

Marcin Schmidt

Agnieszka Olejnik-Schmidt

Metody selekcji mikroorganizmów o właściwościach probiotycznych

Prawidłowa dieta powinna dostarczać organizmowi właściwą ilość składników odżywczych, a zarazem zapewniać uczucie satysfakcji i dobrego samopoczucia. Wieloletnie badania wykazały, że - oprócz właściwości odżywczych - spożywane pokarmy mogą wpływać na funkcjonowanie naszego organizmu. Doprowadziło to do powstania pojęcia „żywność funkcjonalna”. Żywność taka oprócz podstawowych składników pokarmowych może zawierać związki bioaktywne wykazujące dodatkowe właściwości prozdrowotne. Coraz większa świadomość konsumentów dotycząca wpływu diety na samopoczucie i stan zdrowia zwiększa zainteresowanie takimi innowacyjnymi produktami spożywczymi. Jedną z najbardziej znaczących grup takich produktów jest żywność probiotyczna i suplementy diety zawierające probiotyki.

Fermentowane produkty spożywcze zawierające żywe mikroorganizmy są stosowane w tradycyjnym żywieniu w celu poprawy i utrzymania równowagi funkcjonowania układu pokarmowego. Zastosowanie żywych mikroorganizmów w celu polepszenia stanu zdrowia i poprawy samopoczucia stanowi podstawę idei probiotyku. Produkt probiotyczny jest definiowany jako preparat lub produkt zawierający wystarczającą ilość żywych i zdefiniowanych mikroorganizmów, które zmieniają mikroflorę organizmu gospodarza wpływając korzystnie na jego zdrowie [7]. Na rynku jest wiele produktów probiotycznych i ich liczba ciągle rośnie. Wiele z nich nie ma działania prozdrowotnego udokumentowanego badaniami naukowymi. W wielu produktach szczepy mikroorganizmów określane jako probiotyczne nie wykazują zdolności do przeżycia w przewodzie pokarmowym lub liczba ich komórek jest zbyt niska, aby mogły wywołać oczekiwane efekty. Żywność zawierająca mikroorganizmy probiotyczne będzie wywierała pozytywny wpływ na zdrowie konsumenta dopiero wtedy, gdy wszystkie zalecenia dotyczące jej aktywnego składnika będą spełnione.

KRYTERIA SELEKCJI I OCENY szczepów probiotycznych

W celu zaprojektowania produktu o korzystnym wpływie na zdrowie konsumenta, zawierającego mikroorganizmy probiotyczne, niezbędne jest zrozumienie mechanizmów ich działania oraz odpowiednia selekcja szczepów. Dlatego sformułowano kryteria kwalifikacji i selekcji szczepów oraz oceny efektywności ich działania w badaniach żywieniowych i klinicznych, są one następujące [26]:

- właściwość identyfikacji taksonomicznej,
- pochodzenie od człowieka,
- bezpieczeństwo i niepatogenność,
- dobra przeżywalność w procesach technologicznych,
- przeżywalność w niskim pH soku żołądkowego,
- przeżywalność w obecności żółci,
- adhezja do nabłonka jelita,
- aktywność antybakteryjna (przeciwko patogenom),
- obecność dokumentacji naukowej szczepu,

STRESZCZENIE:

Wzrost zapadalności na choroby cywilizacyjne zwiększa zapotrzebowanie na żywność funkcjonalną, której zadaniem jest wspomaganie zdrowia człowieka. Prozdrowotne działanie probiotyków przejawia się zapobieganiem, zmniejszaniem częstotliwości występowania lub łagodzeniem przebiegu niektórych

schorzeń związanych z układem pokarmowym i odpornościowym. W artykule omówiono kategorie i metody selekcji szczepów probiotycznych na podstawie zalecenia WHO/FAO z 2001 r. oraz najnowsze ustalenia środowiska naukowego specjalizującego się w tej dziedzinie.

SUMMARY:

Increased incidence of civilization diseases increases public demand for functional foods. Beneficial effects of probiotics on human health are displayed by prevention, decreasing occurrence and soothing outcome of several illnesses associated with

gastrointestinal tract and immune responses. This review discusses probiotic strains' selection categories and techniques according to WHO/FAO guidelines from 2001 and the latest improvements proposed by probiotic scientific community.

- badania żywieniowe lub kliniczne przeprowadzone na losowo dobranych ochotnikach z podwójnie kontrolowaną „ślepa” próbą,
- wyniki badań prowadzonych z zastosowaniem danego szczepu powinny być opublikowane w renomowanych czasopismach.

Potwierdzeniem posiadania przez dany mikroorganizm cech probiotyczności mogą być badania *in vitro* oraz *in vivo* na zwierzętach modelowych. Ostateczne dowody mogą dostarczyć jedynie prawidłowo zaplanowane i kontrolowane testy kliniczne lub żywieniowe przeprowadzone na ludziach. Powinny one być przeprowadzone przez co najmniej dwie niezależne grupy badawcze z różnych ośrodków. W analizie funkcjonalnej potencjalnych szczepów probiotycznych pojawił się także nurt selekcji ukierunkowanej (**tabela**) na obniżeniu ryzyka zachorowalności lub terapię wybranego schorzenia.

IDENTYFIKACJA TAKSONOMICZNA

Produkt probiotyczny musi zawierać prawidłowo zidentyfikowany taksonomicznie mikroorganizm. Warunek ten wynika z analizy dostępnych na rynku środków spożywczych, która wykazała, że w niektórych przypadkach deklarowany na etykiecie mikroorganizm nie jest obecny w produkcie [4]. Przynależność gatunkowa stosowanego szczepu powinna zostać określona metodami molekularnymi i podana w aktualnie obowiązującej nomenklaturze taksonomicznej. Preferowanymi metodami są: analiza sekwencji kodującej cząsteczkę 16S rRNA (16S rDNA) lub hybrydyzacja DNA/DNA [10], choć dopuszczalne jest także zastosowanie analizy PCR z gatunkowo specyficznymi starterami [23]. Szczep probiotyczny powinien zostać zdeponowany w renomowanej kolekcji mikroorganizmów. Wskazane jest, aby udostępnione były materiały referencyjne

SŁOWA KLUCZOWE:

probiotyk, selekcja, żywność funkcjonalna, suplement diety, nutrigenomika

KEY WORDS:

probiotic, selection, functional food, dietary supplement, nutrigenomics

do genotypowej jego identyfikacji (np. przy zastosowaniu metod PFGE, Rep-PCR, AP-PCR, AFLP-PCR, lub RAPD-PCR) [5, 12].

POCHODZENIE OD CZŁOWIEKA

Przewód pokarmowy człowieka jest zasiedlany w pierwszej kolejności przez szczepy należące m.in. do rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Następuje to już w pierwszych dniach życia noworodka podczas karmienia piersią [9, 18]. Szczepy należące do tych rodzajów taksonomicznych są też najczęściej stosowane w produkcji żywności probiotycznej. Postulat, że szczepy probiotyczne powinny być pochodzenia „ludzkiego” wynika z obserwacji, iż takie szczepy najlepiej przylegają i kolonizują przewód pokarmowy człowieka wzmacniając jego odporność na kolonizację patogenów [11]. Hipoteza ta nie została wystarczająco potwierdzona i przemysł mleczarski stosuje także probiotyczne bakterie pochodzące z innych źródeł (np. izolowane z produktów fermentowanych lub przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt

jako probiotyków podawanych w dużych ilościach ludziom z kłopotami zdrowotnymi nasuwa pewne wątpliwości co do bezpieczeństwa. Takie izolaty nie mają tzw. historii bezpiecznego użycia, tak jak kultury starterowe produktów fermentowanych, stosowane nawet setkami lat, a badania epidemiologiczne nie wiążą ich z żadnymi stanami chorobowymi. Ich obecność w komercyjnych produktach oferowanych przez ostatnie dekady na rynku nie stwarza powodów do niepokoju [28]. Istotną przesłanką dopuszczającą wybrany mikroorganizm do stosowania jako składnik żywności lub suplement diety jest jego obecność, jako gatunku, na liście względnego domniemania bezpieczeństwa (*Qualified Presumption of Safety*) Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności [8]. Patogeny potencjał bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* jest niski, aczkolwiek pojawiają się raporty o zakażeniach oportunistycznych u osób o obniżonej odporności. Nie są one jednak kojarzone z suplementacją probiotykami, a szczepy te prawdopodobnie należały do endogennej mikroflory organizmów chorych osób [17, 27, 28].

Uznanie innych mikroorganizmów stosowanych jako probiotyki (m.in. szczepów z rodzaju *Enterococcus* i *Bacillus* albo gatunków *Saccharomyces boulardii* lub *Clostridium butyricum*) za bezpieczne wymaga jednak dalszego badania [10]. Testami pozwalającymi określić bezpieczeństwo stosowania szczepów są m.in. analizy *in vitro* ich zdolności do rozkładania śluzu i agregacji płytek krwi. Negatywne wyniki wskazują na brak zdolności do inwazji w głąb tkanek i wywoływania bakteryjnego zapalenia wsierdza, aczkolwiek pożądanym jest potwierdzenie tych wyników badaniami na zwierzętach i obserwacjami bezpiecznego stosowania u ludzi. Badania na zwierzętach polegają na kolonizacji młodych myszy, a następnie ocenie ogólnych parametrów fizjologicznych organizmu, morfologii nabłonka jelitowego oraz obecności bakterii we krwi i tkankach [27].

Kontrowersyjną cechą, z uwagi na bezpieczeństwo, jest oporność na antybiotyki. Jest to cecha pożądana w odniesieniu do wspomagania utrzymania i przywrócenia równowagi mikroflory jelitowej przy terapii antybiotykowej, aczkolwiek pewne obawy budzi możliwość jej przeniesienia do szczepów patogennych. Jednym z testów pozwalających zbadać cechę oporności na antybiotyki jest metoda krążkowo-dyfuzyjna. Należy jednak pamiętać, że oporność na niektóre antybiotyki wynika z budowy ściany komórkowej (stanowiącej dla nich nieprzepuszczalną barierę) lub struktury cząsteczek 16S i 23S rRNA oraz gyrazy DNA (będących punktem docelowym ich działania). Dotychczas nie odnotowano przeniesienia cech warunkujących oporność tego typu w odróżnieniu od przeniesienia sekwencji kodujących enzymy inaktywujące antybiotyki lub usuwające je z komórki [2, 29, 31].

PRZEŻYWALNOŚĆ

Żywotność szczepu probiotycznego jest uważana za niezbędny czynnik uzyskania pożądanego efektów zdrowotnych. Po spożyciu mikroorganizmy te muszą pokonać dwie główne bariery obronne organizmu: kwaśne środowisko soku żołądkowego i żółć wydzielaną do dwunastnicy. Aby potwierdzić zdolność mikroorganizmów do przeżycia warunków panujących w układzie pokarmowym, testuje się *in vitro* ich tolerancję wobec kwaśnego odczynu środowiska (pH 3, kwas solny) i obecności soli żółciowych w stężeniach panujących w dwunastnicy. Czasami bada się także wpływ enzymów trawiennych (np. pepsyny,

Tabela. Kryteria selekcji probiotyków ukierunkowanych [10]

Probiotyczna cecha	Cel działania	Efekt
Adhezja	przewód pokarmowy, kolonizacja wybranego miejsca, wpływ na lokalne mikroorganizmy	zrównoważenie składu mikroorganizmów jelitowych, zapobieganie stanom zapalnym, polepszenie bariery ochronnej
Produkcja metabolitów	aktywność przeciwdrobnoustrojowa, lokalny wpływ na nabłonek	naprawa i polepszenie bariery ochronnej, regulacja perystaltyki
Stymulacja produkcji cytokin	stany zapalne i zwiększone ryzyko ich powstania	ochrona przed zaburzeniami w odpowiedzi immunologicznej
Wiązanie toksyn	toksyny (mykotoksyny, cyjanotoksyny, metale ciężkie) i inne zanieczyszczenia żywności	ochrona integralności nabłonka jelitowego, redukcja ryzyka związanego z zatruciami
Zdolność wykrywania innych mikroorganizmów	wykrywanie i odpowiedź na zmiany w składzie mikrobiologicznym układu pokarmowego	równoważenie składu mikrobiologicznego i odpowiedzi immunologicznej, zwalczanie patogenów
Wpływ na ekspresję genów	aktywacja lub wyciszenie genów komórek nabłonkowych	pozytywne efekty zdrowotne tkanek układu pokarmowego, redukcja ryzyka rozwoju chorób
Bezpieczeństwo	nieinwazyjność w modelach linii komórek nabłonkowych, indukcja produkcji przeciwzapalnych cytokin, brak genów oporności na antybiotyki	bezpieczeństwo stosowania w żywności w połączeniu z właściwościami promującymi zdrowie
Poznany genom	poznanie szczegółowych danych o cechach	dobór oparty na indywidualnym zapotrzebowaniu konsumenta
Produkcja hydrolazy soli żółciowych	dekoniugacja kwasów żółciowych	obniżenie poziomu cholesterolu

rzętu konsumujących takie produkty: *B. animalis* i *B. lactis*) [3, 20]. Do gatunków najczęściej izolowanych z jelita grubego człowieka należą: *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. infantis*, *B. longum* i *B. pseudocatenulatum*, natomiast z rodzaju *Lactobacillus* (izolowane zarówno z kału, jak i bezpośrednio ze śluzówki jelita): *Lb. paracasei*, *Lb. salivarius*, *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. paracasei*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus* i *Lb. plantarum* [19, 22].

BEZPIECZEŃSTWO i niepatogenność

Tradycyjne kultury starterowe opierające się na bakteriach fermentacji mlekowej mają status bezpiecznych (*GRAS - generally regarded as safe*) [21]. Zastosowanie izolatów uzyskanych z układu pokarmowego osób zdrowych

pankreatyny) [10, 27]. Bakterie fermentacji kwasu mlekowego wykazują różny stopień odporności na te dwa czynniki, co powoduje, że poszczególne szczepy są mniej lub bardziej przydatne do zastosowania jako probiotyki.

Uważa się, że w celu uzyskania prozdrowotnych efektów niezbędne jest codzienne spożycie od 10^9 do 10^{10} żywych komórek szczepów probiotycznych. Wynika to m.in. z badań klinicznych, które wykazały, że drogę do jelita cienkiego przeżywa od 10 do 40% spożytych komórek. Z kału można wyizolować 10^6 - 10^8 jtk/g danego szczepu probiotycznego. Porównanie całkowitej dawki i przeżywalności wskazuje, że probiotyki nie tylko są zdolne do przeżycia w układzie pokarmowym, ale także rozmnażają się tam [28]. Rozmnażanie się probiotycznych szczepów w obrębie układu pokarmowego prowadzi do wzrostu liczebności populacji probiotyku, a więc podwyższenia stężenia ich metabolitów, co zwiększa ich zdolność do wywoływania korzystnego wpływu na organizm gospodarza [10]. Założenie, że żywotność szczepu probiotycznego w produkcie jest niezbędna dla uzyskania oczekiwanych rezultatów zdrowotnych, zostało podważone w przypadku niektórych cech.

Sytuacja taka zachodzi w przypadkach zapobiegania nietolerancji laktozy, w niektórych przypadkach modulacji aktywności układu immunologicznego i ochrony przed efektami nadwrażliwości. Prozdrowotne działanie tych cech funkcjonalnych może być uzyskane przez zastosowanie martwych komórek lub ich fragmentów, enzymów komórkowych lub produktów fermentacji [28]. Dlatego określenie aktywnego składnika produktu probiotycznego jest niezbędne do ustalenia parametrów kontroli jakości dla procesów produkcyjnych i przechowywania. Zabiegi mające na celu uzyskanie maksymalnej długości okresu przydatności do spożycia muszą zostać skoncentrowane na utrzymaniu optymalnego poziomu tego składnika, niezależnie od tego, czy są to żywe komórki, czy tylko ich elementy [28].

Najnowsze badania wyłoniły jeszcze jeden aspekt w odniesieniu do żywotności probiotyków. Zaobserwowano, że bakterie w produktach fermentowanych mogą przechodzić w stan uśpienia (*viable but nonculturable*). Zachowują integralność komórki i aktywność metaboliczną, dlatego uznaje się je za żywe. Komórki takie nie rosną w posiewach, nie można ich więc policzyć klasycznymi

metodami płytkowymi. W tym celu należy zastosować cytometrię przepływową lub RT-qPCR. Uważa się, że uśpione probiotyki mogą spełniać swoją funkcję w żywieniu, lecz nie potwierdzono tego jeszcze badaniami naukowymi [14-15].

ADHEZJA DO NABŁONKA JELITA

Adhezja, czyli zdolność mikroorganizmów do przylegania do nabłonka jelitowego, wydłuża czas działania probiotyków w przewodzie pokarmowym. Dodatkowo umożliwia mikroorganizmom i komórkom nabłonka bezpośredni kontakt, a zarazem pozwala lepiej przeciwdziałać adhezji patogenów. Stosowane są różne metody i modele do oceny tej cechy. Metodami *in vitro* analizuje się stopień adhezji do śluzu pokrywającego nabłonek jelitowy lub komórek nabłonkowych w hodowli laboratoryjnej (np. Caco-2, HT-29 i HT-29MTX). Można też wykorzystać zwierzęta laboratoryjne, aby określić utrzymywanie się badanego szczepu w układzie pokarmowym po zakończeniu jego podawania [10]. Szczepy wykazujące wysoką adhezję, takie jak *Bifidobacterium lactis* Bb12 i *Lactobacillus rhamnosus* GG, są skuteczne w zapobieganiu i łagodzeniu ostrych biegunek u dzieci [25]. Istnieją także badania

potwierdzające związek pomiędzy zdolnością do adhezji *in vitro* a kolonizacją jelit *in vivo* lub modulacją aktywności układu immunologicznego. Uważa się także, że probiotyki o dużej zdolności do adhezji mogą wywierać oczekiwane efekty po zastosowaniu niższych dawek [10].

INHIBICJA PATOGENÓW

Jedną z podstawowych cech bakterii probiotycznych jest ich ochronne działanie przeciw patogenom żołądkowo-jelitowym. Właściwość taka jest niezwykle istotna dla utrzymania równowagi mikrobiologicznej przewodu pokarmowego i wspomagania leczenia infekcji. Aktywność probiotyków może się przejawiać hamowaniem wzrostu, blokowaniem adhezji komórek patogenów lub nawet ich wypieraniem z powierzchni nabłonka. Hamowanie wzrostu komórek patogennych wynika ze zdolności probiotyków do wydzielania kwasów organicznych (głównie mlekowego), nadtlenu wodoru i bakteriocyn (małych białek o specyficznej bakteriobójczej aktywności) [24].

Inhibicję wzrostu patogenów bada się *in vitro* w posiewach, gdzie na podłożu zestalone agarem zawierające patogen (np. *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) nanosi się kultury probiotyczne lub płyn pochodzący. Po odpowiednim czasie inkubacji, podobnie jak w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej, obserwuje się strefy przejaśnienia świadczące o hamowaniu wzrostu komórek patogennych [27]. W warunkach *in vitro*, z zastosowaniem kultur komórek nabłonkowych (np. Caco-2 lub HT-29), można analizować zdolność potencjalnych probiotyków do zapobiegania adhezji, kompetycji lub wypierania komórek patogenów przylegających do powierzchni nabłonka. W takich badaniach wykazano także, że niektóre probiotyczne szczepy mają zdolność blokowania inwazji *Salmonella typhimurium* do wnętrza komórek nabłonkowych, a nawet potrafią hamować ich rozwój wewnątrz komórek [4, 16]. Należy jednak pamiętać, że wyników takich nie można bezpośrednio przełożyć na działanie *in vivo*, dlatego kolejnym etapem są badania na modelach zwierzęcych. Przykładem tego typu testów jest analiza szybkości odzyskiwania równowagi mikroflory jelitowej myszy z biegunką wywołaną antybiotykami po

podaniu płynu po hodowli, pełnej hodowli lub samych mikroorganizmów probiotycznych [1].

SYNTEZA KWASU MLEKOWEGO L(+)

Szczepy probiotyczne bakterii w większości należą do grupy bakterii fermentacji kwasu mlekowego, która została utworzona na bazie wspólnej właściwości – syntezy kwasu mlekowego jako produktu końcowego fermentacji [6]. Kwas mlekowy jako związek chemiczny ma dwa izomery optyczne L(+) i D(-), przy czym dla organizmu ludzkiego fizjologiczną formą jest kwas L(+)-mlekowy. Mikroorganizmy mają zdolność wytwarzania jednego izomeru lub obu. Pomimo naukowych dowodów świadczących, że obydwa izomery są metabolizowane na porównywalnym poziomie przez organizm człowieka, WHO/FAO dopuszcza stosowanie w odżywkach dla niemowląt jedynie kultur produkujących L(+)-izomer [13, 30]. Oznaczenie, który z izomerów lub ich proporcje produkowane są przez dany szczep można wykonać metodą opartą na analizie spektrofotometrycznej w zakresie światła ultrafioletowego.

PODSUMOWANIE:

Etap selekcji mikroorganizmów o potencjalnym probiotycznym działaniu jest jedynie wstępem do uzyskania szczepu, który można nazywać probiotykiem. Metody stosowane na tym etapie pozwalają wyłonić „kandydatów” mających podstawowe cechy probiotyczne. Umożliwiają one tym mikroorganizmom m.in. przeżycie procesów technologicznych, przechowywania, a po spożyciu dotarcie do miejsca docelowego ich działania (jelit). Kolejnym etapem weryfikacji właściwości probiotycznych jest udowodnienie prozdrowotnego działania danego szczepu, np. modulacji odpowiedzi immunologicznej czy detoksyfikacji lub antymutagennej aktywności metabolicznej. Potwierdzenie probiotycznych właściwości szczepu jest procesem kosztownym, ale także wymaganym w przypadku wykorzystania ich do celów marketingowych. Naukowe dowody prozdrowotnego działania powodują, że konsumenci akceptują wyższą cenę produktu probiotycznego. Dlatego konieczność uzyskania takich dowodów jest uzasadniona. ■

Dr M. Schmidt, dr A. Olejnik-Schmidt - Laboratorium Bezpieczeństwa i Właściwości Prozdrowotnych Żywności, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Szczepy probiotyczne bakterii w większości należą do grupy bakterii fermentacji kwasu mlekowego.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007–2010 jako projekt badawczy nr N312 047 32/2668.