

RAST A PREŽÍVANIE PROBIOTICKÝCH LAKTOBACILOV V LISOVANOM POHÁNKOVOM PRODUKTE

DENISA LIPTÁKOVÁ, MONIKA PETRULÁKOVÁ,
JANA PELIKÁNOVÁ, ĽUBOMÍR VALÍK
a KRISTÍNA KRISŤÚFKOVÁ

Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
denisa.laukova@stuba.sk

Došlo 25.3.15, prijaté 23.6.15.

Kľúčové slová: probiotiká, celiakia, pseudocereálie, fermentácia

Úvod

0,5 až 1 % európskej populácie je v súčasnosti postihnuté celiakiou^{1–3}, ktorá ničí tenké črevo a následne znemožňuje celkovú absorpciu stravy⁴. Osoby trpiace touto chronickou poruchou sú odkázané na doživotné dodržiavanie tzv. bezlepkovej diéty, musia teda zo svojej stravy vylúčiť bielkoviny a peptidy pochádzajúce z prolaminov obilnín podčeľade *Triticeae*⁵.

Celiakia je považovaná za zložité ochorenie súvisiace s imunitným systémom, ktoré zahŕňa aj nadobudnutú aj vrodenú imunitu⁶. Ako autoimunitné ochorenie sa často vyskytuje pri diabetes mellitus 1. typu⁷, autoimunitnej tyreoidite, Addisonovej chorobe, autoimunitných chorobách pečene, psoriáze a myastenii gravis⁸. Gény kódujúce HLA DQ2 a HLA DQ8 molekuly predstavujú najdôležitejší geneticky predispozičný faktor⁹. Kľúčovými preventívnymi opatreniami proti vzniku celiakie v detskom veku sú dojčenie a časový faktor zavádzania lepku do stravy. Štúdie poukazujú na zvýšenie rizika vzniku celiakie, ak je lepok zaradený do stravy príliš skoro (< 4 mesiace), alebo príliš neskoro (> 7 mesiacov)¹⁰.

Konzumáciou potravín s probiotickým a prebiotickým účinkom je možné eliminovať alebo zmierniť viaceré ťažkosti, znížiť záťaž imunitného systému a v konečnom dôsledku prispieť k pocitu dobrého zdravia a pohody. V súčasnosti sa v potravinárskom priemysle vyrába široké spektrum probiotických výrobkov, najmä v mliekarenstve, pričom sa využíva množstvo originálnych probiotických kmeňov. Jednými z nich sú aj zástupcovia *Lactobacillus acidophilus* 145 (LA 145) a *Lb. rhamnosus* GG (LGG). Nakoľko je však sortiment produktov na okamžitú konzumáciu vhodných aj pre celiatikov obmedzený, zamerali sme sa v našej práci na prípravu fermentovaného pseudocereálneho substrátu (pohánkového) s využitím už vyššie spomenutých kmeňov.

Experimentálna časť

Pseudocereálny produkt predstavovali varené, naočkované a následne lisované lúpané pohánkové zrná (Kroner, s. r. o., Bratislava). Príprava spočívala v navážení príslušného množstva pohánkových zŕn a zvyšných ingrediencií (sacharóza/ochucujúca zložka, voda/polotučné trvanlivé mlieko, Rajo a.s. Bratislava), ich následnom varení pri 100 °C 15 min a 30 min odstáti v teple. Pri príprave „mliečnej pohánky“ sme hmotu namiesto odstáti v teple ešte 10 min zahrievali pri 100 °C. Po ochladení pohánkovej hmoty na izbovú teplotu sa začala fermentácia jej naočkováním 5 % štartovacej kultúry. Ihneď po naočkovaní sa pohánková hmota umiestnila do lisu, kde sa pomocou 500 g a 1000 g závažia lisovala po dobu 2 × 5 min. Naočkovaná lisovaná pohánka bola následne fermentovaná za anaeróbných podmienok pri 37 ± 1 °C 24 h a po fermentácii uchovávaná pri 12 ± 1 °C aeróbne po dobu 10 dní. Počas fermentácie ako aj skladovania pri teplote 12 °C sme v pravidelných intervaloch merali zmeny aktívnej kyslosti pH metrom so sklenou elektródou (inoLab pH 720, WTW, Weilheim, Nemecko).

Stanovenie počtu laktobacilov a vyhodnotenie rastových parametrov

Počty laktobacilov počas fermentácie a doby skladovania pri 12 °C sme stanovili v súlade s normou STN ISO 15214 (cit.¹¹). Na matematické vyhodnotenie rastových čiar a získanie rastových parametrov (špecifická rastová rýchlosť, μ a lag-fáza, λ) laktobacilov bol použitý primárny D-model¹². Na štatistické zhodnotenie rastových parametrov oboch laktobacilov v rôznych substrátoch sme použili Studentov t-test, nástroj balíka Excel, Office Professional 2007.

Senzorické hodnotenie

Organoleptické vlastnosti výrobkov hodnotilo 10 nezávislých hodnotiteľov podľa STN ISO 8586, ukazovateľ celkovej chutnosti bol hodnotený pomocou 5-stupňovej bodovej metódy¹³.

Určenie cytotoxického účinku laktobacilov na bunkové línie HeLa a Caco-2

Bunky HeLa tvoria nesmrteľnú transformovanú bunkovú líniu, ktorá bola pôvodne izolovaná z ľudského krčka maternice ako epitelová bunková línia vytvárajúca monovrstvu¹⁴. Bunkovú líniu poskytla RNDr. D. Slameňová, DrSc. z Ústavu experimentálnej onkológie SAV v Bratislave. Bunky Caco-2 sú ľudské epitelové bunky, pochádzajúce z adenokarcinómu hrubého čreva^{15,16}. Bunkovú líniu poskytla Mgr. E. Horváthová, PhD. z Ústavu experimentálnej onkológie SAV v Bratislave. Cytotoxický účinok kyslomliečnych kultúr sa charakterizoval percentom inhibície po 24 h, 48 h a 72 h spoločnej anaeróbnej inkubácii v termostate pri 37 ± 1 °C a 5 % CO₂.

Výsledky a diskusia

Rast a rozmnožovanie probiotických kmeňov *Lb. acidophilus* 145 a *Lb. rhamnosus* GG v lisovanom pohánkovom produkte pripravenom s vodou a sacharózou boli charakterizované priemernými špecifickými rastovými rýchlosťami $\mu = 0,63 \text{ h}^{-1}$ a $0,87 \text{ h}^{-1}$, v poradí a počas uchovávaní pri $12 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ si udržali svoju životaschopnosť počas celých 10 dní. Kocková a Valík zistili v lisovanej pohánke uvarenej „na slano“ špecifickú rastovú rýchlosť LGG počas fermentácie $0,74 \text{ h}^{-1}$, pričom počty počas skladovacej fázy pri $6 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 týždne zostávali stabilné¹⁷. Hodnoty aktívnej kyslosti klesali počas fermentácie „sladkej“ pohánky a následného uchovávaní rýchlosťou $-0,15 \text{ h}^{-1}$ pre LA 145 a $-0,13 \text{ h}^{-1}$ pre LGG, pričom obdobné zmeny v pH hodnotách zaznamenali vo svojej práci aj Sterr a spol.¹⁸ počas fermentácie vodnej amarantovej múky kyslomliečnymi baktériami. Mlieko ako substrát v lisovanom pohánkovom produkte štatisticky významne ($\alpha = 0,05$) ovplyvnilo hodnoty špecifických rastových rýchlostí počas fermentácie v porovnaní s vodnou bázou. Pri LA 145 bol pozorovaný približne $1,4\times$ a pri LGG približne $2,6\times$ rýchlejší rast v porovnaní s použitím vody. Podobné výsledky zaznamenali i iní autori s pohánkovou mliečnou kašou fermentovanou kmeňom LGG (cit.¹⁹). Prídavok mlieka (zdroj proteínov a vitamínov) do cereálnych substrátov zvyšuje metabolickú aktivitu laktobacilov²⁰.

Rastové parametre oboch probiotických kmeňov v neočutených a očutených lisovaných pohánkových produktoch (vanilka/čokoláda) sú zhodnotené v tab. I a II.

U sledovaných kmeňov nebolo trvanie lag-fázy (λ) ovplyvnené druhom ochucujúcej zložky (vanilka/čokoláda), avšak v prípade LGG bola táto o takmer 50 % kratšia v porovnaní s LA 145 (tab. I a II). Prídavok ochucujúcej zložky k receptúre s vodou a mliekom štatisticky významne ovplyvnil špecifickú rastovú rýchlosť kmeňa LGG, kým v experimentoch s LA 145 bol tento efekt minimálny ($\alpha = 0,05$).

Z pohľadu hodnotenia senzorickej kvality boli v našej štúdii za najlepšie vyhodnotené ochutené probiotické výrobky lisovanej pohánky s vanilkovou príchuťou, vodou a použitím štartéra LGG po 24 h a po 5 dňoch skladovania.

Ich celková chuť bola ohodnotená jedným z najvyššie dosiahnutých bodov (3,57), čo predstavuje príjemnú až veľmi príjemnú celkovú chuť. Z čokoládových produktov dosiahli najvyššie hodnotenie celkovej chuti 24 h produkt a lisovaná fermentovaná pohánka po 5 dňoch skladovania oba fermentované s použitím LGG (uspokojivá až príjemná celková chuť). Kocková a Valík¹⁷ uskutočnili senzoricke hodnotenie celkovej chuti slaného pohánkového produktu, no výsledné bodové ohodnotenie bolo nižšie (3,31 po 10 h fermentácii).

Poslednou časťou práce bolo zistiť antiproliferačný účinok laktobacilov voči nádorovým bunkovým kultúram HeLa a Caco-2. V prípade kmeňa LGG bol inhibičný vplyv na bunkách HeLa stanovený už v 48 h (% inhibície_{48h a 72h} = 40 %), pričom LA 145 sa cytotoxicky prejavil najmä po 72 h (% inhibície_{72h} = 96 %). V prípade nádorovej línie Caco-2 *Lb. acidophilus* 145 spôsobil po 72 h 95 % inhibíciu, pričom v prípade kmeňa LGG bola miera inhibície po 72 h expozícii vyčíslená na 68 %. Testované laktobacily vyvolali po 24, 48 a 72 h pôsobení degeneráciu časti bunkovej populácie charakterizovanú zagultatými bunkami uvoľnenými z kultivačného povrchu, kým kontrolné línie rástli prichytené na kultivačnom povrchu a ich množstvo sa úmerne zvyšovalo s časom kultivácie. Iní autori poukázali na inhibíciu rastu nádorových buniek prsníka MCF7 indukovanú fermentovaným mliekom, obsahujúcim *Bifidobacterium infantis*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *Lb. acidophilus* a *Lb. paracasei*, pričom antiproliferačný účinok bol pripísaný látkam, ktoré vznikli v procese fermentácie mlieka týmito kultúrami²¹. Singh a spol. zistili, že pôsobenie $125 \mu\text{M}$ peroxidu vodíka na HeLa bunky malo za následok 6,89 % apoptózy indukovanej po 15 min, 11,05 % apoptózy po 1 h a 28,96 % po 3 h (cit.²²). Iní autori vo svojej práci uviedli, že rozličné kmeny a druhy propiónových baktérií indukujú apoptózu nádorových buniek (Caco-2 a HT 29) metabolickou produkciou krátkoreťazcových mastných kyselín, propionátu a acetátu²³.

Tabuľka I

Priemerné rastové parametre *Lb. acidophilus* 145 v neočutenom a očutenom lisovanom pohánkovom produkte

Substrát	<i>Lb. acidophilus</i> 145		
	μ [h^{-1}]	Rýchlosť poklesu pH [h^{-1}]	λ [h]
Lisovaná pohánka, voda, sacharóza	0,63	-0,15	0
Lisovaná pohánka, mlieko, sacharóza	0,88	-0,085	4
Lisovaná pohánka, voda, vanilka	0,56	-0,089	4,1
Lisovaná pohánka, mlieko, vanilka	0,96	-0,075	4,8
Lisovaná pohánka, voda, čokoláda	0,91	-0,090	5,5
Lisovaná pohánka, mlieko, čokoláda	0,84	-0,085	4,2

Tabuľka II

Priemerné rastové parametre *Lb. rhamnosus* GG v neochutenom a ochutenom lisovanom pohánkovom produkte

Substrát	<i>Lb. rhamnosus</i> GG		
	μ [h ⁻¹]	Rýchlosť poklesu pH [h ⁻¹]	λ [h]
Lisovaná pohánka, voda, sacharóza	0,87	-0,13	0
Lisovaná pohánka, mlieko, sacharóza	2,27	-0,017	0
Lisovaná pohánka, voda, vanilka	1,90	-0,062	2,2
Lisovaná pohánka, mlieko, vanilka	2,12	-0,280	2,2
Lisovaná pohánka, voda, čokoláda	1,82	-0,277	2,5
Lisovaná pohánka, mlieko, čokoláda	1,68	-0,455	1,9

Záver

Pohánka, pôvodom z Ázie, sa využíva pre rôzne účely, najmä v potravinárstve, poľnohospodárstve ako krmivo a vo farmaceutickom priemysle, kde tvorí významný prírodný zdroj rutínu. V mnohých krajinách sa pohánkové zrná konzumujú varené s vodou, alebo mliekom, pripravuje sa z nich kaša, alebo sa z pohánkovej múky pripravujú lievanice. Laboratórne pripravené fermentované pohánkové produkty preukázali schopnosť byť vhodným rastovým prostredím probiotických baktérií. Vo všetkých testovaných typoch pohánkových substrátov dosahovali konečné koncentrácie laktobacilov hodnoty od 10⁸ do 10⁹ KTJ g⁻¹, t. j. si zachovali svoju životaschopnosť v terapeutických dávkach počas celej doby skladovania pri 12 °C.

LITERATÚRA

- Biagi F., Klersy C., Balduzzi D., Corazza G. R.: *Ann. Med.* 42, 557 (2010).
- Dipper C. R., Maitra S., Thomas R., Lamb C. A., Mclean-Tooke A. P. C., Ward R., Smith D., Spickett G., Mansfield J. C.: *Aliment. Pharmacol. Ther.* 30, 236 (2009).
- Rubio-Tapia A., Murray J. A.: *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 116 (2010).
- Di Sabatino A., Corazza G. R.: *Lancet* 373, 1480 (2009).
- Hulín P., Dostálek P., Hochel I.: *Chem. Listy* 102, 327 (2008).
- Meresse B., Malamut G., Cerf-Bensussan N.: *Immunity* 36, 907 (2012).
- Gobbetti M., Rizzello C. G., Di Cagno R., De Angelis M.: *Food Microbiol.* 24, 187 (2007).
- Hansen D., Brock-Jacobsen B., Lund E., Bjorn CH., Hansen L. P., Nielsien C., Fenger C., Lillevang S. T., Husby S.: *Diabetes Care* 29, 2452 (2006).
- Rashtak S., Marietta E. V., Murray J. A.: *Expert Rev. Clin. Immunol.* 5, 535 (2009).
- Čierna I., Kovács L.: *Pediatr. Prax* 11, 50 (2010).
- STN ISO 15214 *Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na stanovenie počtu mezofilných kyslomliečnych baktérií. Metóda počítania kolónii kultivovaných pri 30 °C* (január 2002).
- Baranyi J., Roberts T. A., Mc Clure P.: *Food Microbiol.* 10, 43 (1993).
- STN ISO 8586 *Senzorická analýza. Všeobecný návod na výber, výcvik a monitorovanie vybraných posudzovateľov a expertných posudzovateľov* (september 2014).
- Rahbari R., Sheahan T., Modes V., Collier P., Macfarlane C., Badge R. M.: *Biotechniques* 46, 277 (2009).
- Pal S., Allister E., Thomson A., Mamo J. C. L.: *Atherosclerosis* 161, 55 (2002).
- Sambuy Y., Angelis I., Ranaldi G., Scarino M. L., Stamatii A., Zucco F.: *Cell Biol. Toxicol.* 21, 1 (2005).
- Kocková M., Valík L.: *Czech J. Food Sci.* 32, 391 (2014).
- Sterr Y., Weiss A., Schmidt H.: *Int. J. Food Microbiol.* 136, 75 (2009).
- Pelikánová J., Liptáková D., Valík L., Stančeková K.: *Potravinárstvo* 5, 53 (2011).
- Helland M. H., Wicklund T., Narvhus J. A.: *Int. Dairy J.* 14, 957 (2004).
- Biffi A., Coradini D., Larsen R., Riva L., Fronzo G. D.: *Nutr. Cancer* 28, 93 (1997).
- Singh M., Sharma H., Singh N.: *Mitochondrion* 7, 367 (2007).
- Jan G., Belzacq A. S., Haouzi D., Rouault A., Métiévier D., Kroemer G., Brenner C.: *Cell Death Diff.* 9, 179 (2002).

D. Liptáková, M. Petrušáková, J. Pelikánová, E. Valík, and K. Křišťáková (*Department of Nutrition and Food Assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Growth and Survival of Probiotic Lactobacilli in Pressed Buckwheat Product**

The growth dynamics of *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Lb. rhamnosus* GG in substrate prepared from buckwheat, water or milk, sucrose or flavoring compound (vanilla and chocolate) was investigated. In general, during

the fermentation (numbers at the end have reached values from $1.8 \cdot 10^8$ to $3.4 \cdot 10^9$ cfu g⁻¹) or storage (N_{final} from $1.8 \cdot 10^8$ to $3.3 \cdot 10^9$ cfu g⁻¹), the growth of individual strain was satisfactory. According to the evaluation of overall taste, the substrate with vanilla flavor and water, fermented by *Lb. rhamnosus* GG for 24 h and stored for 5 days, obtained the highest number of points. Lactobacilli had slightly cytotoxic effect on the HeLa cells and Caco-2 cells, and the percentage of inhibition after 48 and 72 h of exposure ranged from 40 to 96 % for both selected strains.