wskaźnikowych

Aktywność antagonistyczna bakterii probiotycznych jest ściśle związana z syntezą specyficznych produktów hamujących wzrost niepożądanych drobnoustrojów (m.in. kwasów organicznych), które działają synergistycznie. Należy zaznaczyć, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa bakterii jest cechą szeregową, wynikającą ze specyficznej interakcji między szczepem bakteryjnym a szczepem wskaźnikowym. Mechanizm aktywności antagonistycznej bakterii probiotycznych nie jest dokładnie poznany. Przypuszcza się, że polega on na zmianie warunków środowiska pod wpływem wytwarzania kwasów organicznych i innych metabolitów niekorzystnych dla wzrostu drobnoustrojów niepożądanych. Do takich czynników środowiskowych należą: temperatura, pH, skład podłoża, przy których bakterie mlekowe wytwarzają produkty o aktywności przeciwwgrzybowej i przeciwbakteryjnej.

Metodyka

W celu oznaczenia antagonizmu produktów zawierających drobnoustroje probiotyczne względem mikroorganizmów wskaźnikowych przeprowadzono badania, które obejmowały przygotowanie mikroorganizmów wskaźnikowych i badanie aktywności izolatów metodą studzienkową.

W testach wykorzystano mikroorganizmy wskaźnikowe wymienione w tabeli poniżej. Szczepy wskaźnikowe przeniesiono do probówek zawierających 10 ml podłoża bulionowego z dodatkiem 2% glukozy (w celu namnożenia biomasy). Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Następnie w celu uzyskania wyraźnej warstwy murawkowej, upłynnionego podłoża agarowego zaszczerpiono 10% (v/v) 24-godzinną hodowlą kultury wskaźnikowej i wylano na płytki Petriego. Na powierzchnię stałej pożywki zaszczerpionej mikroorganizmami wskaźnikowymi nanoszono punktowo 20 µL badanego produktu. Inkubację prowadzono w 37°C przez 24 godziny, w warunkach beztlenowych lub względnie beztlenowych. Następnie mierzono średnice strefy zahamowania lub ograniczenia wzrostu bakterii wskaźnikowych. Zahamowanie wzrostu mikroorganizmu wskaźnikowego, przejawiające się całkowitym przejaśnieniem wokół miejsca naniesienia płynu hodowlanego świadczyło o aktywności bakteriobójczej badanego szczepu. O właściwościach bakteriostatycznych orzekano na podstawie zmniejszenia gęstości murawki (ograniczenie wzrostu szczepu wskaźnikowego).

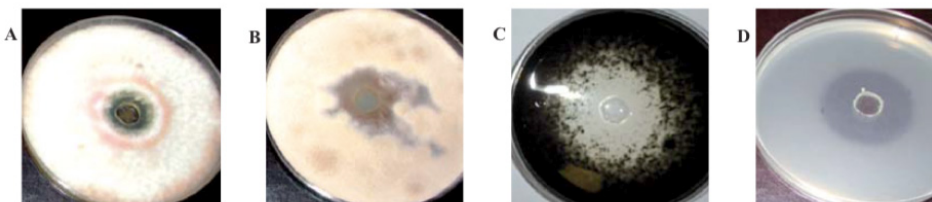
Wyniki

Tab. Aktywność antymikrobiologiczna produktów wobec drobnoustrojów wskaźnikowych

Lp.	Mikroorganizmy wskaźnikowe	Produkt probiotyczny*	Produkt probiotyczny**
		Strefa zahamowania wzrostu (mm)	
1	<i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689	24	17
2	<i>Clostridium butyricum</i> ATCC 860	30	25
3	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	43	11
4	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23857	24	15
5	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	18	6
6	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27	32
7	<i>Staphylococcus pyrogenes</i> ATCC 19615	31	18
9	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	38	21
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	13	28
11	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	31	17
12	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	39	18
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0
14	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	12	8
17	<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	25	12
18	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	39	16
19	<i>Fusarium</i> sp.	21	11
20	<i>Alternaria</i> sp.	17	9

Legenda: * produkt probiotyczny zawierający biomasę bakterii probiotycznych wraz z ich metabolitami

** płyn pofermentacyjny pozbawiony biomasy bakterii probiotycznych



Fot. Przeciwdrobnoustrojowy wpływ produktu probiotycznego na pleśń z rodzaju *Fusarium* (A) i *Alternaria* (B) i bakterie z rodzaju *Clostridium* (C) i *E. coli* (D)

Wnioski

- Produkty probiotyczne wykazują największą aktywność antybakteryjną wobec bakterii z gatunku *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*.
- Produkty probiotyczne wykazują największą aktywność antygrzybową wobec drożdży z gatunku *Candida albicans*.
- Największą aktywność antymikrobiologiczną wykazują produkty probiotyczne zawierające biomasę bakterii probiotycznych wraz z ich metabolitami.

3.1.5 Stabilność jakościowa produktów probiotycznych w czasie przechowywania

Jakość oraz unikatowe cechy smakowe i zapachowe są głównymi aspektami, dzięki którym konsumenci decydują się na nasze produkty. Aby zachować przewagę jakościową, nieodzowne jest utrzymanie czystości mikrobiologicznej, stosowanie wysokiej jakości ekologicznych surowców, wykorzystanie w procesie produkcyjnym unikatowych zestawów bakterii probiotycznych, a także zachowanie odpowiednich cech jakościowych do końca terminu przydatności do spożycia. W przypadku produkcji płynnych produktów probiotycznych kluczowe jest zachowanie reżimów higieniczno-sanitarnych na wszystkich etapach produkcji, a także precyzyjne kontrolowanie warunków procesu produkcyjnego zgodnie z unikatową recepturą.

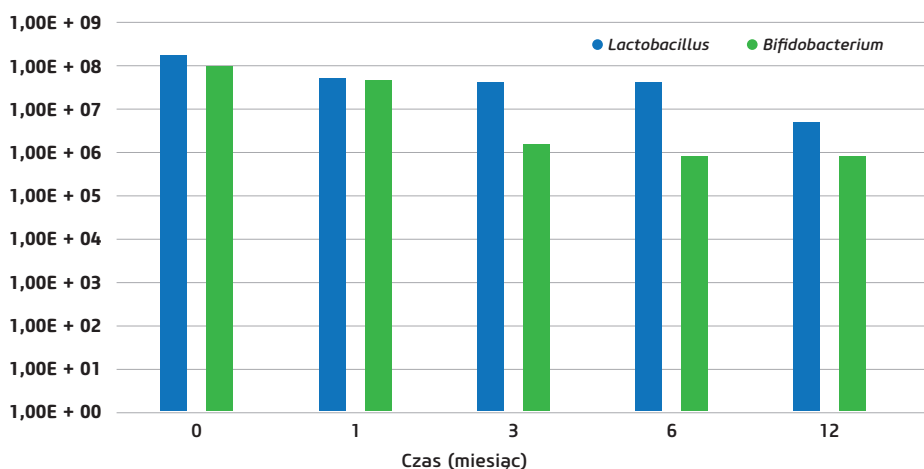
Każdy produkt spożywczy ma określony termin przydatności do spożycia. W związku z tym jest ważne, aby prowadząc badania zyskać wiedzę jak zmienia się i na ile jest trwały produkt w trakcie przechowywania. W przypadku produktów zawierających drobnoustroje probiotyczne kluczowym wskaźnikiem jest liczba bakterii z pożądaných grup.

Metodyka

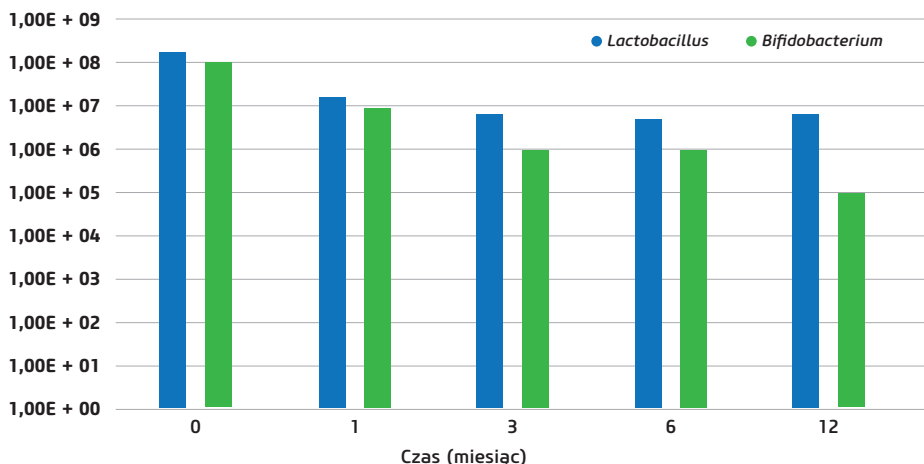
Produkty przechowywano w komorach starzeniowych firmy Q-Lab przez okres 3 miesięcy. Należy wskazać, że warunki wygenerowane w komorach starzeniowych to efekt zoptymalizowanych ale mimo wszystko sztucznych parametrów fizycznych (temperatura, wilgotność itp.) na które narażony jest badany produkt. W związku z powyższym wyniki badań nad produktami przetrzymywanymi w komorach starzeniowych mogą nieco różnić się od tych przechowywanych warunkach rzeczywistych.

Analizę mikrobiologiczną wykonywano w interwałach czasowych, które odpowiadały przechowywaniu w warunkach rzeczywistych w czasie: 1 miesiąc po produkcji (t_1), 3 miesiące po produkcji (t_3), 6 miesięcy po produkcji (t_6) i 12 miesięcy po produkcji (t_{12}). Analizy mikrobiologiczne produktów były wykonywane w kierunku: ogólnej liczby drobnoustrojów psychrofilnych i mezofilnych, ogólnej liczby pleśni i drożdży psychrofilnych i mezofilnych, liczby bakterii fermentacji mlekowej, liczby bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, obecności i liczby bakterii przetrwalnikujących (w tym z rodzaju *Bacillus*), obecności i liczby bakterii bez-tlenowych (w tym z rodzaju *Clostridium*), obecności bakterii z gatunku *Listeria monocytogenes*, obecności bakterii z rodzaju *Salmonella* i obecności bakterii z grupy coli.

Wyniki



Rys. Kinetyka zmian liczby bakterii fermentacji mlekowej wchodzących w skład produktu probiotycznego w czasie przechowywania w warunkach chłodniczych



Rys. Kinetyka zmian liczby bakterii fermentacji mlekowej wchodzących w skład produktu probiotycznego w czasie przechowywania w temperaturze pokojowej

Wnioski

- Produkty probiotyczne charakteryzują się zadowalającą stabilnością mikrobiologiczną w czasie ich przechowywania.
- Różnice liczebności drobnoustrojów w czasie przechowywania są widoczne w 12 miesiącu od dnia produkcji. Wyniki sugerują przechowywanie produktu w warunkach chłodniczych.
- W badanych produktach nie stwierdzono obecności drobnoustrojów z rodzaju *Salmonella*, *Listeria* i *Bacillus* (zaraz po produkcji jak i w trakcie przechowywania).
- W badanych produktach probiotycznych nie stwierdzono obecności pleśni.

3.2 Ocena biofunkcjonalności naszych produktów probiotycznych

Promowany w ostatnich latach zdrowy styl życia przejawia się głównie dbałością o zdrowie i podejmowaniem aktywności fizycznej. Ma to zapewnić dłuższe życie w optymalnej kondycji psychofizycznej. W związku z tym zwiększa się zapotrzebowanie na suplementy diety i żywność o najwyższej wartości żywieniowej, a dodatkowo o określonych właściwościach prozdrowotnych. Wśród pozostałych przyczyn rosnącego zapotrzebowania na żywność wzbogaconą

o dodatkowe komponenty mające na celu poprawę jej walorów zdrowotnych i smakowych należy wymienić w szczególności: starzenie się społeczeństwa, wzrost kosztów opieki medycznej i społecznej, wzrost częstości występowania dietozależnych schorzeń chronicznych, rozwój wiedzy dotyczącej biologicznie aktywnych, tzw. nieodżywczych składników żywności i ich fizjologicznego oddziaływania na organizm człowieka, wzrost siły nabywczej konsumentów w krajach rozwiniętych/rozwijających się, rozwój technik i technologii przetwórstwa surowców spożywczych, dostępność nowych bioaktywnych składników żywności (nutraceutyków) i sytuacja przemysłu żywnościowego w krajach rozwiniętych. Dzisiejszy konsument zdaje sobie sprawę, że nie tylko zdrowa dieta, ale i aktywność fizyczna pozytywnie wpływa na ich wygląd i samopoczucie. W związku z tym rośnie zapotrzebowanie na produkty, które wspierają wydolność fizyczną, dodają energii czy też ułatwiają redukcję wagi. Aby sprostać oczekiwaniom konsumentów, w obecnej chwili wiele liczących się na rynku firm spożywczych podążając za rozwijającym się trendem prozdrowotnym, planuje wprowadzić do swojego asortymentu produkty, które charakteryzowałyby się pozytywnym wpływem na organizm człowieka.

3.2.1 Wpływ trawienia *in vitro* na liczebność drobnoustrojów probiotycznych obecnych w produktach

Jednym z fundamentalnych elementów oceny biofunkcjonalności produktów są badania mające na celu ocenę stabilności i efektywności działania substancji aktywnych, soli mineralnych, mikroorganizmów w warunkach symulujących przewód pokarmowy. Z uwagi na trudności w dostępie do treści jelitowych *in vivo*, rozwinięte zostały badania nad modelami umożliwiającymi badanie trawienia i wchłaniania w warunkach *in vitro*. Modele te są dużo szybszym i tańszym sposobem w porównaniu z badaniami prowadzonymi na zwierzętach. W publikacjach naukowych opisano badania, w których wykorzystano mniej lub bardziej zautomatyzowane modele przewodu pokarmowego *in vitro*. Te najbardziej zaawansowane modele przewodu pokarmowego są monitorowane komputerowo, gdzie oprócz regulacji pH i dodatku odpowiednich enzymów, imitowane są ruchy perystaltyczne i wchłanianie przez ściany jelit. Znane są też badania, w których trawienie w przewodzie pokarmowym próbowano symulować przez stworzenie odpowiednich warunków w prostych naczyniach laboratoryjnych. Badanie biodostępności składników pokarmowych i leków w warunkach naturalnych jest bardzo utrudnione, na co decydujący wpływ ma trudny dostęp do światła przewodu pokarmowego człowieka, szczególnie na odcinku jelita cienkiego. Stosowanie modeli

in vitro, symulujących mniej lub bardziej dokładnie układ pokarmowy człowieka wpłynęło na szybki rozwój badań naukowych. Zadania, które stanowią wyzwanie dla dzisiejszej biotechnologii dotyczą badań nad zależnościami pomiędzy kilkoma elementami aplikowanymi (np. antybiotyki, mikroorganizmy probiotyczne) do przewodu pokarmowego w warunkach *in vitro*. Ponadto badania nad interakcjami pomiędzy mikrobiomem jelitowym (tym prawidłowym i dysfunkcyjnym) a substancjami aktywnymi biologicznie w warunkach *in vitro* przewodu pokarmowego stanowią ważną, choć przysparzającą trudności analitycznych zależność.

Metodyka

W badaniach nad wpływem trawienia na drobnoustroje probiotyczne wchodzące w skład naszych produktów wykorzystano model przewodu pokarmowego *in vitro*. Nadrzędnym celem przeprowadzonych prac było określenie kinetyki zmian liczebności bakterii wchodzących w skład produktów probiotycznych w zależności od stosowanej matrycy żywnościowej. Układ eksperymentalny stanowił fermentor o pojemności 1 L (Sartorius - Polska). Temperatura układu eksperymentalnego była utrzymywana na poziomie 37°C.

W trakcie prowadzonych prac wykorzystano bufor PBS o pH 7.4 (symulacja pustego żołądka) i nośniki w postaci matryc żywnościowych: preparat mleko zastępczy Nutramigen, stosowany w alergii na białko mleka krowiego, bogaty w substancje odżywcze (oleje roślinne, hydrolizat kazeiny, składniki mineralne, witaminy); nieklarowany sok jabłkowo-marchwiowy Bobo Frut - bogate źródło błonnika (2 g/300 ml); kleik ryżowy BoboVita – produkt skrobiowy. Skrobia ryżowa jest najłatwiej przyswajalną przez organizm skrobią oraz wykazuje działania prebiotyczne.



Fot. Układ doświadczalny – model trawienia *in vitro*

W pierwszej kolejności przygotowano mieszaninę produktu probiotycznego z buforem PBS lub produktu probiotycznego z wybraną matrycą żywieniową (P1)*. Tak przygotowaną próbkę badawczą poddano pierwszemu etapowi trawienia *in vitro*, który miał na celu symulację warunków panujących w żołądku. W tym celu do mieszaniny imitującej płyn żołądkowy dodano pepsynę w ilości 300 U/ml i obniżono pH do wartości 4.0 za pomocą 1 M HCl. Etap prowadzono przez 4 h w temp. 37°C (P2)*. Ruchy perystaltyczne imitowano przez mieszanie zawiesiny przy użyciu mieszadła magnetycznego. Kolejny etap miał na celu odwzorowanie warunków panujących w jelicie cienkim. W tym celu pH płynu wyregulowano do wartości 6.0, stosując 1 M NaHCO₃. Następnie dodano 10 ml ekstraktu trzustkowo-jelitowego (P3)*. Kolejny etap polegał na podniesieniu pH do 7.4 przez dodanie 1 M NaHCO₃. Ten etap prowadzono przez 2 h (P4)*. W celu symulacji pasażu produktu przez jelito grube pH podniesiono do wartości 8.0 za pomocą 2 M NaHCO₃. Dalsze trawienie prowadzono w warunkach beztlenowych przez 18 h (P5)*.

*P=punkt pomiarowy

Analizę mikrobiologiczną przeprowadzono z zastosowaniem metody zalewowej Kocha. Oznaczano dwie grupy drobnoustrojów - bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*.

Wyniki

W pierwszym etapie badań analizowano wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w buforze PBS. Zadaniem buforu PBS jest utrzymanie wartości pH na stałym poziomie. Wyniki prowadzonych badań przedstawiono w tabeli poniżej. Początkowo (P1), liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wynosiła 1.9×10^8 jtk/g, a bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* 2.6×10^8 jtk/g. Po 4 h inkubacji liczebność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* obniżyła się do wartości 2.6×10^7 jtk/g, podobnie jak bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* 1.4×10^7 jtk/g. W kolejnym etapie, symulującym środowisko jelita cienkiego w obecności soku trzustkowo-jelitowego liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* znów uległa obniżeniu do wartości 7.8×10^6 jtk/g. Natomiast liczba *Bifidobacterium* wynosiła na tym etapie 4.7×10^7 jtk/g. W kolejnym punkcie pomiarowym (P4), liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* uległa podwyższeniu do wartości 8.5×10^7 jtk/g, natomiast obniżyła się liczba *Bifidobacterium* (3.5×10^6 jtk/g). Po zakończeniu etapu symulującego pasaż przez jelito grube (P5), liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* była zbliżona do tej w etapie P4 i wynosiła 9.6×10^7 jtk/g. Natomiast liczba *Bifidobacterium* wzrosła do wartości 7.6×10^7 jtk/g.

Tab. Kinetyka zmian liczby bakterii fermentacji mlekowej wchodzących w skład produktu probiotycznego w czasie pasażu żołądkowo-jelitowym

Punkt pomiarowy	Czas inkubacji (h)	pH	Liczba bakterii fermentacji mlekowej	Liczba bakterii z rodzaju <i>Bifidobacterium</i>
P1	0	4.0	1.9x10 ⁸ jtk/g	2.6x10 ⁸ jtk/g
P2	4	4.0	2.6x10 ⁷ jtk/g	1.4x10 ⁷ jtk/g
P3	1.4	6.0	7.8x10 ⁶ jtk/g	4.7x10 ⁷ jtk/g
P4	2	7.4	8.5x10 ⁷ jtk/g	3.5x10 ⁶ jtk/g
P5	18	8.0	9.6x10 ⁷ jtk/g	7.6x10 ⁷ jtk/g

W kolejnym etapie badań analizowano wpływ dodatku matrycy żywieniowej, preparatu Nutramigen na wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Wyniki prowadzonych badań zaprezentowano w tabeli poniżej. Początkowo (P1), liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wynosiła 1.4x10⁸ jtk/g, a bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* 2.2x10⁸ jtk/g. Po 4 h inkubacji liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wzrosła do wartości 7.2x10⁹ jtk/g. Wzrost liczebności zaobserwowano również dla bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, a ich liczba wynosiła 3.4x10⁹ jtk/g. W kolejnym etapie symulującym środowisko jelita cienkiego w obecności soku trzustkowo-jelitowego liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* ponownie uległa podwyższeniu, do wartości 8.5x10⁹ jtk/g. Podobna obserwacja dotyczyła bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, których liczba na tym etapie eksperymentu wynosiła 5.2 x10⁹ jtk/g. W kolejnym punkcie pomiarowym (P4), liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* uległa obniżeniu do wartości 9.6x10⁸ jtk/g, natomiast podwyższyła się liczba *Bifidobacterium* (7.7x10⁹ jtk/g). Po zakończeniu etapu symulującego pasaż przez jelito grube (P5), liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* znów wzrosła i wynosiła 2.6x10⁹ jtk/g, natomiast liczba *Bifidobacterium* utrzymała się na poziomie zbliżonym do liczby w etapie P4 i wynosiła 7.5x10⁹ jtk/g. Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia można wywnioskować, że preparat Nutramigen zapewnił bardzo dobre warunki do wzrostu i namnażania zarówno bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, jak i bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Zapewne matryca żywnościowa o tak bogatym składzie (sy-

Tab. Kinetyka zmian liczby bakterii fermentacji mlekowej wchodzących w skład produktu probiotycznego w czasie pasażu żołądkowo-jelitowego w obecności preparatu Nutramigen

Punkt pomiarowy	Czas inkubacji (h)	pH	Liczba bakterii fermentacji mlekowej	Liczba bakterii z rodzaju <i>Bifidobacterium</i>
P1	0	4.0	1.4x10 ⁸ jtk/g	2.2x10 ⁸ jtk/g
P2	4	4.0	7.2x10 ⁹ jtk/g	3.4x10 ⁹ jtk/g
P3	1.4	6.0	8.5x10 ⁹ jtk/g	5.2x10 ⁹ jtk/g
P4	2	7.4	9.6x10 ⁸ jtk/g	7.7x10 ⁹ jtk/g
P5	18	8.0	2.6x10 ⁹ jtk/g	7.5x10 ⁹ jtk/g

rop glukozowy, hydrolizat kazeiny, składniki mineralne oraz witaminy) spełniła funkcję ochronną oraz prebiotyczną dla komórek bakterii probiotycznych.

W kolejnym etapie badań analizowano wpływ dodatku, matrycy żywieniowej o wysokiej zawartości błonnika, soku Bobo-Frut, na wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowano w tabeli poniżej. Początkowo (P1) liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wynosiła 1.2×10^8 jtk/g, a bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* 5.6×10^8 jtk/g. W kolejnych etapach (P2, P3, P4) liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* była zbliżona do wartości wyjściowej. Wzrost zaobserwowano w ostatnim etapie (P5), w którym liczebność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wynosiła 8.6×10^8 jtk/g. Większym zmianom uległa liczba bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Wzrost liczby bakterii tego rodzaju zaobserwowano w etapie (P2), symulującym warunki panujące w żołądku, gdzie ich liczba wynosiła 7.4×10^8 jtk/g. W kolejnym etapie, symulującym środowisko jelita cienkiego w obecności soku trzustkowo-jelitowego liczba *Bifidobacterium* uległa obniżeniu do wartości 1.2×10^8 jtk/g. W kolejnym punkcie pomiarowym (P4), liczba *Bifidobacterium* obniżyła się, a jej wartość była bliska liczebności wyjściowej i wynosiła 5.2×10^8 jtk/g. Po zakończeniu etapu symulującego pasaż przez jelito grube (P5) liczba *Bifidobacterium* znów wzrosła i wynosiła 8.1×10^8 jtk/g. Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia można wywnioskować, że sok Bobo-Frut, zastosowany jako atrakcyjne źródło błonnika zapewnił dobre warunki do wzrostu i namnażania zarówno dla bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, jak i bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Uzyskane po procesie trawienia *in vitro* liczebności badanych grup drobnoustrojów były wyższe od wartości początkowych. Fakt ten może być powiązany ze składem tej matrycy żywieniowej. W sokach owocowych znajduje się wiele substancji (błonnik, białka i polifenole) mających działanie ochronne w stosunku do drobnoustrojów. Ponadto soki warzywno-owocowe mają działanie buforujące, co zwiększa przeżywalność drobnoustrojów w czasie pasażu przez przewód pokarmowy.

Tab. Kinetyka zmian liczby bakterii fermentacji mlekowej wchodzących w skład produktu probiotycznego w czasie pasażu żołądkowo-jelitowego w obecności soku Bobo Frut

Punkt pomiarowy	Czas inkubacji (h)	pH	Liczba bakterii fermentacji mlekowej	Liczba bakterii z rodzaju <i>Bifidobacterium</i>
P1	0	4.0	1.2×10^8 jtk/g	5.6×10^8 jtk/g
P2	4	4.0	1.6×10^8 jtk/g	7.4×10^8 jtk/g
P3	1.4	6.0	2.0×10^8 jtk/g	1.2×10^8 jtk/g
P4	2	7.4	2.2×10^8 jtk/g	5.2×10^8 jtk/g
P5	18	8.0	8.6×10^8 jtk/g	8.1×10^8 jtk/g

W kolejnym etapie badań analizowano wpływ dodatku matrycy żywieniowej – kleiku ryżowego Bobo Vita na wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowano w tabeli poniżej. Początkowo (P1), liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wynosiła 3.3×10^8 jtk/g, a bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* 6.6×10^8 jtk/g. W trakcie kolejnych etapów pasażu drobnoustrojów w warunkach symulujących przewód pokarmowy zaobserwowano podobną tendencję zmian liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. W etapie symulującym warunki panujące w żołądku liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* uległa niewielkiemu obniżeniu w stosunku do wartości wyjściowej i wynosiła 2.7×10^8 jtk/g. Liczebność *Bifidobacterium* także uległa obniżeniu do wartości 5.1×10^8 jtk/g. W kolejnych etapach (P3 i P4), zarówno liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* obniżała się, odpowiednio do wartości 1.3×10^8 jtk/g (P3), 5.5×10^7 jtk/g (P4) i 1.7×10^8 jtk/g (P3), 5.2×10^7 jtk/g (P4). Wzrost liczby badanych drobnoustrojów zaobserwowano w ostatnim etapie prowadzonego eksperymentu (P5), w którym liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wynosiła 5.8×10^8 jtk/g, a liczba bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* 6.1×10^8 jtk/g. Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia można wywnioskować, że kleik ryżowy Bobo Vita nie zapewnił odpowiednio dobrych warunków dla wzrostu i namnażania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* fermentacji mlekowej i bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Uzyskane liczebności badanych grup drobnoustrojów były co prawda wyższe od wartości początkowych, ale i tak niższe w porównaniu do innych, badanych matryc żywieniowych. Jednak warto podkreślić funkcję ochronną ziaren skrobi, która może polegać na otaczaniu komórek bakterii, chroniąc je tym samym przed negatywnym wpływem środowiska.

Tab. Kinetyka zmian liczby bakterii fermentacji mlekowej wchodzących w skład produktu probiotycznego w czasie pasażu żołądkowo-jelitowego w obecności kleiku ryżowego Bobo Vita

Punkt pomiarowy	Czas inkubacji (h)	pH	Liczba bakterii fermentacji mlekowej	Liczba bakterii z rodzaju <i>Bifidobacterium</i>
P1	0	4.0	3.3×10^8 jtk/g	6.6×10^8 jtk/g
P2	4	4.0	2.7×10^8 jtk/g	5.1×10^8 jtk/g
P3	1.4	6.0	1.3×10^8 jtk/g	1.7×10^8 jtk/g
P4	2	7.4	5.5×10^7 jtk/g	5.2×10^7 jtk/g
P5	18	8.0	5.8×10^8 jtk/g	6.1×10^8 jtk/g

Wnioski

- Matryce żywnościowe pełnią funkcje ochronną, a także prebiotyczną dla bakterii o potencjale probiotycznym.
- Spośród badanych matryc najlepsze warunki dla ochrony żywotności, wzrostu i rozmnażania bakterii wchodzących w skład produktów probiotycznych zapewniał preparat Nutramigen, co jest ściśle związane z jego bogatym składem.

3.2.2 Wpływ drobnoustrojów probiotycznych obecnych w produktach na prawidłowy mikrobiom jelitowy człowieka i mikrobiom w stanie dysbiozy

Zaburzenia w składzie mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka są ściśle powiązane ze stylem życia, dietą i narażeniem na stres. Literatura przedmiotu wskazuje na duży postęp w badaniach składu mikrobiomu jelit i jego wpływu na choroby autoimmunologiczne, raka jelita grubego, próchnicę zębów, powiązania pomiędzy mikrobiomem i mózgiem (wpływ na depresję i autyzm). Bada się też wpływ mikrobiomu matki na zasiedlanie organizmu noworodka przez łożysko lub nawet na przedwczesne porody. Ważnym elementem badań jest ocena wpływu zmian środowiska na mikrobiom i rozwój chorób cywilizacyjnych, zwłaszcza na cukrzycę, otyłość i choroby nowotworowe. W 2015 roku oszacowano, że odporne na antybiotyki patogeny powodują około 50.000 zgonów rocznie w Europie i USA, a liczba ofiar wzrośnie do 10 milionów zgonów rocznie na całym świecie w 2050 r. Dane te sugerują, że zbliżamy się do końca ery antybiotykowej. Antybiotyki, zwłaszcza beta-laktamowe i fluorochinolony, których stosowanie prowadzi do biegunki i zapalenia jelita grubego jest ściśle związane ze zmianą składu i funkcji mikrobiomu przewodu pokarmowego. Badania dowiodły, że pięć dni podawania fluorochinolony spowodowało wyeliminowanie lub stłumienie około jednej trzeciej mikrobiomu w kale po trzech-czterech dniach terapii antybiotykowej (Dethlefsen i in., 2008). Odbudowanie populacji było możliwe w ciągu tygodnia od zakończenia terapii, jednak ta odbudowa była niekompletna (Dethlefsen i Relman, 2010). Ponadto rokuje się, że etiologia 15% chorób nowotworowych związana jest z infekcjami bakteryjnymi. Przyczyną takiej sytuacji może być fakt, że niektóre bakterie komensalne są zdolne do przekształcania prokarcynogenów w związki uszkodzające DNA (np. etanol, heterocykliczne aminy) lub bezpośrednio wytwarzają karcynogeny (np. *fecapentaenes*), jak również stymulują wytwarzanie wolnych rodników tlenowych

(np. *Enterococcus faecalis*), przez co wzrasta ryzyko rozwoju raka jelita grubego. Coraz większy związek upatruje się pomiędzy zaburzeniami w składzie mikrobiomu przewodu pokarmowego a otyłością. Turnbaugh i in. (2006) udowodnili, że skład mikrobiomu jelitowego wpływa na masę ciała. Autorzy przeprowadzili transfer mikroorganizmów z jelit homozygotycznych myszy otyłych ob/ob. (myszy z genetycznie uwarunkowanym brakiem leptyny wynikającym z mutacji typu nonsense w 105 kodonie genu ob.) i myszy o prawidłowej masie ciała do jelit myszy „germ free” (wolne od wszystkich wykrywalnych mikroorganizmów i pasożytów). Po dwóch tygodniach zaobserwowano, że myszy, którym przeszczepiono mikrobiom od myszy otyłych, pozyskiwały więcej kalorii z pożywienia i wykazywały szybsze odkładanie tkanki tłuszczowej. Dodatkowo zmiany mikrobiomu jelit indukują stany zapalne i otyłość przez wpływ na komórki nabłonka jelitowego, na enteroendokrynowe komórki i wydzielanie hormonów jelitowych jak glukagonopodobne peptydy 1 i 2 (GLP-1 i GLP-2). GLP-1 stymuluje wydzielanie insuliny, opóźnia pasaż pożywienia przez żołądek, wywołuje objaw sytości i spadek masy ciała, GLP-2 zwiększa transport glukozy z jelit i obniża przepuszczalność ściany jelita. Tak więc mikrobiom, działając na enteroendokrynowe komórki, wpływa na metabolizm (Strober, 2013).

Ponadto bakterie jelitowe uczestniczą w dojrzewaniu i wymianie enterocytów, immunomodulacji, aktywności motorycznej przewodu pokarmowego, metabolizmie leków, rozkładaniu obecnych w pożywieniu toksyn i karcynogenów (np. heterocykliczne aminy, związki N-nitrozowe), fermentowaniu niestrawionych składników pożywienia, w produkcji niezbędnych witamin (K, B12, kwas foliowy, B1, B6), w recyrkulacji kwasów żółciowych (poprzez wytwarzanie hydrolaz kwasów żółciowych), a także w ochronie przed kolonizacją jelit przez bakterie patogenne, takie jak *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. i *Shigella* spp.

Metodyka

W pierwszym etapie prac określono zmienność wybranych grup drobnoustrojów wchodzących w skład mikrobiomu kałowego osób: zdrowych, aktywnych fizycznie, deklarujących nie przyjmowanie antybiotyków (przez okres min. 1 roku), odżywiających się w sposób racjonalny i zgodny z podstawowymi zasadami zdrowego żywienia, niespożywającymi alkoholu (próba kontrolna); osób w wieku powyżej 75-go roku życia; pacjentów 2 tygodnie po zakończonej terapii antybiotykowej; pacjentów po zakończonej chemioterapii i osób otyłych (BMI>30) i przygotowano wystandaryzowaną zaszczepkę symulującą mikrobiom jelitowy.

Wystandardyzowana zaszczerpka mikrobiomu jelitowego pochodziła od dawców z powyżej wymienionych grup i zawierała bakterie probiotyczne (z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*), bakterie (głównie) stymulujące odporność (niepatogenne *E. coli* i z rodzaju *Enterococcus*), a także mikroflorę potencjalnie chorobotwórczą (bakterie proteolityczne tzw. gnilne, bakterie z rodzaju *Clostridium* i grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*). Obecność i liczebność drobnoustrojów z danej grupy była zróżnicowana w zależności od pochodzenia zaszczerpki. Do izolacji i oznaczenia liczby drobnoustrojów wykorzystano odpowiednie dla danego rodzaju pożywki mikrobiologiczne.

Analizowane składniki mikrobiomu jelitowego człowieka

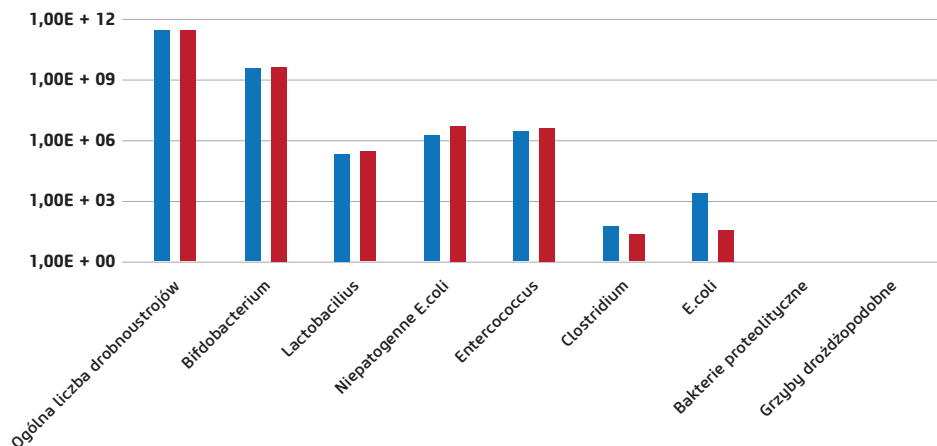
Drobnoustroje pożądane

- Bakterie z rodzaju *Lactobacillus*
- Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*
- Niepatogenne bakterie z grupy coli
- Bakterie z rodzaju *Enterococcus* sp.

Drobnoustroje niepożądane

- Bakterie proteolityczne
- Bakterie laktozo-ujemne *E.coli*
- Bakterie z rodzaju *Clostridium*
- Grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*

Wyniki

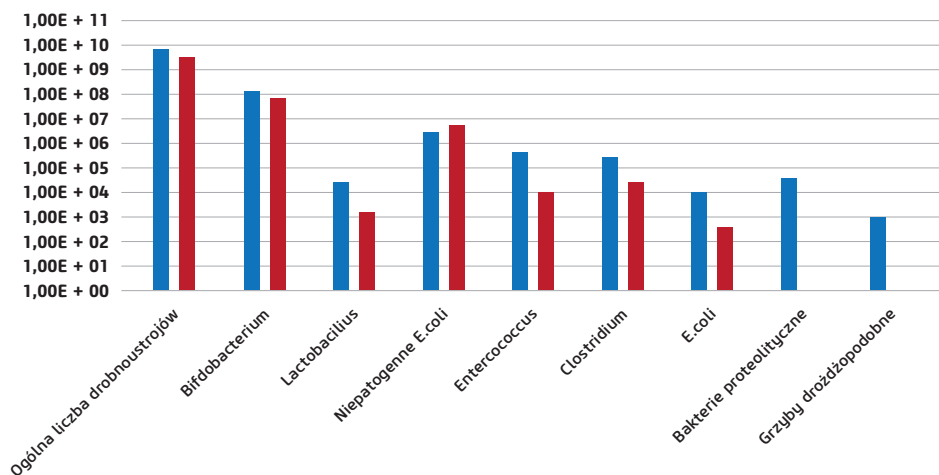


Rys. Wpływ produktu probiotycznego na zmiany jakościowe i ilościowe mikrobiomu jelitowego osób zdrowych

Legenda: słupki niebieskie – liczebność drobnoustrojów w wystandardyzowanej zaszczerpce pochodzącej z mikrobiomu jelitowego; słupki czerwone – liczebność drobnoustrojów w wystandardyzowanej zaszczerpce pochodzącej z mikrobiomu jelitowego po trawieniu *in vitro* w obecności produktu probiotycznego

Wnioski

- Obecność kwasów organicznych w produkcie probiotycznym spowodowała wyraźną redukcję niepożądanych drobnoustrojów z rodzaju *Clostridium* i *E.coli*.
- Drobnoustroje z innych grup utrzymały się na zbliżonym poziomie w porównaniu do zaszczepki, co może świadczyć, że mikrobiom pochodzący od zdrowych osób wykazuje wysoką odporność na kwasy organiczne i charakteryzuje się dobrą witalnością.

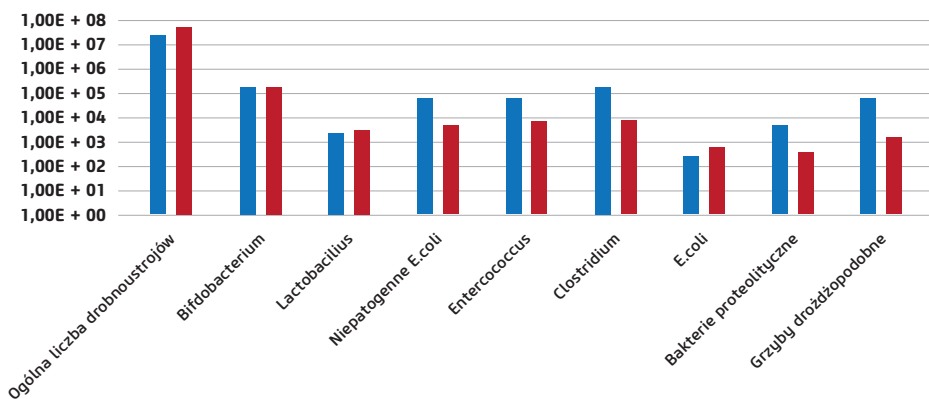


Rys. Wpływ produktu probiotycznego na zmiany jakościowe i ilościowe mikrobiomu jelitowego osób starszych

Legenda: słupki niebieskie – liczebność drobnoustrojów w wystandaryzowanej zaszczepce pochodzącej z mikrobiomu jelitowego; słupki czerwone – liczebność drobnoustrojów w wystandaryzowanej zaszczepce pochodzącej z mikrobiomu jelitowego po trawieniu *in vitro* w obecności produktu probiotycznego

Wnioski

- Po zastosowaniu produktu probiotycznego, w składzie mikrobiomu jelitowego nastąpiła redukcja większości oznaczanych grup drobnoustrojów.
- Ponadto zaobserwowano całkowitą eliminację niepożądanych drobnoustrojów tj. bakterii proteolitycznych i grzybów drożdżopodobnych.
- Drobnoustroje wchodzące w skład mikrobiomu jelitowego osób starszych mogą cechować się obniżoną witalnością i zwiększoną wrażliwością na kwasy organiczne i polifenole.

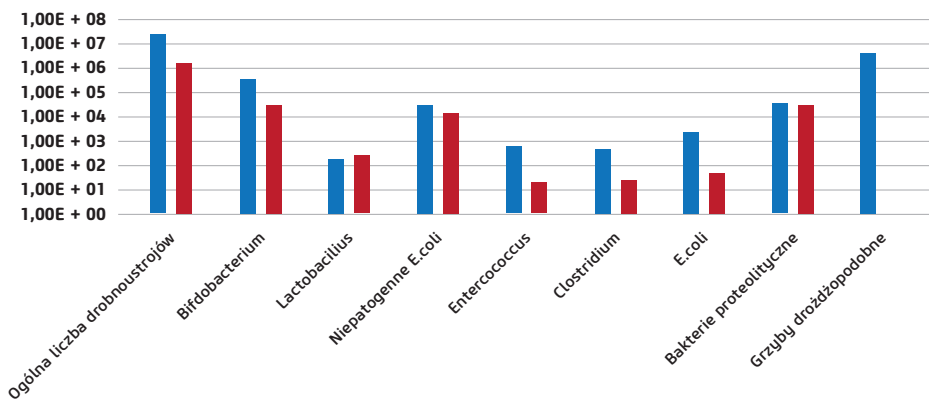


Rys. Wpływ produktu probiotycznego na zmiany jakościowe i ilościowe mikrobiomu jelitowego osób po zakończonej antybiotykoterapii

Legenda: słupki niebieskie – liczebność drobnoustrojów w wystandaryzowanej zaszczipce pochodzącej z mikrobiomu jelitowego; słupki czerwone – liczebność drobnoustrojów w wystandaryzowanej zaszczipce pochodzącej z mikrobiomu jelitowego po trawieniu *in vitro* w obecności produktu probiotycznego

Wnioski

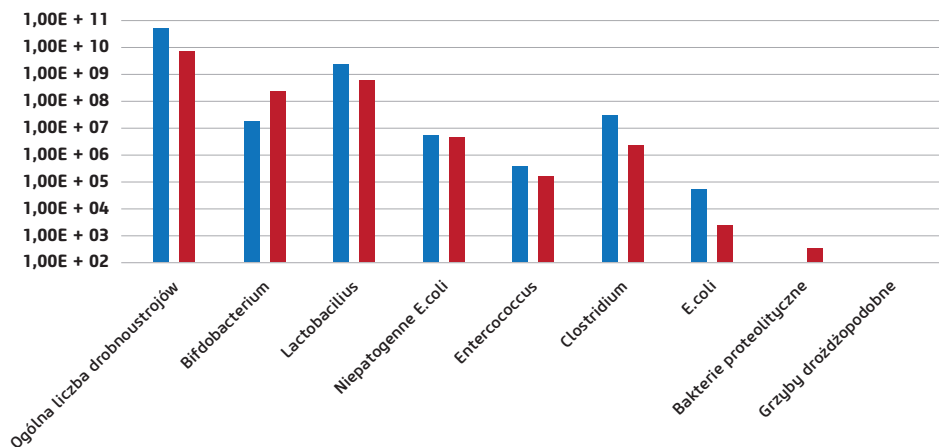
- Po zastosowaniu produktu probiotycznego zaobserwowano wzrost liczby drobnoustrojów o potencjale probiotycznym.
- Ponadto zaobserwowano redukcję drobnoustrojów niepożądanych jak bakterie z rodzaju *Clostridium*, bakterie proteolityczne, a także grzyby drożdżopodobne.



Legenda: słupki niebieskie – liczebność drobnoustrojów w wystandaryzowanej zaszczipce pochodzącej z mikrobiomu jelitowego; słupki czerwone – liczebność drobnoustrojów w wystandaryzowanej zaszczipce pochodzącej z mikrobiomu jelitowego po trawieniu *in vitro* w obecności produktu probiotycznego

Wnioski

- Zastosowanie produktu probiotycznego spowodowało całkowitą eliminację grzybów drożdżopodobnych.
- Ponadto zaobserwowano redukcję liczebności większości grup drobnoustrojów, co może świadczyć o silnym osłabieniu witalności mikrobiomu, który został poddany działaniu substancji toksycznych (chemioterapeutyków).



Rys. Wpływ produktu probiotycznego na zmiany jakościowe i ilościowe mikrobiomu jelitowego osób otyłych

Legenda: słupki niebieskie – liczebność drobnoustrojów w wystandaryzowanej zaszczipce pochodzącej z mikrobiomu jelitowego; słupki czerwone – liczebność drobnoustrojów w wystandaryzowanej zaszczipce pochodzącej z mikrobiomu jelitowego po trawieniu *in vitro* w obecności produktu probiotycznego

Wnioski

- Zastosowanie produktu probiotycznego spowodowało redukcję wszystkich grup drobnoustrojów za wyjątkiem bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i bakterii proteolitycznych.
- Wzrost liczby bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* jest korzystny, ponieważ prowadzi do wyrównania jakościowo-ilościowego pomiędzy grupą *Firmicutes* (bakterie z rodzaju *Lactobacillus*) a *Bifidobacteriales*.

3.2.3 Ocena zdolności adhezji drobnoustrojów probiotycznych obecnych w produktach do komórek nabłonka w modelu *in vitro* - badania na liniach komórkowych

Zdolność adhezyjna mikroorganizmów probiotycznych do komórek nabłonka jelitowego jest jedną z kluczowych cech drobnoustrojów wymaganą do ich późniejszego prozdrowotnego działania na organizm człowieka. Umożliwia ona bezpośredni kontakt bakterii probiotycznych z komórkami gospodarza, a także wydłuża czas ich przebywania w układzie pokarmowym. Dlatego też, obok badań nad wrażliwością na wpływ niskiego pH czy obecność soli żółciowych oraz enzymów trawiennych, jest to jeden z podstawowych wykładników efektywności działania preparatów probiotycznych.

Metodyka

Oprócz produktów probiotycznych do badań wykorzystano linię komórek CaCo-2 wyizolowanych z ludzkich komórek nowotworu okrężnicy oraz linię HT-29 z gruczolakoraka jelita grubego. Obie linie komórek pochodziły z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATCC). Komórki nabłonka jelitowego CaCo-2 i HT-29 hodowano w pożywce DMEM, zawierającej dodatek niezbędnych aminokwasów i gentamycynę. W pierwszej kolejności pobrano odpowiednią objętość zawiesiny komórkowej stanowiącej produkt probiotyczny, zawierający 6.0×10^8 jtk/ml bakterii. Całość uzupełniono pożywką DMEM i antybiotykiem. Hodowlę komórek CaCo-2 i HT-29 prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C i atmosferze gazowej zawierającej 4% CO₂ i 96 % powietrza, dokonując wymiany pożywki co 24 h. Hodowlę prowadzono przez 21 dni dla kultury CaCo-2 i 14 dni dla kultury HT-29. Liczbę komórek CaCo-2 i HT-29 oznaczano pod mikroskopem. Przed wykonaniem testu, komórki CaCo-2 i HT-29 przemywano roztworem PBS i wprowadzano pożywkę DMEM zawierającą komórki bakterii probiotycznych. Hodowle inkubowano przez 2,5 h w temperaturze 37°C. Następnie do każdego dołka dodawano roztwór Triton X-100 i prowadzono lizę komórek CaCo-2 i HT-29. Lizaty przenoszono do probówek typu Eppendorff i wirowano. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w soli fizjologicznej. Z wybranych rozcieńczeń wykonywano posiewy w trzech równoległych powtórzeniach. Hodowle prowadzono w pożywce MRS z 2% dodatkiem agar w temperaturze 35°C przez 48-72 h.

Wyniki

Do oznaczenia właściwości adhezyjnych szczepów probiotycznych wchodzących w skład produktów probiotycznych wykorzystano 21-dniową hodowlę komórek CaCo-2 i 14-dniową hodowlę komórek nabłonka jelita grubego HT-29. Są to najczęściej stosowane modele komórkowe wykorzystywane do oznaczania zdolności adhezyjnych mikroorganizmów. Po zakończeniu pasażu jelitowego, oznaczono liczbę komórek bakteryjnych związanych z komórkami nabłonka jelitowego. Zdolność adhezyjną bakterii probiotycznych wyrażono jako poziom adhezji, czyli liczbę komórek mikroorganizmów związanych ze 100 komórkami komórek linii CaCo-2 i HT-29.

Tabela poniżej przedstawia wyniki zdolności adhezyjnej drobnoustrojów probiotycznych wchodzących w skład produktu po procesie trawienia w jelicie cienkim. Uzyskane wyniki wskazują największe powinowactwo do komórek nabłonka preparatu bakteryjnego z dodatkiem matrycy żywnościowej w postaci mleka zastępczego. Liczba bakterii związanych ze 100 komórkami nabłonka jelitowego wynosiła odpowiednio dla CaCo-2 258 i dla HT-29 409. Najmniejszą związaną liczbę komórek, tak samo jak w przypadku analizy prowadzonej z wykorzystaniem komórek linii CaCo-2, zaobserwowano dla produktu bez zastosowania matrycy żywnościowej. W tym ostatnim wariancie w przeciwieństwie do innych (z wykorzystaniem matrycy żywnościowej) zarówno z wykorzystaniem linii CaCo-2, a także HT-29 liczba związanych komórek zmalała po inkubacji w warunkach imitujących proces trawienia w jelicie cienkim. Porównując także liczbę bakterii związanych ze 100 komórkami CaCo-2 i HT-29 można stwierdzić, że komórki wchodzące w skład produktu probiotycznego mają większe powinowactwo do komórek linii HT-29. Zestawiając próby z największą liczbą komórek bakterii ulegających adhezji do komórek CaCo-2 i HT-29 zauważyć można, iż około 100 komórek więcej ulega procesowi adhezji z komórkami linii HT-29.

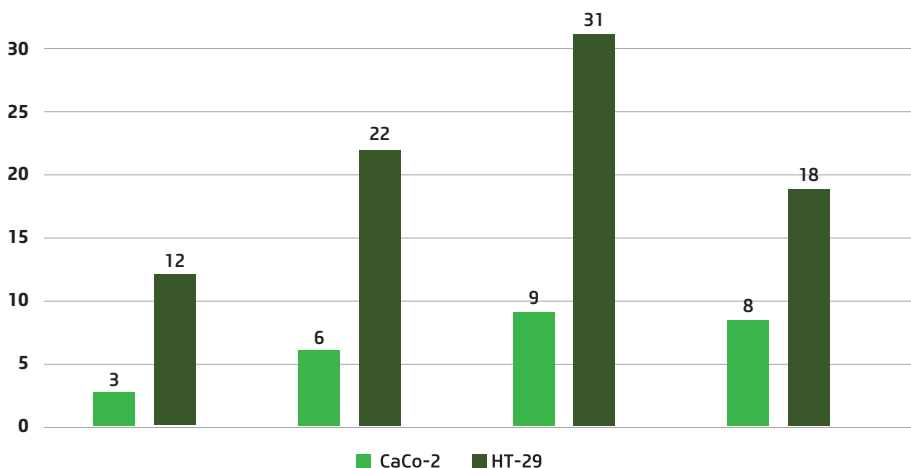
Tab. Liczba bakterii probiotycznych związanych ze 100 komórkami HT-29 oraz CaCo-2 po procesie trawienia *in vitro*

Linia komórkowa	CaCo-2	HT-29
Wskaźnik adhezji	Liczba związanych bakterii/100 CaCo-2	Liczba związanych bakterii/100 HT-29
Produkt probiotyczny - bez dodatku matrycy żywnościowej	110	201
Produkt probiotyczny z dodatkiem matrycy żywnościowej - mleko zastępcze	258	409
Produkt probiotyczny z dodatkiem matrycy żywnościowej - Bobo Frut	210	293
Produkt probiotyczny z dodatkiem matrycy żywnościowej - kleik ryżowy	223	354

Te same wnioski wyciągnąć można z wyznaczonego na początku analiz procentowego stopnia adhezji, co przedstawia rysunek poniżej. Parametr ten opisuje wartość stosunku liczby komórek bakteryjnych, które uległy adhezji do liczby wszystkich wprowadzanych komórek. Uzyskane wyniki stopnia adhezji wskazują również, iż bakterie probiotyczne wchodzące w skład produktu posiadają wysoką zdolność przylegania do modelowych komórek nabłonka linii HT-29. Wartość ta uzależniona jest od zastosowanej w eksperymencie matrycy żywnościowej. Wyraźnie największą efektywność adhezji zauważyć można w próbie, którą wzbogacono matrycą żywnościową w postaci mleka zastępczego. Najmniejszy stopień adhezji do komórek HT-29 widoczny jest dla wariantu, w którym produkt był poddawany eksperymentom bez matrycy żywnościowej. Stopień adhezji komórek bakteryjnych do linii CaCo-2 utrzymuje się na niskim poziomie około 6% we wszystkich czterech badanych wariantach.

Wnioski

Najwyższy poziom adhezji drobnoustrojów z dodatkiem matrycy żywnościowej w postaci mleka w proszku jest związany z obecnością w tym produkcie szeregu substancji ochronnych. Jak już wspomniano, mleko zastępcze jest bogate w wiele substancji o charakterze ochronnym w tym poliole, disacharydy, polisacharydy, aminokwasy, a także hydrolizaty białkowe, składniki mineralne, sole kwasów organicznych i wiele innych. W omawianej pracy najefektywniejszą ochronę właściwości adhezyjnych wykazało mleko zastępcze, gdzie liczba bakterii ulegających adhezji do komórek linii CaCo-2, a także HT-29 była największa. Warto wspomnieć, że mleko jest powszechnie stosowaną substancją w celu ochrony przeżywalności oraz cech funkcjonalnych komórek bakteryjnych. Jest ono naturalnym środowiskiem dla bakterii fermentacji mlekowej, także ze względu na zawartość białek, licznych witamin i składników mineralnych, ale przede wszystkim laktozy będącej substratem dla tych drobnoustrojów. Zawarta w mleku laktoza, tworząc wiązania wodorowe z białkami błony komórkowej zwiększa także jej stabilność. Ponadto mleko dzięki pojemności buforowej zmniejsza kwaśny odczyn środowiska żołądkowego, przyczyniając się tym samym do obniżenia śmiertelności komórek bakterii probiotycznych w trakcie pasażu jelitowego.



Rys. Stopień adhezji niestrawionych bakterii probiotycznych przed pasażem jelitowym (%)

3.3 Podsumowanie

Niniejsze opracowanie stanowi zestawienie jedynie wybranych wyników prowadzonych przez nas prac. Prezentuje kluczowe aspekty związane z jakością i biofunkcjonalnością naszych produktów probiotycznych wskazując ich wyjątkowe cechy.

Living Food Sp. z o.o. jest jedną z nielicznych firm produkujących preparaty probiotyczne będącą w posiadaniu tak szerokiego zakresu wyników prac nad własnymi produktami.

SIEDZIBA FIRMY

Living Food Sp. z o.o., 66-320 Trzciel, ul. Graniczna 15





Nasza firma ma swoją siedzibę w budynku o powierzchni około 500 m², który został podzielony na trzy główne części. Pierwsza to część biurowa, zajmująca najmniejszą powierzchnię i pełniąca funkcję administracyjną. Druga to część laboratoryjna, której przestrzeń jest podzielona na stanowiska do prowadzenia bioprocusów w skali półprzemysłowej, stanowiska analityczne, inkubatornię i pomieszczenie techniczne. Trzecia to część technologiczna. Tą największą powierzchniuwo część przedsiębiorstwa stanowi pięć pomieszczeń, które służą do obróbki wstępnej i przygotowania surowców, procesów sterylizacji, przygotowania kultur starterowych drobnoustrojów, prowadzenia procesu namnażania i fermentacji, prowadzenia procesów separacyjnych, konfekcjonowania, etykietowania i przejściowego magazynowania. Magazyn wyrobów gotowych znajduje się w Trzcielu, w obiekcie przy Pl. Zjednoczenia Narodowego 13.



Fot. Widok obiektu przy Pl. Zjednoczenia Narodowego 13, z frontu.



Fot. Widok części laboratorium (a) i linii technologicznej (b)

Nasza firma oraz produkty posiadają liczne wyróżnienia, w tym:

- Nagroda Gospodarcza Marszałka Województwa Lubuskiego 2022 – 2 miejsce w kategorii INNOWACYJNE MAŁE PRZEDSIĘBIORSTWO, za najciekawsze innowacje wprowadzone na rynek w latach 2019 – 2021
- Dobra Firma 2021, w kategorii Najlepszy Pracodawca województwa lubuskiego, firma mała – nagroda Związku Przedsiębiorców i Pracodawców
- Laur Konsumenta 2020 w kategorii „Naturalne preparaty wspomagające odporność dla dorosłych”
- POLSKA NAGRODA JAKOŚCI nadana przez Krajową Izbę Gospodarczą
- Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii im. Prof. Zbigniewa Religi w Zabrze
- Tytuł i nagroda „Orzeł Agrobiznesu 2018” nadany przez Agencje Promocyjno-Wydawniczą EMS
- Nagrodę Polska Nagroda Innowacyjności 2018 nadaną przez Polską Agencję Przedsiębiorczości
- Wyróżnienie I stopnia w konkursie XVI edycji „Wielkopolska Nagroda Jakości” za wdrażanie koncepcji zarządzania przez jakość
- Certyfikat ogólnopolskiego Programu Promocyjnego „Doceń Polskie”
- Certyfikat nadany przez Wielkopolski Instytut Jakości za doskonalenie swoich produktów w zakresie jakościowym w ramach projektu „Budowanie i wdrożenie proinnowacyjnych usług optymalizacji za MŚP opartych na zintegrowanym systemie eksperckim”
- Certyfikat nadany za zajęcie I miejsca w konkursie produktów spożywczych „Nasze Dobre Lubuskie”
- STATUETKA „Przyjaciel Fundacji” Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii im. prof. Zbigniewa Religi





PL-EKO-09
Rolnictwo UE



Produkt wyróżniony przez
Fundację Rozwoju
Kardiologii
im. prof. Zbigniewa Religi
w Zabrzu.



Polska
Nagroda
Innowacyjności
2018



POLSKA NAGRODA
JAKOŚCI



Livingfood™

LIVING FOOD SP. Z O.O.

ul. Graniczna 15, 66-320 Trzciel
+48 693 822 235 | biuro@living-food.pl

Living Food Quality®