

VLIV ENKAPSULACE NA ŽIVOTASCHOPNOST BUNĚK *LACTOBACILLUS CASEI* L-26 V RŮZNÝCH SYSTÉMECH

Šárka Horáčková, Inês Clemente*, Pavla Sedláčková,
Milada Pločková

Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT v Praze

* Department of Bioengineering, Technical University, Lisbon

The influence of encapsulation on viability of *Lactobacillus casei* L-26 in different system

Abstrakt

V práci byl sledován vliv enkapsulace buněk *Lactobacillus casei* Lafti L-26 na jejich životaschopnost během skladování v různých mlékárenských výrobcích a v podmínkách simulujících trávicí trakt v porovnání s volnými buňkami. Enkapsulace neměla vliv na stabilitu buněk při dlouhodobém skladování v prostředí mléka, jogurtu a čerstvého sýra v solném nálevu, ale významně zvýšila životaschopnost buněk při nízkém pH (pH 2).

Klíčová slova: *Lactobacillus casei*, enkapsulace, skladování, gastrointestinální trakt

Abstract

The influence of encapsulation of *Lactobacillus casei* Lafti L-26 cells on their viability during the storage in different dairy products and in the conditions simulating those in gastrointestinal tract compared with free cells were studied in this work. The encapsulation did not have effect on the stability of cells during long-term storage in milk, yogurt and fresh cheese in brine solution but significantly increased the viability of cells at low pH (pH 2).

Keywords: *Lactobacillus casei*, encapsulation, storage, gastrointestinal tract

Úvod

Použití probiotických mikroorganismů v potravinářských technologiích a výzkum jejich působení na lidský organismus je předmětem zájmu základního i aplikovaného výzkumu již po řadu let. Jedním z důležitých parametrů hodnocení probiotických potravin je zajištění dostatečného počtu probiotických mikroorganismů nejen během celého výrobního procesu, ale také během doby skladování. Jednou z možností, jak zvýšit životaschopnost bakteriálních buněk v různých prostředích, je jejich enkapsulace.

Enkapsulace buněk je fyzikálně-chemický nebo mechanický proces, který vede k vytvoření částic o průměru mezi 1 - 2000 μm . V potravinářském průmyslu má enkapsulace

několik použití, jako je kontrola oxidačních reakcí, maskování chutí, barvy či zápachu, ale hlavním důvodem enkapsulace probiotik je zvýšení jejich stability v potravíně. Enkapsulace rovněž umožňuje kontrolované uvolnění buněk v živé a metabolicky aktivní formě v gastrointestinálním traktu (Nazzaro a kol., 2011).

Proces enkapsulace může probíhat i přirozeně během bakteriálního růstu. Vytváření exopolysacharidů, které obalují buňku, následně snižuje permeabilitu přes tento materiál, a chrání tak buňku vůči nepříznivým podmínkám okolního prostředí (Heidebach a kol., 2010). Při použití enkapsulace je nutné sledovat stabilitu enkapsulovaných buněk, vlastnosti materiálu použitého pro enkapsulaci a také, zda je celý tento systém vhodný pro finální aplikaci. Materiály, které se k enkapsulaci používají, jsou nejčastěji polysacharidy jako alginát, karagenan, škrob a jeho deriváty, arabská guma, xanthan a některé bílkoviny jako želatina či bílkoviny mléka (Burgain a kol., 2011). Většina mléčných bílkovin má amfifilní strukturu odpovědnou za výborné povrchové vlastnosti - mají schopnost stabilizovat emulze díky své struktuře a míře agregace, která je závislá na pH, iontové síle a teplotě roztoku (Livney, 2012). Mléčné bílkoviny mají výborné schopnosti vytvářet gely, což již bylo využito k přípravě enkapsulovaných probiotik (Heidebach a kol., 2010; Reid a kol., 2007).

Cílem této práce bylo ověřit, zda enkapsulace probiotického mikroorganismu *Lactobacillus casei* Lafti L-26 do mléčné bílkovinné matrice může zvýšit stabilitu tohoto mikroorganismu při skladování v mléčných výrobcích a při průchodu gastrointestinálním traktem.

Materiál a metody

Použité mikroorganismy

Lactobacillus casei Lafti L-26 - DSM Food Specialties, Nizozemsko; komerční probiotický kmen

Enkapsulace buněk

K enkapsulaci probiotických buněk laktobacilů do mléčné bílkovinné matrice byla použita emulzní metoda dle Heidebacha a kol. (2009), která byla modifikována přidáním 0,5 % hm. lecitinu jako emulgátoru do oleje (Lisová a kol., 2013).

Stanovení počtu buněk

Počet neenkapsulovaných buněk byl stanoven plotnovou metodou po příslušném ředění fyziologickým roztokem na MRS agaru, pH 5,6. Kultivace probíhala po dobu 48 h při 37 °C v CO₂ kultivátoru (5 % obj.).

Počet enkapsulovaných buněk byl stanoven rovněž plotnovou metodou za stejných podmínek, ale první ředění vzorku bylo provedeno v citrátovém pufru (20 g citrátu sodného v 1 l vody, pH 7,5), což umožnilo kompletní uvolnění buněk z jednotlivých mikrokapslí.

V případě přítomnosti dalších mikroorganismů při skladovacím pokusu v jogurtu a v čerstvém sýru byl počet *L. casei* Lafti L-26 stanoven na selektivním MRS agaru

s vankomycinem (10 µg/ml), u kterého bylo pH upraveno na 6,2.

Skladovací pokus

K porovnání stability neenkapsulovaných a enkapsulovaných buněk během dlouhodobého skladování bylo použito obnovené sušené mléko (PML Protein Mléko Laktóza, a.s., Česká republika), laboratorně vyrobený jogurt (kultura YC-381, Chr. Hansen, Dánsko, 2 % obj. inokula, kultivace 4 h při 42 °C) a laboratorně vyrobený čerstvý sýr, který byl následně skladován v solném nálevu. Sýr byl vyroben z pasterovaného mléka (72 °C, 20 s) o tučnosti 3,5 % hm. za použití 4 % obj. inokula základní kultury (Smetanová kultura FD, Laktoflora® MILCOM a.s., Česká republika) a syřidla Naturen® Premium 145 (Chr. Hansen). Po výrobě byl sýr skladován v solném nálevu (16 % hm. NaCl).

Do všech výrobků byly přidány čerstvě nakultivované buňky *L. casei* Lafti L-26 nebo mikrokapsle s těmito mikroorganismy tak, aby jejich počáteční koncentrace byla cca 10⁸ - 10⁹ KTJ/ml nebo KTJ/g. Výrobky byly skladovány při 6 - 8 °C po dobu 4 - 6 týdnů a každý týden byly odbírány vzorky k analýze. U všech vzorků bylo dále sledováno pH - aktivní kyselost měřena na pH metru (3020 pH Meter, Jenway, Velká Británie) se skleněnou elektrodou při pokojové teplotě. U sýrů byla hodnocena i aktivita vody na přístroji Aqua Lab CX3 (Decagon Inc., USA).

Simulace podmínek trávicího traktu

Simulace podmínek trávicího traktu byla adaptována dle metod Botes a kol. (2008) a Guglielmotti a kol. (2007). Buňky nebo enkapsulované buňky byly promyty a přeneseny do roztoku HCl (pH 2) s přídavkem 0,5 % hm. NaCl a 0,3 hm. % pepsinu 170 U/g (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Po dvou hodinách inkubace při 37 °C v CO₂ atmosféře (5 % obj.) bylo pH upraveno na 6,8 ± 0,2 (pomocí 10 % hm. NaOH) a přidány 0,3 % hm. žlučových solí (Merck, Německo) a 0,1 % hm. pankreatinu 165 U/mg (Sigma-Aldrich). V čase 4 a 6 h od začátku pokusu byly opět odebrány vzorky pro stanovení počtu buněk. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr z 3 stanovení.

Výsledky a diskuse

Při skladování v mléce v průběhu 6 týdnů byly buňky *L. casei* Lafti L-26 velmi stabilní, jak je patrné z tabulky č. 1. Během doby skladování docházelo k mírnému poklesu pH jak u buněk volných tak i enkapsulovaných, což svědčí o zachování metabolické aktivity i u enkapsulovaných buněk. V počtu životaschopných buněk nebyl zjištěn mezi vzorky významný rozdíl. Údaje shrnuté v tabulce 2 ukazují, že podobné výsledky jako v mléce při hodnocení počtu buněk byly zjištěny i při skladování v jogurtu. Během 6týdenního skladování došlo k mírným postacidifikačním změnám, pH jogurtů se snížilo ze 4,45 na 4,10 u volných buněk, případně ze 4,52 na 4,13 u buněk enkapsulovaných. Nízká aktivní kyselost je jedním z fak-

Tab. 1 Stabilita volných a enkapsulovaných buněk *L. casei* Lafti L-26 při skladování v mléce při 6 - 8 °C

Doba skladování (týdny)	Volné buňky		Enkapsulované buňky	
	Počet (log KTJ/ml)	pH	Počet (log KTJ/ml)	pH
0	8,40 ± 0,07	6,41	8,62 ± 0,03	6,41
1	8,44 ± 0,04	6,41	8,78 ± 0,03	6,41
2	8,63 ± 0,01	6,43	8,71 ± 0,02	6,44
3	8,60 ± 0	6,35	8,71 ± 0,01	6,36
4	8,68 ± 0,04	6,34	8,78 ± 0,01	6,33
5	8,60 ± 0,06	6,35	8,63 ± 0,07	6,34
6	8,91 ± 0,07	6,33	9,04 ± 0,07	6,28

Tab. 2 Stabilita volných a enkapsulovaných buněk *L. casei* Lafti L-26 při skladování v jogurtu při 6 - 8 °C

Doba skladování (týdny)	Volné buňky		Enkapsulované buňky	
	Počet (log KTJ/ml)	pH	Počet (log KTJ/ml)	pH
0	8,66 ± 0,05	4,45	8,81 ± 0,03	4,52
1	8,65 ± 0,05	4,45	8,65 ± 0,09	4,52
2	8,69 ± 0,03	4,17	8,65 ± 0,03	4,15
3	8,65 ± 0,03	4,09	8,65 ± 0,02	4,08
4	8,75 ± 0,04	4,06	8,71 ± 0,17	4,05
5	8,50 ± 0,02	4,13	8,60 ± 0	4,09
6	8,79 ± 0	4,10	8,65 ± 0	4,13

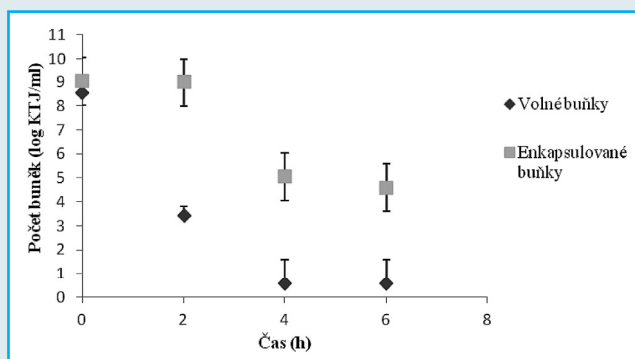
torů, který může negativně ovlivňovat přežívání buněk. Ve studii Kailasaphathy a kol. (2006), která porovnávala přežívání volných a enkapsulovaných buněk *Lactobacillus acidophilus* DD901 a *Bifidobacterium lactis* DD920 byly rovněž zjištěny podobné postacidifikační změny, ale také významný vliv enkapsulace na životaschopnost buněk. U volných buněk *L. acidophilus* skladovaných v jogurtu došlo ke snížení ze 7,5 log KTJ/ml na 3,3 log KTJ/ml a u enkapsulovaných buněk ze 7,4 log KTJ/ml pouze na 5,2 log KTJ/ml. Enkapsulace v našem případě neovlivnila negativně ani pozitivně počet životaschopných buněk *L. casei* Lafti L-26 v jogurtu, což může být způsobeno i obecně větší stabilitou kmenů *L. casei* v porovnání s ostatními druhy laktobacilů. Rozdílné výsledky získané ve studii Kailasaphathy a kol. (2006) mohou být vysvětleny i použitím rozdílné matrice pro enkapsulaci (alginát vápenatý obsahující škrob), což může ovlivnit stabilitu probiotických buněk z důvodu rozdílné struktury gelu oproti mléčné matrici.

Sýr obsahuje v porovnání s jogurtem vyšší obsah sušiny, tuku a má i vyšší pH, což má za následek větší ochranu pro

Tab. 3 Stabilita volných a enkapsulovaných buněk *L. casei* Lafti L-26 při skladování v čerstvém sýru ve slaném nálevu při 6 - 8 °C

Doba skladování (týdny)	Volné buňky			Enkapsulované buňky		
	Počet (log KTJ/ml)	pH	aktivita vody	Počet (log KTJ/ml)	pH	aktivita vody
0	9,10 ± 0,02	5,16	0,96	9,00 ± 0,01	5,04	0,97
1	9,00 ± 0,01	5,35	0,93	8,90 ± 0,02	5,10	0,93
2	8,9 ± 0,02	5,31	0,93	8,80 ± 0,01	5,21	0,93
3	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
4	8,7 ± 0,02	5,17	0,93	8,60 ± 0,03	5,17	0,93

n/a ... nestanoveno



Obr. 1 Stabilita volných a enkapsulovaných buněk *L. casei* Lafti L-26 v podmínkách simulujících trávicí trakt

probiotické mikroorganismy během skladování a při průchodu gastrointestinálním traktem (Mirzaei a kol., 2012). V této práci byl pro skladování zvolen čerstvý sýr v solném nálevu, u kterého by se díky nižší aktivitě vody mohla předpokládat nižší stabilita bakteriálních buněk. Z výsledků uvedených v tabulce 3 je ale patrné, že i v tomto prostředí byly enkapsulované i neenkapsulované buňky velmi stabilní po dobu sledování. Ke stejnému závěru dospěl i Mirzaei a kol. (2012) při 28denním skladování volných a enkapsulovaných buněk (alginát) *Lactobacillus acidophilus* La5. Tímto autorem ale byl prokázán pozitivní vliv enkapsulace při dlouhodobém skladování (182 dní), kdy byl zaznamenán pokles volných buněk o 5 řádů (log KTJ/g) v porovnání s poklesem pouze o 1 řád u buněk enkapsulovaných. V naší studii nemohlo být pokračováno v dalším skladování sýrů, protože docházelo k jejich pozvolnému rozpouštění v nálevu (zřejmě vlivem skladovacích podmínek) a nežádoucí kontaminaci. Během skladování došlo k poklesu obsahu sušiny ze 44,4 % hm. na 31,4 % hm. u sýrů s volnými buňkami, resp. 34,2 % hm. u enkapsulovaných buněk. Aktivita vody, která významně ovlivňuje bakteriální růst, se během skladování snížila z 0,96 na 0,93.

Jedním z důležitých faktorů použití probiotik je rovněž zajištění jejich životaschopnosti během průchodu trávicím traktem. V další části práce bylo testováno, zda má enkapsulace vliv na stabilitu buněk v podmínkách simulující trávicí trakt. Výsledky pokusu jsou uvedeny na obr. 1. Je patrné, že enkapsulace měla výrazný ochranný charakter, který se projevil zvláště v podmínkách nízkého pH. Po dvou hodinách inkubace bylo snížení počtu volných buněk výrazně vyšší, než tomu bylo u buněk enkapsulovaných. K podobným závěrům dospěl i Madureira a kol. (2010), který studoval ochranný efekt syrovátkové matrice na *L. casei* Lafti L-26, *L. acidophilus* Lafti L-10 a *Bifidobacterium animalis*. Rovněž v další studii (Pimentel-González a kol., 2009) byl potvrzen ochranný vliv enkapsulace buněk *L. rhamnosus* LC705 v dvojité emulzi voda - v oleji - ve vodě za použití koncentrované sladké syrovátky jako emulgátoru.

Závěr

Z uvedených výsledků vyplývá, že mlékárenské výrobky jsou dobrým nosičem probiotických mikroorganismů. Při

dlouhodobém skladování buněk *L. casei* Lafti L-26 v mléce, jogurtu i v čerstvém sýru uskladněném ve slaném nálevu nebyly zjištěny významné rozdíly v úhynu buněk volných a enkapsulovaných. Vysoká stabilita neenkapsulovaných buněk může být způsobena i velkou odolností použitého mikroorganismu, a bylo by proto vhodné ověřit vliv enkapsulace i v případě citlivějších mikroorganismů jako jsou např. bifidobakterie. Enkapsulace významně ochraňovala buňky před nepříznivými podmínkami trávicího traktu. Při nízkém pH došlo ke snížení počtu neenkapsulovaných buněk asi o 5 řádů, zatímco enkapsulované buňky byly v tomto prostředí stabilní.

Práce byla podpořena grantem Ministerstva zemědělství ČR č. QI 111B053 z programu Výzkum v agrárním komplexu VAK s počátkem řešení projektů v roce 2011, z podprogramu Udržitelný rozvoj agrárního sektoru.

Použitá literatura

- Botes M., Van Reenen C.A., Dics L.M.T. (2008): Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. *International Journal of Food Microbiology* 128, s. 362-370.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering* 104, s. 467-483.
- Guglielmotti D. M., Marcó M.B., Golowczyc M., Reinheimer J.A., Del L. Quiberoni A. (2007): Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *International Dairy Journal* 17, s. 916-925.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2009): Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids* 23, s. 1670-1677.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2010): Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering* 98, s. 309-316.
- Kailasapathy, K. (2006): Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology* 39, s. 1221-1227.
- Lisová I., Horáčková Š., Kováčová R., Rada V., Plocková M. (2013): Emulsion encapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 with the addition of lecithin. *Czech Journal of Food Science* 31, s. 270-274.
- Livney, Y. D. (2012): Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 15, s. 73-83.
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2010): Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International* 44, s. 465-470.
- Mirzaei, H., Pourjafar, H., Homayouni, A. (2012): Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *Food Chemistry* 132, s. 1966-1970.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R. (2011): Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 23, s. 1-5.
- Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R. (2009): Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food research International* 42, s. 292-297.
- Reid A. A., Champagne C. P., Gardner N., Fustier P., Vuilleumard J. C. (2007): Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *Journal of Food Science* 72, s. M31-M37.

Přijato do tisku: 13. 9. 2013

Lektorováno: 27. 9. 2013