

PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK BAKTERII IMMOBILIZOWANYCH W KULKACH PEŁNOŻELOWYCH I KAPSUŁKACH Z CIEKŁYM RDZENIEM PODCZAS SYMULOWANEGO TRANZYTU PRZEZ PRZEWÓD POKARMOWY

Urszula T. Jasińska, Lubomiła Owczarek, Sylwia Skąpska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa
urszula.jasinska@ibprs.pl

Streszczenie

Badano przeżywalność drobnoustrojów z rodzaju *Bifidobacterium* oraz bakterii fermentacji mlekowej (LAB) w kulkach pełnożelowych lub kapsułkach z ciekłym rdzeniem w warunkach symulowanego tranzytu przez górne odcinki przewodu pokarmowego – żołądek (pH 2) oraz jelito cienkie (pH 8). Immobilizację prowadzono metodą wibracyjną z użyciem alginianu sodu. Ustalono wysoką odporność wszystkich kultur, zarówno swobodnych, jak i immobilizowanych, na symulowany 240 min pasaż przez jelito cienkie, przy jednoczesnej dużej wrażliwości ogółu swobodnych komórek na warunki tranzytu przez żołądek. Żadne z badanych szczepów w formie swobodnych komórek nie przeżywały 180 min w środowisku pH 2. Po 90 minutach stwierdzono całkowitą inaktywację *S. thermophilus* T_KM₃, *B. breve* ATCC 15700 i *B. breve* KN65FP6-FERBEV, natomiast spadek komórek swobodnych w przypadku *L. plantarum* KKP384 wynosił 4,16 log, a *B. infantis* ATCC 15697 – 6,31 log.

Immobilizacja bakterii, niezależnie czy w kapsułkach czy kulkach pełnożelowych, istotnie zwiększyła przeżywalność bakterii w symulowanym środowisku soku żołądkowego o pH 2. Najwyższą odporność wykazywał szczep *L. plantarum* KKP384 oraz *B. infantis* ATCC 15697. W przypadku szczepu *L. plantarum* KKP384 redukcja liczebności komórek bakterii w kapsułkach i w kulkach pełnożelowych po czasie 180 min wynosiła odpowiednio 1,28 log oraz 1,76 log. Nieco wyższy spadek liczebności stwierdzono w przypadku *B. infantis* ATCC 15697 – odpowiednio o 2,12 log i 2,64 log.

Unieruchamianie bakterii w formule kapsulek zapewniało im lepszą ochronę na warunki panujące w środowisku pH 2 w porównaniu z formułą immobilizacji w kulkach z pełnego żelu.

Słowa kluczowe: bifidobakterie, bakterie fermentacji mlekowej, immobilizacja, technologia wibracyjna, alginian, symulowane warunki przewodu pokarmowego

THE SURVIVAL OF BACTERIA CELLS IMMOBILIZED IN GELLED BEADS AND CAPSULES WITH A LIQUID CORE DURING A SIMULATED GASTROINTESTINAL TRANSIT

Summary

The survival of microorganism of *Bifidobacterium* sp. and lactic acid bacteria (LAB) in gelled beads or capsules with a liquid core under the conditions simulating the transit through the upper intestinal tract – stomach (pH 2) and small intestine (pH 8) has been examined. Immobilization was conducted by vibration method using sodium alginate. The high resistance of all cultures, both free and immobilized, during the simulated 240 min transit through small intestine was observed, with a great sensitivity of all free cells to the stomach transit conditions. None of the studied strains in the form of free cells survived 180 min at pH 2. After 90 min the total inactivation of *S. thermophilus* T_KM₃, *B. breve* ATCC 15700 and *B. breve* KN65FP6-FERBEV was noted, while the decrease of free cells of *L. plantarum* KKP384 was 4,16 log and *B. infantis* ATCC 15697 – 6,31 log.

Cell immobilization, whether in capsules or in gelled beads, significantly increased the survival of bacteria in simulated conditions of stomach juice of pH 2. The most resistant were *L. plantarum* KKP384 and *B. infantis* ATCC 15697 strains. The decrease of cell number of *L. plantarum* KKP384 in capsules and in beads was 1.28 log and 1.76 log, respectively. Slightly higher decrease of cell number was noticed at *B. infantis* ATCC 15697 – 2.12 log and 2.64 log for capsules and beads, respectively.

Immobilization of bacterial cells in capsules provided them better protection from the pH 2 environment compared to immobilization in gelled beads.

Key words: bifidobacteria, lactic acid bacteria, immobilization, vibration technology, alginate, simulated gastrointestinal tract

WSTĘP

Niekorzystne warunki panujące w przewodzie pokarmowym człowieka, takie jak niskie pH w żołądku, obecność enzymów i kwasów żółciowych, ograniczają przeżywalność pożytecznych bakterii fermentacji mlekowej i bifidobakterii wprowadzanych do organizmu z pożywieniem. Odpowiednio zastosowana immobilizacja komórek drobnoustrojów może w znacznym stopniu je chronić i podwyższać odporność podczas tranzytu przez przewód pokarmowy, co jest gwarancją zachowania ich właściwości probiotycznych.

Jako matryce immobilizacyjne do celów spożywczych służą hydrokoloidy: alginian,

chitozan, karageny, guma gellan, guma guar, pektyna, żelatyna, jak również skrobie, białka serwatkowe, sojowe i białka kazeiny [Chopde i in. 2014; Martin i in. 2015; Bartkowiak 2016].

Z tak dużej gamy dostępnych biopolimerów pochodzenia naturalnego, najczęściej używany w procesie immobilizacji był i nadal jest alginian, przede wszystkim ze względu na swoje dobre właściwości żelujące, biokompatybilność i nietoksyczność dla mikroorganizmów [Etchepare i in. 2015; Yeung i in. 2016 (b)]. W wielu przeprowadzonych doświadczeniach *in vitro* wykazano jego ochronne działanie na komórki bakterii w środowisku soku żołądkowego i jelitowego [Lee i Heo 2000; Etchepare i in. 2015; De Prisco i in. 2015]. Są jednak również doniesienia, iż matryce alginianowe w niedostateczny sposób mogą zapobiegać dyfuzji i chronić kapsułkowane mikroorganizmy [Etchepare i in. 2015]. Dlatego też w celu zwiększenia wytrzymałości kapsułek alginianowych i podtrzymania trwałości immobilizowanych bakterii, alginian często łączy się z innymi biomateriałami, np. z gumą ksantanową [Kim S-J i in. 2008], ze skrobią [Fahimdanesh i in. 2012; Hasiah i in. 2014; Zanjani i in. 2014], z białkiem [Martin i in. 2015]. Stosuje się ponadto dodatkowe powłoki, np. z alginianu [Mokarram i in. 2009] lub chitozanu [Trabelsi i in. 2013; Yeung i in. 2016 (b)]. Wykazano, iż kapsułkowanie bifidobakterii w alginianie z dodatkowym powleczeniem z chitozanu nie przedłużało żywotności komórek w czasie przechowywania i tranzytu przez górne odcinki przewodu pokarmowego, w porównaniu z komórkami w samych kulkach alginianowych [Yeung i in. 2016 (b)]. Ostatnio potwierdzono, że komórki *Lactococcus lactis* mogą być zamykane w mikrożelach alginianowych w celu poprawy ich trwałości w trakcie przechowywania [Yeung i in. 2016 (a)].

Bardzo ważnym zagadnieniem w enkapsulacji jest wybór odpowiedniej techniki immobilizacyjnej i dobór takich metod, które nie będą uszkadzać komórek bakterii w czasie ich unieruchamiania, a będą skutecznie chronić przed środowiskiem zewnętrznym [Gbassi i Vandamme 2012]. Wśród wielu technik immobilizacyjnych wykorzystywanych do hermetyzacji probiotyków wymienia się m.in. ekstruzję, technologie emulsyjną i suszenie rozpyłowe [Ozyurt i in. 2014; Chopde i in., 2014]. Każda z nich ma swoje wady i zalety, np. w technice emulsyjnej uzyskiwane kapsułki nie są monodispersyjne. I chociaż pojawiły się już pierwsze doniesienia o rozwiązaniu tego problemu, nadal jednak jest to kosztowna metoda [Haffner i in. 2016]. Atrakcyjne pod względem ekonomicznym jest suszenie rozpyłowe, lecz punktem krytycznym dla bakterii jest wysoka temperatura stosowana w tym procesie [Haffner i in. 2016]. Najłagodniejsze warunki hermetyzacji komórek bakterii zapewnia ekstruzja [Ozyurt i in. 2014; Etchepare i in. 2015; Haffner i in. 2016], dlatego też zajmuje ona coraz więcej miejsca w badaniach naukowych, z uwzględnieniem możliwości zastosowania jej

w warunkach przemysłowych [De Prisco i in. 2015]. Technika ekstruzji polega na formowaniu kropli hydrożelowych i utwardzaniu ich w roztworze polimeryzującym. Obejmuje metodę z rotującym dyskiem, metodę wibracyjną, Jet-Cutter (metoda obrotowej struny), elektrostatyczną oraz metodę z aerodynamicznym rozpraszaniem [Martin i in. 2015; Bartkowiak 2016].

W świetle charakterystyki morfologicznej struktur otrzymywanych w procesie mikrokapsułkowania wyróżniamy strukturę matrycową, gdzie materiał biologiczny jest unieruchamiany w litej matrycy hydrożelowej lub układ rdzeniowo-matrycowy, w którym rdzeń może być płynny lub stały, a membrana pojedyncza lub podwójna. Lita matryca może też stanowić rdzeń otoczony powłoką [Dubey i in. 2009; Burgain i in. 2011; Bartkowiak 2016]. W każdym z tych przypadków proces unieruchamiania materiału biologicznego nazywa się ogólnie kapsułkowaniem, choć przez niektórych autorów obudowanie w samej matrycy klasyfikowane jest jako pułapkowanie, a otrzymywana tym sposobem mikrocząstka nazywana jest kulką żelową, natomiast układ z rdzeniem i otaczającą powłoką klasyfikowane jest jako kapsułkowanie, a mikrocząstka nazywa się kapsułką [Dembczyński 2004; Bakula 2013].

Jak dotąd, w przeprowadzonych licznych doświadczeniach laboratoryjnych autorzy badali przeżywalność komórek bakteryjnych unieruchamianych w jednolitej matrycy lub matrycy powlekaną dodatkową powłoką hydrożelową. Brakuje doświadczeń, w których sprawdzano by skuteczność ochrony komórek bakteryjnych zamkniętych w kapsułkach hydrożelowych z ciekłym rdzeniem w porównaniu z komórkami unieruchomionymi w litej matrycy. Obie struktury mogą być wytwarzane z użyciem metody wibracyjnej, polegającej na wprowadzaniu w drgania strumienia roztworów, w wyniku czego dzieli się on na jednorodne krople, ulegające następnie dyspersji w wyniku nałożenia jednoimiennego ładunku elektrostatycznego.

Głównym celem niniejszej pracy było porównanie skuteczności enkapsulacji wybranych szczepów bakterii dwoma powyższymi sposobami w warunkach symulowanego tranzytu przez górne odcinki przewodu pokarmowego. Do badań wykorzystano enkapsulator firmy Büchi, umożliwiający uzyskiwanie jednorodnych, kulistych mikrokształtów o średnicach z zakresu 150–2000 μm przy niewielkim rozrzucie wielkości zadanej: $SD < 5\%$. [Büchi Labortechnik 2013].

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

1. Material biologiczny

Materiał do badań stanowiły szczepy z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych IBPRS: *Lactobacillus plantarum* KKP2025p, *Streptococcus thermophilus* T_KM₃ KKP2030p, *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 KKP2029p, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 KKP2028p oraz *Bifidobacterium breve* KN65FP6-FERBEV. Szczepy przechowywano w temperaturze – 70°C przy użyciu systemu Viabank (Abtek Biologicals Ltd., Liverpool, Wielka Brytania). W zależności od gatunku mikroorganizmu, kultury ożywiano przez dwukrotny pasaż: *Lactobacillus* na podłożu MRS (de Man, Rogosa i Sharpe; Merck, Niemcy), *Streptococcus* na podłożu LAB [Davies i in. 1971] w warunkach tlenowych oraz bifidobakterie na modyfikowanym podłożu Garche'a [Majkowska i in. 2003], w warunkach beztlenowych. Wszystkie szczepy hodowano w temperaturze 37°C przez 24 h. Hodowlę bakterii wirowano przez 10 min w temperaturze 4°C przy obrotach 6000 x g, a następnie przemywano dwukrotnie i zawieszano w roztworze soli fizjologicznej. Zawiesinę bakterii zużywano natychmiast po przygotowaniu do immobilizacji oraz badania przeżywalności swobodnych komórek w warunkach symulowanego tranzytu przez górne odcinki przewodu pokarmowego.

2. Immobilizacja komórek bakterii w alginianie wapnia

Immobilizację komórek bakterii przeprowadzono metodą wibracyjną przy użyciu Enkapsulatora B-395 Pro firmy Büchi, umożliwiającego produkcję jednorodnych struktur z zastosowaniem dwóch sposobów unieruchamiania komórek bakterii: rozproszonych w kulkach pełnożelowych (rysunek 1A) lub we wnętrzu kapsulek zbudowanych z otoczki żelowej (rysunek 1B).

Doświadczenie prowadzono w warunkach sterylnych zgodnie z procedurą Büchi (<http://buchi.com>), wykorzystując jako nośnik do immobilizacji 1,5% alginian sodu (Sigma-Aldrich, USA) oraz do jego utwardzania roztwór 0,1 M CaCl₂ (POCH, Polska) w wodzie dejonizowanej.

W celu wyprodukowania kulek pełnożelowych, świeżo przygotowaną zawiesinę komórek bakterii łączono ze sterylnym roztworem alginianu sodu w proporcji 1:5, umieszczano w strzykawce enkapsulatora i prowadzono immobilizację, używając dyszy pojedynczej o średnicy 300 µm, przy następujących parametrach procesu: częstotliwość drgań 800 Hz, napięcie elektrody 1300 V, amplituda 3, prędkość przepływu zawiesiny bakteryjnej

z alginianem 7 mL/min. Uformowane w czasie 10 minut i zebrane na sicie kulki przepłukiwano jałową wodą dejonizowaną i zużywano natychmiast po przygotowaniu.

Natomiast do produkcji kapsułek z ciekłym rdzeniem użyto koncentrycznego zestawu dysz, składającego się z dyszy wewnętrznej o średnicy 150 μm oraz dyszy zewnętrznej o średnicy 300 μm . W tym przypadku zawiesinę bakterii, stanowiącą płyn rdzeniowy kapsułki, pompowano ze strzykawki do dyszy koncentrycznej za pomocą pompy strzykawkowej, natomiast alginian, stanowiący otoczkę mikrokapsułki, przetłaczano z butelki ciśnieniowej do dyszy koncentrycznej pod ciśnieniem azotu. Zastosowano następujące parametry procesu: częstotliwość drgań 1000 Hz, napięcie elektrody 1500 V, amplituda 2, prędkość przepływu zawiesiny bakteryjnej 1,5 mL/min, ciśnienie 360–380 hPa.

3. Badanie wyglądu mikrocząstek

Otrzymane mikrocząstki identyfikowano na podstawie wyglądu, za pomocą mikroskopu optycznego Olympus CX40, stosując 150-krotne powiększenie. Zdjęcia wykonywano aparatem cyfrowym Olympus C5060.

4. Pomiar wielkości mikrocząstek

Rozmiar mikrocząstek określano metodą dyfrakcji laserowej przy użyciu urządzenia Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, Wielka Brytania). Pomiaru dokonywano w trybie ręcznym, w przystawce do dyspersji cieczowych Hydro EV. Zawieszona cząstki w roztworze wodnym mieszano przy prędkości 2500 obr/min.

Wyniki pomiaru wielkości mikrocząstek podano jako wartość $D[3,2]$, która jest zdefiniowana jako średnia średnica kuli równoważna pod względem powierzchni:

$$D[3,2] = \Sigma d^3 / \Sigma d^2$$

oraz jako wartość $D[4,3]$, która jest zdefiniowana jako średnia średnica kuli równoważna pod względem objętości: $D[4,3] = \Sigma d^4 / \Sigma d^3$

gdzie: d oznacza średnicę pojedynczej mikrocząstki [Baliński 2013].

5. Oznaczanie liczebności populacji bakterii

Liczebność komórek swobodnych oznaczano metodą płytkową, posiewając na odpowiednie podłoże agarowe (pkt 1), a następnie inkubując przez 48 godzin w temperaturze 37°C.

W celu oznaczenia liczebności bakterii w postaci immobilizowanej, utwardzone biopolimery z komórkami bakterii precedzano przez sito ze stali nierdzewnej o średnicy

oczek 0,4 mm. Odważano 1 g, przemywano jałową wodą dejonizowaną i zalewano, w celu rozmiękczenia, na 5min 29 mL sterylne 0,1 M cytrynianu sodu (Sigma-Aldrich, USA), po czym worteksowano przy nastawieniu na wskaźnik „5” do całkowitego rozpuszczenia alginianu wapnia, a następnie postępowano tak jak w przypadku swobodnej populacji bakterii.

6. Przygotowanie soków – żołądkowego i trzustkowego

Świeże soki odtwarzano do badań codziennie na podstawie metodyki opisanej przez Charteris i in. [1998]. Zawiesinę preparatu Pepsin [Sigma-Aldrich, P-700] o stężeniu 3 g L⁻¹ oraz Pancreatin USP [Sigma-Aldrich, P-1500] o stężeniu 1 g L⁻¹, przygotowywano w sterylnej solance (5 g L⁻¹), doprowadzając pH roztworu do 2,0 lub 8,0 przy użyciu stężonego HCl lub 0.1 mol L⁻¹ NaOH.

7. Oznaczanie tolerancji bakterii na symulowany tranzyt przez żołądek i jelito cienkie

Tolerancję bakterii na tranzyt przez żołądek i jelito cienkie przeprowadzano na podstawie zmodyfikowanej wersji metody wg Charteris i in. [1998].

a) tranzyt w postaci swobodnej

Przygotowaną świeżo zawiesinę komórek w postaci swobodnej przenoszono w ilości 2 mL do probówki zamykanej kapslem na gwint i dodawano po 10 mL odtworzonych soków: żołądkowego lub trzustkowego. Zawartość probówek mieszano i inkubowano w temperaturze 37°C. Przy badaniu tranzytu żołądkowego, 1 mL mieszaniny reakcyjnej z pepsyną pobierano po 1, 90 i 180 min do oznaczeń ogólnej ilości komórek przeżywających. Przy badaniu liczby komórek tolerujących tranzyt w warunkach jelita cienkiego, do oznaczeń pobierano po 1 mL mieszaniny z pankreatyną, po upływie 1 i 240 min inkubacji.

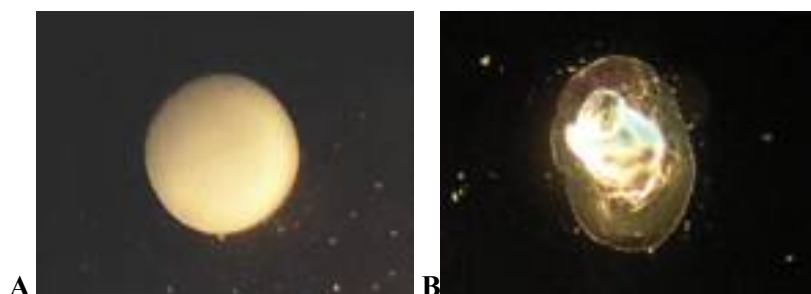
b) tranzyt w postaci immobilizowanej w alginianie wapnia

Immobilizowane komórki bakterii, świeżo przygotowane do oznaczeń w ilości 2 g, umieszczano w probówce z kapslem na gwint, po czym przy oznaczaniu symulowanego pasażu przez żołądek i jelito cienkie postępowano według opisu podanego dla komórek swobodnych. Liczbę komórek immobilizowanych oznaczano według opisu podanego w pkt 5.

8. Statystyczna analiza wyników została przeprowadzona metodą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA testem Duncana ($p \leq 0,05$) [Statistica 7.1 StatSoft].

WYNIKI I DYSKUSJA

Przykłady wyprodukowanych mikrocząstek w postaci kulki pełnożelowej oraz kapsułki z ciekłym rdzeniem przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1 Zdjęcia z mikroskopu optycznego (150x): (A) kulka pełnożelowa wytwarzana przy użyciu pojedynczej dyszy o średnicy 300 μm , (B) kapsułka z ciekłym rdzeniem wytwarzana przy użyciu koncentrycznej dyszy o średnicy 150/300 μm .
Optical microscope images (150x): (A) gelled bead obtained using single nozzle of 300 μm diameter, (B) capsule with a liquid core obtained using concentric nozzle of 150/300 μm diameter

Na zdjęciu (A) jest widoczna pełnożelowa matryca alginianowa o kulistym kształcie, w której równomiernie została rozproszona zawiesina komórek bakterii, na zdjęciu (B) przedstawiono kapsułkę z powłoką z alginianu wapnia, wypełnioną zawiesiną bakterii w rdzeniu. Średnia wielkość otrzymanych mikrocząstek była zbliżona, co potwierdza wynik pomiaru za pomocą dyfrakcji laserowej (tabela 1). Wartości średniej średnicy dla kulek pełnożelowych były równe: 510 μm (D [3,2]) i 525 μm (D[4,3]), natomiast wartości dla kapsulek wynosiły odpowiednio 524 i 563 μm . Wielkości te są zgodne z oczekiwaniami autorów pracy, gdyż użycie dysz enkapsulatora o określonej średnicy pozwala uzyskiwać mikrocząstki o oczekiwanej wielkości, czyli około dwa razy większej od rozmiaru zastosowanych dysz [Büchi Labortechnik 2013].

Tabela 1. Średnie średnice kulek i kapsulek z alginianu wapnia, mierzonych metodą dyfrakcji laserowej

Average diameters of calcium alginate beads and capsules, measured using laser diffraction method

Rodzaj mikrocząstek	D [3,2] μm	D [4,3] μm
Kulka pełnożelowa	510 \pm 4	525 \pm 2
Kapsułka z ciekłym rdzeniem	524 \pm 11	563 \pm 10

Dane stanowią średnie z trzech powtórzeń \pm odchylenie standardowe

Data are the means of three experiments \pm standard deviation

W doświadczeniach innych badaczy, prowadzonych z wykorzystaniem techniki wibracyjnej i alginianu wapnia, autorzy, stosując dyszę o rozmiarze 80 μm , uzyskali kulki o średniej średnicy 110 \pm 10 μm [De Prisco i in. 2015], mierzonej za pomocą mikroskopu świetlnego. Natomiast przy użyciu dyszy o średnicy 120 μm [Yeung i in. 2016 (b)] rozmiar kulek pełnożelowych, mierzony metodą dyfrakcji laserowej, mieścił się w zakresie 135–216 μm [D3,2] oraz 211–287 μm [D4,3].

Do badania przeżywalności mikroorganizmów w postaci komórek swobodnych i immobilizowanych w kulkach pełnożelowych oraz kapsułkach z ciekłym rdzeniem, w odtworzonych sokach przewodu pokarmowego, wybrano dwie kultury LAB: *Lactobacillus plantarum* KKP384 i *Streptococcus thermophilus* T_KM₃ oraz trzy kultury bifidobakterii: *B. infantis* ATCC 15697 KKP2029p, *B. breve* ATCC 15700 i *B. breve* KN65FP6-FERBEV.

Oznaczanie tolerancji bakterii na symulowany tranzyt przez żołądek i jelito cienkie przeprowadzono zgodnie z opisem w pkt 7. Podczas symulowanego pasażu bakterii w postaci swobodnej przez jelito cienkie stwierdzono niewielką, choć istotną statystycznie ($p \leq 0,05$), redukcję liczebności populacji w czasie 240 minut w przypadku *B. breve* ATCC 15700 oraz *B. breve* KN65FP6-FERBEV (tabela 2). Pozostałe badane szczepy bakterii w ciągu 4 godzin zachowały wyjściową liczbę komórek swobodnych. Odnotowano natomiast odmienny wpływ symulowanego pasażu przez jelito cienkie w przypadku kultur immobilizowanych w alginianie wapnia, zarówno w postaci kulek pełnożelowych, jak i kapsulek z ciekłym rdzeniem; po 240 min pozostawienia bakterii w środowisku jelita cienkiego nie stwierdzano istotnych statystycznie ($p \leq 0,05$) zmian liczebności populacji żadnego z badanych szczepów bakterii. Charteris i wsp. [1998], badając tolerancję na symulowany tranzyt przez górne odcinki przewodu pokarmowego szczepów *Bifidobacterium* oraz *Lactobacillus*, choć różnych od przedstawionych w niniejszym doświadczeniu, poczynili podobne obserwacje. Badacze ci

stwierdzili, iż na dziesięć badanych kultur, po 240 minutach ich symulowanego tranzytu przez jelito cienkie w postaci swobodnej, wystąpiła istotna statystycznie zmiana liczebności populacji w przypadku tylko dwóch szczepów.

W przeprowadzonych badaniach wykazano brak istotnych różnic ($p \leq 0,05$) pomiędzy inkubacją swobodnej kultury bakterii a immobilizowanej w postaci kapsułek oraz w postaci kulek pełnożelowych w symulowanym soku jelitowym z pankreatyną po 1 min i 240 min, wyjątek stanowił szczep *B. infantis* ATCC 15697KKP2029p, którego redukcja liczby swobodnych komórek po 240 min była istotnie wyższa od immobilizowanych. Rzepkowska i in. [2015] donoszą, iż większość szczepów bakterii fermentacji mlekowej jest odporna na działanie pankreatyny soku jelitowego.

Badanie tolerancji swobodnych kultur bifidobakterii i bakterii LAB na symulowane warunki żołądka przy pH 2 pozwoliło zaobserwować, że żadna z badanych kultur nie była zdolna przeżyć w tych warunkach do 180 minut (tabela 3). Po 90 minutach stwierdzono całkowitą inaktywację *S. thermophilus* T_KM₃, *B. breve* ATCC 15700 i *B. breve* KN65FP6FERBEV, natomiast spadek komórek swobodnych w przypadku *L. plantarum* KKP384 wynosił 4,16 log a *B. infantis* ATCC 15697 - 6,31 log. Wartości te były zbliżone do uzyskanych przez Rzepkowską i in. [2015], którzy w swoich badaniach stwierdzili obniżenie liczby komórek szczepów *Lactobacillus* o 7 log po 120 minutach inkubacji w soku o pH 2. Wg doświadczenia [Trabelsi i in. 2013] całkowita inaktywacja *L. plantarum* w soku żołądkowym o pH 2 nastąpiła dopiero po 4 godzinach. Natomiast w doświadczeniu El-Shafei i in. [2015] niewykrywalną liczbę swobodnych komórek *S. thermophilus* stwierdzono po 120 minutach (pH 2), a po 90 minutach spadek wyniósł ponad 5 faz logarytmicznych.

Badana przez Charteris i in. [1998] przeżywalność kilkunastu kultur *Bifidobacterium* oraz *Lactobacillus* w warunkach tranzytu żołądkowego okazała się wyższa niż stwierdzona w prezentowanej pracy. Podane przez cytowanych badaczy spadki liczebności populacji swobodnych komórek po 180 minutach w podobnych warunkach wynosiły dla większości kultur 3 cykle logarytmiczne. W innych badaniach [Yeung i in. [2016 (b)] stwierdzono spadek liczebności szczepu *B. infantis* o 2,7 log w soku żołądkowym (pH 2,5) już po 5 minutach. Klewicka i in. [2014] podają, że zróżnicowanie wrażliwości bakterii fermentacji mlekowej na niskie pH obserwuje się nie tylko między gatunkami, lecz także między szczepami.

W badaniach stanowiących przedmiot niniejszego doniesienia immobilizacja komórek bakterii istotnie zwiększała ich przeżywalność w symulowanym środowisku soku żołądkowego o pH 2, w przypadku unieruchamiania zarówno w kapsułkach, jak i w kulkach

pełnożelowych. Wszystkie badane szczepy utrzymywały zadowalającą oporność na niskie pH do 180 minut symulowanego pasażu. Najmniejszym spadkiem liczebności populacji charakteryzował się szczep *L. plantarum* KKP384, którego liczba komórek obniżyła się w opisywanych warunkach o 1,28 log w kapsułkach oraz o 1,76 log w kulkach pełnożelowych. Niższą przeżywalność stwierdzono w przypadku *S. thermophilus* T_KM₃, ponieważ liczebność w jego populacji zmniejszyła się o ok. 3 fazy logarytmiczne zarówno w kapsułkach, jak i w kulkach pełnożelowych. Corbo i in. [2012] zaobserwowali wyższy niż w opisywanych badaniach spadek (około 3 log) komórek *L. plantarum* zamkniętych w kulkach pełnożelowych w warunkach soku żołądkowego o pH 1,9 w czasie 2 godzin.

Spośród trzech badanych kultur bifidobakterii najlepszą tolerancję na symulowane środowisko soku żołądkowego wykazał szczep *B. infantis* ATCC 15697, którego liczba żywych komórek spadła o 2,12 fazy logarytmiczne w kapsułkach i o 2,64 fazy w kulkach pełnożelowych. Pozostałe dwa szczepy bifidobakterii w warunkach symulowanego pasażu przez żołądek wykazywały nieco wyższe spadki liczebności, na poziomie: 2,83 i 3,14 cykli logarytmicznych w kapsułkach oraz 3,37 i 3,77 log w kulkach, odpowiednio w przypadku *B. breve* ATCC 15700 i *B. breve* KN65. Tymczasem Sun i Griffith [2000] podają, iż immobilizowana w mieszaninie gum gellan+ksantan kultura *B. infantis* ATCC 15697, poddana oddziaływaniu środowiska żołądka o pH 2,0, nie przeżywała 30 minut doświadczenia. Dane te sugerują, iż alginian może lepiej chronić komórki bakterii przed wpływem środowiska niż gellan-ksantan.

Porównując przeżywalność komórek bakterii immobilizowanych w kapsułkach i w kulkach pełnożelowych, nie stwierdzono istotnej różnicy ($P \leq 0,05$) tego parametru pomiędzy obu formami w przypadku szczepu *S. thermophilus* T_KM₃, natomiast istotność różnic została potwierdzona w odniesieniu do pozostałych szczepów badanych bakterii. U pozostałych czterech badanych szczepów stwierdzono o około 0,5 log niższą redukcję liczebności komórek bakterii w kapsułkach. Znalazło to potwierdzenie w danych literaturowych, z których wynikało, iż kapsułki lepiej przyczyniają się do utrzymania liczebności populacji komórek bakterii, skuteczniej zapobiegając ich migracji do środowiska [Bakuła i in. 2013]. Szybkość migracji jest również zależna od wielkości mikrokapsulek [Bartkowiak 2016]; im są one większe, tym proces uwalniania wolniejszy, a tym samym większa skuteczność ochrony komórek. Zaobserwowana prawidłowość została wykazana już we wcześniejszych badaniach Lee i Heo [2000], według których przeżywalność wybranych szczepów bifidobakterii zamkniętych w matrycach alginianowych wzrastała wraz ze wzrostem ich liczebności oraz wzrostem stężenia żelu alginianowego i średnicy mikrocząstek.

Jednak możliwość zwiększania wielkości mikrocząstek, zakładając użycie mikroorganizmów do celów spożywczych, jest ograniczona ze względu na profil sensoryczny matrycy spożywczej [Ozyurt i in. 2014; Etchepare i in. 2015].

Tabela 2. Przeżywalność swobodnych i immobilizowanych w alginianie wapnia kultur bakterii w warunkach odtworzonego soku jelitowego (pH 8, 37°C)

Survival of free and immobilized in calcium alginate bacterial cultures at the conditions of reconstituted intestinal juice (pH 8, 37°C)

Kultura bakterii		Początkowa liczebność komórek [log jtk g ⁻¹]	Redukcja liczebności komórek [log]	
			1 min	240 min
<i>L. plantarum</i> KKP384 KKP2025p	Swobodna	8,40±0,06	0,06±0,06 A a	0,04±0,06 A a
	Immobilizowana – kapsułki	8,28±0,20	0,10±0,18 A a	0,03±0,14 A a
	Immobilizowana – kulki pełnożelowe	8,65±0,18	0,07±0,08 A a	0,07±0,07 A a
<i>S. thermophilus</i> T_KM₃ KKP2030p	Swobodna	8,10±0,12	0,12±0,10 A a	0,30±0,20 A a
	Immobilizowana – kapsułki	8,16±0,13	0,25±0,19 A a	0,18±0,18 A a
	Immobilizowana – kulki pełnożelowe	8,18±0,07	0,05±0,05 A a	0,21±0,20 A a
<i>B. infantis</i> ATCC 15697 KKP2029p	Swobodna	8,89±0,13	0,08±0,13 A a	0,30±0,05 B a
	Immobilizowana – kapsułki	8,73±0,03	0,02±0,02 A a	0,06±0,14 A a
	Immobilizowana – kulki pełnożelowe	8,44±0,08	0,01±0,05 A a	0,06±0,02 A a
<i>B. breve</i> ATCC 15700	Swobodna	8,61±0,07	0,06±0,01 A a	0,42±0,08 A b
	Immobilizowana – kapsułki	8,77±0,01	0,11±0,27 A a	0,16±0,26 A a
	Immobilizowana – kulki pełnożelowe	8,69±0,30	0,06±0,10 A a	0,13±0,01 A a
<i>B. breve</i> KN65 FP6-FERBEV	Swobodna	8,66±0,08	0,03±0,01 A a	0,36±0,07 A b
	Immobilizowana – kapsułki	8,95±0,07	0,03±0,15 A a	0,14±0,12 A a
	Immobilizowana – kulki pełnożelowe	8,89±0,09	0,01±0,02 A a	0,30±0,26 A a

Dane stanowią średnie z trzech powtórzeń. Oznakowane jednakowymi dużymi literami wartości w kolumnach oraz jednakowymi małymi literami wartości w wierszach, dla poszczególnych szczepów, nie różnią się istotnie ($p \leq 0,05$)

Data are the means of three experiments. Values denoted with the same uppercase letters in columns and the same lowercase letters in rows, for individual strains, do not differ significantly ($p \leq 0,05$)

Tabela 3. Przeżywalność swobodnych i immobilizowanych w alginianie wapnia kultur bakterii w warunkach odtworzonego soku żołądkowego (pH 2, 37°C)
Survival of free and immobilized in calcium alginate bacterial cultures at the conditions of reconstituted stomach juice (pH 2, 37°C)

Kultura bakterii	Początkowa liczebność komórek [log jtk g ⁻¹]	Redukcja liczebności komórek [log]			
		1 min	90 min	180 min	
<i>L. plantarum</i> KKP384	Swobodna	8,36±0,18	0,12±0,15 A a	4,16±0,16 B b	8,36±0,18 C c
KKP2025p	Immobilizowana – kapsułki	8,35±0,12	0,29±0,14 A a	0,60±0,28 A b	1,28±0,18 A c
	Immobilizowana – kulki pełnożelowe	8,66±0,09	0,10±0,07 A a	0,47±0,17 A b	1,76±0,22 B c
<i>S. thermophilus</i> TKM ₃	Swobodna	8,06±0,07	1,93±0,18 B b	8,06±0,07 B a	8,06±0,07 B a
KKP2030p	Immobilizowana – kapsułki	8,22±0,07	0,23±0,26 A a	1,65±0,34 A b	2,99±0,43 A c
	Immobilizowana – kulki pełnożelowe	8,00±0,17	0,24±0,26 A a	1,32±0,36 A b	3,14±0,32 A c
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	Swobodna	8,80±0,10	0,28±0,13 A a	6,31±0,35 C b	8,80±0,10 C c
KKP/2029p	Immobilizowana – kapsułki	8,70±0,06	0,19±0,15 A a	0,91±0,12 A b	2,12±0,16 A c
	Immobilizowana – kulki pełnożelowe	8,96±0,10	0,11±0,07 A a	1,88±0,15 B b	2,64±0,20 B c
<i>B. breve</i> ATCC 15700	Swobodna	8,56±0,02	0,43±0,17 B b	8,56±0,02 C a	8,56±0,02 C a
	Immobilizowana – kapsułki	8,74±0,12	0,19±0,05 A a	1,35±0,10 A b	2,83±0,16 A c
	Immobilizowana – kulki pełnożelowe	8,96±0,19	0,17±0,11 A a	2,09±0,20 B b	3,37±0,21 B c
<i>B. breve</i> KN65	Swobodna	8,68±0,16	0,42±0,11 A b	8,68±0,16 B a	8,68±0,16 C a
FP6-FERBEV	Immobilizowana – kapsułki	8,72±0,33	0,39±0,26 A a	2,01±0,08 A b	3,14±0,40 A c
	Immobilizowana – kulki pełnożelowe	8,98±0,38	0,24±0,23 A a	2,07±0,46 A b	3,77±0,34 B c

Dane stanowią średnie z trzech powtórzeń. Oznakowane jednakowymi dużymi literami wartości w kolumnach oraz jednakowymi małymi literami wartości w wierszach, dla poszczególnych szczepów, nie różnią się istotnie ($p \leq 0,05$)

Data are the means of three experiments. Values denoted with the same uppercase letters in columns and the same lowercase letters in rows, for individual strains, do not differ significantly ($p \leq 0.05$)

WNIOSKI

1. Immobilizacja komórek bakterii w alginianie wapnia metodą wibracyjną przy użyciu Enakapsulatora B-395 Pro umożliwiła otrzymanie stabilnych kapsułek i kulek o odpowiedniej strukturze i wymiarach.
2. Immobilizowane w alginianie wapnia komórki LAB i bifidobakterii – w formach kulek pełnożelowych lub kapsułek z ciekłym rdzeniem – cechowała wyższa niż komórki swobodne przeżywalność w symulowanym środowisku soku żołądkowego. Świadczy to o funkcji ochronnej immobilizowania bakterii w alginianie wapnia.
3. Lepszą ochronę przed warunkami panującymi w środowisku o pH 2 zapewniało unieruchamianie bakterii w kapsułkach z ciekłym rdzeniem niż unieruchamianie w kulkach pełnożelowych.
4. Wyniki pracy stwarzają podstawę do kontynuacji badań w kierunku wzbogacania biotum żywności fermentowanej immobilizowanymi komórkami bakterii oraz śledzenia ich przeżywalności w warunkach przechowywania żywności uzyskiwanej w procesie fermentacji.

PODZIĘKOWANIE

Zespół badawczy dziękuje firmie Donserv za wypożyczenie urządzenia Enkapsulator B-395 Pro do prowadzenia badań.

PIŚMIENNICTWO

1. Bakula Z., Stachowiak R., Wiśniewski J., Granicka L., Bielecki J. (2013). Immobilizacja komórek – znaczenie biomedyczne. *Post. Mikrobiol.*, 52, 3, 233-245
2. Balicki A. (2013). Podstawowe zagadnienia związane z pomiarem wielkości i rozkładu wielkości cząstek. *Prace Instytutu Odlewnictwa*, 1 (53), 3-12, doi: 10.7356/iod.2013.1
3. Bartkowiak A. Webinarium 2016, „Możliwości i ograniczenia zastosowania technologii mikrokapsułkowania w układach hydrożelowych”, <https://www.youtube.com/watch?v=Im2Ei38vPhQ>
4. Büchi Labortechnik AG, Flawil 1, Switzerland. (2013). Encapsulator B-390/B-395 Pro.
5. Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.*, 104, 467-483, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031

6. Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L., Collins J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 759-768
7. Chopde S., Pawar N., Kele V., Sudhakar Changade S. (2014). Microencapsulation of probiotic bacteria of available Techniques, focusing on biomaterials – a review. *Agri. Review*, 35 (4): 287-294, doi:10.5958/0976-0741.2014.00916.7
8. Corbo M. R., Bevilacqua A., Gallo M., Speranza B., Sinigaglia M. (2013). Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*: Performances and *in vivo* applications. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.*, 18, 196-202, doi:10.1016/j.ifset.2012.12.004
9. Dembczyński R., Jankowski T. (2004). Unieruchamianie komórek drobnoustrojów metodą kapsułkowania – stan obecny i możliwości rozwoju tej metody. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4 (41), 5-17
10. De Prisco A., Maresca D., Ongeng D. i wsp. (2015). Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* dsm 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. *LWT-Food Sci Technol*, 61, 452-462, doi: 10.1016/j.lwt.2014.12.011
11. Davis J. G., Ashton T. R., McCaskill M. (1971). Enumeration and viability of *L. bulgaricus* and *Str. thermophilus* in yogurts. *Dairy Ind.*, 36 (11), 569-573
12. Dubey R., Shami T. C., Rao K. U. B. (2009). Microencapsulation technology and applications. *Defence Sci. J.*, 59 (1), 82-95, doi: <http://dx.doi.org/10.14429/dsj.59.1489>
13. El-Shafei K., El-Sayed H. S., Dabiza N., Sadek Z. I., Sharaf O. M. (2015). The effect of microencapsulation on protection of isolated urease-producing *Streptococcus thermophilus* against stress conditions. *RJPBCS*, 6 (3), 1573
14. Etchepare M. A., Barin J. S., Cichoski A. J., Jacob-Lopes E., Wagner R., Fries L. L. M. i wsp. (2015). Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. *Ciênc. Rural*, 45, 1319-1326, doi.org/10.1590/0103-8478cr20140938
15. Fahimdanesh M., Mohammadi N., Ahari H., Khosravi Zanjani M.A., Hargalani F. Z., Behrouznasab K. (2012). Effect of microencapsulation plus resistant starch on survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* in mayonnaise sauce. *African J. Microbiol. Res.*, 6 (40), 68, doi:10.5897/AJMR12 1240

16. Gbassi G. K., Vandamme T. (2012). Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4 (1), 149-163, doi:10.3390/pharmaceutics4010149
17. Haffner F. B., Diab R., Pasc A. (2016). Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches. *AIMS Materials Science*, 3 (1), 114-136, doi: 10.3934/matensci.2016.1.114
18. Hasiyah A., Punnanee S., Suphitchaya Ch. (2014). Effect of encapsulation of selected probiotic cell on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 36 (3), 291-299
19. Kim S-J., Chob S. Y., Kim S. H., Song O. J., Shin II-S., Cha D. S., Park H. J. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT – Food Sci. Technol.*, 3, 493-500, doi: 10.1016/j.lwt.2007.03.025
20. Klewicka E., Śliżewska K., Nowak A. (2014). Ocena przeżywalności bakterii *Lactobacillus* zawartych w preparacie probiotycznym podczas pasażu w symulowanym przewodzie pokarmowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 6 (97), 170-181, doi: 10.15193/ZNTJ/2014/97/170-181
21. Lee Y. K., Heo R. T. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile acid solution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 869-873, doi: 10.1128/AEM.66.2.869-873.2000
22. Majkowska A., Bielecka M., Biedrzycka E. (2003). Selection of the probiotic strains of lactic acid bacteria stimulated by fructans in the presence of calcium. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 12 (53), SI 2, 64-68
23. Martin M. J., Lara-Villoslada F., Ruiz M. A., Morales M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, 27, 15-25, doi: 10.1016/j.ifset.2014.09.010
24. Mokarram R. R., Mortazavi S. A., Habibi Najafi M. B., Shahidi F. (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Res. Intern.*, 42, 1040-1045, doi:10.1016/j.foodres.2009.04.023
25. Ozyurt V. H., Ötles S. (2014). Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 13 (4), 413-424, doi: 10.17306/J.AFS.2014.4.8

26. Rzepkowska A., Zielinska D., Kołożyn-Krajewska D. (2015). Przeżywalność szczepów *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności w warunkach modelowych przewodu pokarmowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3 (100), 42-52, doi: 10.15193/zntj/2015/100/038
27. Sun W., Griffith M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *Int. J. Food Microbiol.*, 61, 17-25
28. Trabelsi I., Bejar W., Ayadi D., Chouayekh H., Kammoun R., Bejar S., Salah R. B. (2013). Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *Int. J. Biol. Macromol.*, 61, 36-42, doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.035
29. (a) Yeung T. W., Arroyo-Maya I. J., McClements D. J., Sela D. A. (2016). Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: enhancing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LM0230 viability using calcium alginate beads. *Food Funct.*, 7, 1797-1804, doi: 10.1039/C5FO00801H
30. (b) Yeung T. W., Üçok E. F., Tiani K. A., McClements D. J. (2016). Microencapsulation in alginate and chitosan microgels to enhance viability of *Bifidobacterium longum* for oral delivery. *Front Microbiol.*, 7, 494, doi:10.3389/fmicb.2016.00494
31. Zanjani M. A. K., Tarzi B. G., Sharifan A., Mohammadi N. (2014). Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iran J Pharm Res*, 13 (3), 843-852