

Monika Jach¹, Renata Łoś², Maciej Maj^{2*}, Anna Malm²

¹Katedra Biologii Molekularnej, Instytut Biotechnologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin

²Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. dr W. Chodźki 1, 20-093 Lublin

Wpłynęło w styczniu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Otrzymywanie, selekcja i właściwości szczepów probiotycznych. 3. Bezpieczeństwo probiotyków. 4. Otrzymywanie produktów probiotycznych. 5. Probiotyki przyszłości – farmabiotyki? 6. Podsumowanie

Probiotics – technological and manufacturing aspects

Abstract: Probiotics are bacteria of natural human microbiota which have positive effect on the host organism physiology. Probiotic strains which are selected from wild strains have to possess certain qualities such as: being competitive against pathogens, synthesizing appropriate metabolic products and ability to adhere. Probiotic strains also have to show properties which allow them to be safe to use as well as render them resistant to conditions occurring during production processes and in human gastrointestinal tract. Inversely – the production processes used in the preparation of probiotics, have to be adjusted to maintain acceptable survival rates of bacteria.

Pharmabiotics are a particular kind of probiotics, modified using genetic engineering to achieve desirable traits, either functional or technological.

1. Introduction. 2. Preparation, selection and properties of probiotic strains. 3. Safety of probiotics. 4. Production of probiotic products. 5. Pharmabiotics – probiotics of the future? 6. Summary

Słowa kluczowe: probiotyki, produkcja probiotyków, farmabiotyki

Key words: probiotics, probiotics production, pharmabiotics

1. Wstęp

Terminem probiotyki określa się bakterie naturalnego mikrobiomu wywołujące wielokierunkowe, korzystne efekty dla funkcjonowania organizmu człowieka, zarówno miejscowe jak i ogólnoustrojowe. Pojęciem tym określa się również preparaty lub produkty zawierające ściśle zdefiniowane żywe drobnoustroje o właściwościach probiotycznych w odpowiedniej ilości, wpływające na mikrobiom określonego miejsca w organizmie człowieka i dzięki temu wywierające efekty zdrowotne [41, 62]. Istnieją również pewne przesłanki mogące świadczyć o rozszerzeniu definicji probiotyków w przyszłości – badania na zwierzętach wykazują działanie efektów zdrowotnych po podaniu zabitych bakterii czy też jedynie ich materiału genetycznego. Efekt wywoływany może być tu przez działanie immunostymulującego DNA (ISS-DNA) [32, 38]. Obecnie probiotyki dostępne są w postaci produktów leczniczych, suplementów diety oraz żywności funkcjonalnej.

Należy zaznaczyć, że poszczególne szczepy, nawet należące do tego samego gatunku, mogą wykazywać zróżnicowane efekty probiotyczne. Aby zastosować probiotyk należy wybrać preparat zawierający znany, zidentyfikowany szczep bakterii o dobrze udokumento-

wanym w badaniach klinicznych działaniu probiotycznym. Należy również wyraźnie zróżnicować probiotyki o działaniu powodującym ogólną poprawę stanu zdrowia oraz modulację funkcji fizjologicznych organizmu człowieka zawarte w żywności funkcjonalnej czy suplementach diety, od probiotyków zarejestrowanych jako leki, działających zapobiegawczo, a tym bardziej leczniczo, w odniesieniu do zdefiniowanej jednostki chorobowej.

2. Otrzymywanie, selekcja i właściwości szczepów probiotycznych

Do drobnoustrojów o działaniu probiotycznym należą przede wszystkim bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* z grupy bakterii kwasu mlekowego, których wspólną cechą jest zdolność beztlenowego rozkładu węglowodanów na drodze fermentacji mlekowej. Oprócz nich do bakterii kwasu mlekowego zaliczane są także inne mikroorganizmy z rodzaju *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* [30], *Bacillus* spp. [23], niektóre szczepy *Escherichia coli* (np. *E. coli* Nissle 1917) oraz *Propionibacterium* spp., jak również drożdżaki z rodzaju

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. dr W. Chodźki 1, 20-093 Lublin; tel. 081 742 37 72; e-mail: mikrob.farm@umlub.pl

Tabela I
Cechy funkcjonalne szczepów probiotycznych

<ul style="list-style-type: none"> • pochodzenie z mikrobiomu człowieka, • ściśle określona przynależność rodzajowa i gatunkowa, potwierdzona metodami biologii molekularnej, • brak działania patogennego, inwazyjnego oraz karcynogennego, • oporność na działanie soku żołądkowego i kwasów żółciowych po podaniu doustnym, • zachowywanie właściwości probiotycznych po procesie technologicznym oraz względnie długim okresie przechowywania, • zdolność do produkcji substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, w tym kwasów organicznych, nadtlenu wodoru oraz bakteriocyn, • właściwości powierzchniowe umożliwiające adhezję do komórek nabłonkowych, • antagonizm wobec typowych patogenów przewodu pokarmowego lub układu moczowo-płciowego, • konkurencja o receptory z komórkami drobnoustrojów patogennych takich jak <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella typhimurium</i>, • korzystny wpływ na organizm gospodarza, potwierdzony w prawidłowo przeprowadzonych, kontrolowanych badaniach klinicznych [15, 51],
--

Tabela II
Cechy technologiczne szczepów probiotycznych [28]

<ul style="list-style-type: none"> • łatwość produkcji dużej ilości biomasy, • oporność na procedury utrwalania takie, jak zamrażanie czy liofilizacja, • żywotność i stabilność cech bakterii w czasie przechowywania i dystrybucji produktów probiotycznych, • wysoka przeżywalność przechowalnicza w gotowym produkcie, • brak pogorszenia cech organoleptycznych gotowych produktów • oporność na bakteriofagi • stabilność genetyczna

Saccharomyces, np. *S. boulardii* [15, 34]. Do produkcji żywności funkcjonalnej i preparatów probiotycznych najczęściej stosuje się bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Streptococcus* [19]. Przykłady drobnoustrojów o znaczeniu probiotycznym przedstawia Tabela III.

Precyzyjne zdefiniowanie szczepu drobnoustroju jest najistotniejszą charakterystyką probiotyku. Wymagania

stawiane szczepom probiotycznym są bardzo wysokie. Kryteria, jakie powinny spełniać probiotyki zgodnie z zaleceniami FAO/WHO przedstawia Tabela I i II [13, 16, 21, 29, 62]. Szczepy stosowane w preparatach probiotycznych dla ludzi powinny pochodzić z mikrobiomu człowieka. Probiotyki pochodzenia jelitowego uzyskuje się przez selekcjonowanie szczepów bakterii wyizolowanych z przewodu pokarmowego zdrowych noworodków, biorąc pod uwagę fakt, że bakterie zasiedlające ich jelita w kilka dni po urodzeniu reprezentują pionierskie, zdolne do szybkiej i skutecznej kolonizacji przewodu pokarmowego gatunki oraz dodatkowo są szybko rozpoznawane przez komórki układu immunologicznego zwane komórkami prezentującymi antygen [61]. W przypadku probiotyków dopochwowych, szczepy powinny być izolowane z układu moczowo-płciowego zdrowych, młodych kobiet.

Tabela III
Przykłady szczepów mikroorganizmów probiotycznych wykorzystywanych przemysłowo o udowodnionej skuteczności w badaniach klinicznych

<i>Lactobacillus</i> spp.	
<i>L. acidophilus</i>	Wrzodziejące zapalenie jelita; leczenie zaburzeń motorycznych jelit [54]
<i>L. acidophilus</i> w kombinacji z <i>L. bulgaricus</i>	Zmniejszenie ryzyka wystąpienia biegunki poantybiotykowej [54]
<i>L. acidophilus</i> w kombinacji z <i>B. longum</i>	Zmniejszenie ryzyka wystąpienia biegunki poantybiotykowej [54]
<i>L. acidophilus</i> w kombinacji z <i>B. lactis</i>	Zmniejszenie częstości działań niepożądanych, związanych z leczeniem <i>Helicobacter pylori</i> [54]
<i>L. acidophilus</i> CRL639	Hamowanie wzrostu <i>H. pylori</i> in vitro [53]
Kombinacja: <i>L. acidophilus</i> + <i>B. bifidum</i> + <i>L. bulgaricus</i> + <i>Str. thermophilus</i>	Zmniejszenie ryzyka wystąpienia biegunki podróży (wstępne wyniki) [57]
Kombinacja (VSL#3): <i>L. acidophilus</i> , <i>B. breve</i> + <i>B. longum</i> + <i>B. infantis</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>L. paracasei</i> + <i>L. bulgaricus</i> + <i>Str. thermophilus</i>	<i>Pouchitis</i> (zapalenie operacyjne wytworzonego woreczka kałowego) [54, 55]; leczenie biegunki zespołu jelita drażliwego [54]
<i>L. casei rhamnosus</i> Lcr35	Leczenie zaparcia czynnościowego [57]
<i>L. casei</i> Shirota	Pomocniczo w leczeniu zaburzeń defekacji u dorosłych [54, 57]
<i>L. casei</i> DN-114 001	Zwiększenie odsetka eradykacji <i>H. pylori</i> , zmniejszenie ryzyka działań niepożądanych związanych z leczeniem [57]
Kombinacja (napój jogurtowy): <i>-L. casei</i> DN-114 001 + <i>Str. thermophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i>	Zapobieganie biegunce związanej ze stosowaniem antybiotyków i biegunce związanej z zakażeniem <i>Clostridium difficile</i> u osób powyżej 50 roku życia [57]

Tabela III c.d.

<i>L. rhamnosus</i> GG	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego [55]; zmniejszenie nasilenia i rozległości atopowego zapalenia skóry [53]; zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków [40, 54]; konkurencja o receptory lub przyleganie do komórek nabłonkowych, uniemożliwiająca dostęp patogenów do nabłonka jelitowego; wytwarzanie związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym; zwiększona sekrecja mucyn; umiarkowana skuteczność w zapobieganiu bieguncie pozaszpitalnej w populacji dziecięcej; umiarkowana skuteczność w leczeniu ostrej biegunki infekcyjnej; prawdopodobne zmniejszenie ryzyka wystąpienia nawrotów biegunki wywołanej przez <i>C. difficile</i> ; zmniejszenie częstości działań niepożądanych, związanych z leczeniem <i>H. pylori</i> [54]
Kombinacja: <i>L. rhamnosus</i> Pen + <i>L. rhamnosus</i> E/N + <i>L. rhamnosus</i> Oxy	Zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków [57]
<i>L. rhamnosus</i> 19070-2 w kombinacji z <i>L. reuteri</i> DSM 12246	Skuteczne leczenie ostrej biegunki infekcyjnej [54]
<i>L. reuteri</i>	Biegunki rotawirusowe; skrócenie czasu trwania ostrej biegunki infekcyjnej u dzieci [57]
<i>L. bulgaricus</i>	Produkcja bakteriocyn przez niektóre szczepy; korzystne działanie jogurtu poprzez uwalnianie przez bakterie w nim zawarte laktazy, powodującej częściowy lub całkowity rozkład laktozy [54]
<i>L. plantarum</i> 299v	Konkurencja o receptory lub przyleganie do komórek nabłonkowych, uniemożliwiająca dostęp patogenów do nabłonka jelitowego; zwiększona sekrecja mucyn; prawdopodobne zmniejszenie ryzyka wystąpienia nawrotów biegunki wywołanej przez <i>C. difficile</i> [54]
<i>L. plantarum</i> DSM 9843	Leczenie zaburzeń motorycznych jelit [54]
<i>L. johnsonii</i> LA1	Hamowanie wzrostu <i>H. pylori</i> in vitro [54]
<i>L. lactis</i> DN-173 010	Leczenie zaparcia czynnościowego [57]
Bifidobacterium spp.	
<i>B. animalis</i>	Skracanie pasażu jelitowego – żywienie ludzi starszych [52]
<i>B. lactis</i> Bb-12 (dawniej <i>B. bifidum</i>) w kombinacji z <i>Streptococcus thermophilus</i>	Wysoka aktywność fosfoketolazy; zmniejszenie nasilenia i rozległości atopowego zapalenia skóry [53]; zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków [40, 57], zapobieganie bieguncie rotawirusowej u dzieci przewlekle hospitalizowanych [54]
Inne	
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego [54, 55]; podtrzymywanie remisji w chorobie Leśniowskiego-Crona [54]; pomocniczo w leczeniu zaburzeń defekacji u dorosłych [54, 57]
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Biegunka ostra i poantybiotykowa [40]; modyfikacja receptorów dla toksyn bakteryjnych na drodze enzymatycznej, receptor dla toksyny A <i>Clostridium difficile</i> ; zmniejszenie ryzyka wystąpienia nawrotów biegunki wywołanej przez <i>C. difficile</i> ; podtrzymywanie remisji w chorobie Leśniowskiego-Crona; zmniejszenie częstości działań niepożądanych, związanych z leczeniem <i>H. pylori</i> [54]; zmniejszenie ryzyka wystąpienia biegunki podróży [57]
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Zmniejszenie ryzyka wystąpienia biegunki poantybiotykowej [54]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków [40]; korzystne działanie jogurtu poprzez uwalnianie przez bakterie w nim zawarte laktazy, powodującej częściowy lub całkowity rozkład laktozy [54]

Selekcja szczepów o najkorzystniejszych właściwościach probiotycznych odbywa się wielokierunkowo. Jedną z istotnych cech probiotyków są ich właściwości przeciwbakteryjne, skierowane przeciwko patogenom przewodu pokarmowego lub układu moczowo-płciowego kobiet. Probiotyki wywierają bezpośredni wpływ na wzrost bakterii chorobotwórczych. Znacznie ograniczając adhezję patogenów do receptorów na powierzchni

komórek nabłonkowych, unieczynnając toksyny bakteryjne czy konkurując o substancje odżywcze. Probiotyki wywierają również pośredni wpływ wytwarzając substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, np. bakteriocyny czy kwasy organiczne [10, 24, 25]. W warunkach *in vivo* wymienione czynniki działają jednocześnie i często synergistycznie [18]. Szczep można uznać, że posiada dobre właściwości antagonistyczne,

gdy działa hamująco *in vitro* na wzrost bakterii patogennych. W badaniu wykorzystuje się szczepy referencyjne bakterii chorobotwórczych (np. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, szczepy enteropatogenne czy uropatogenne *E. coli*). Dodatkowo wykazano wyższą efektywność działania preparatów wieloszczepowych w porównaniu do pojedynczych szczepów, włączając szczepy które są składnikami mieszaniny [6]. Równocześnie należy pamiętać, że szczepy użyte do produkcji preparatu probiotycznego wieloszczepowego nie mogą wykazywać względem siebie właściwości antagonicznych. Dlatego w każdym produkcie kombinacja mikroorganizmów musi być dokładnie sprawdzona pod względem ich wzajemnego oddziaływania [43].

O właściwościach antagonistycznych danego szczepu bakterii probiotycznej decydować będą także mechanizmy oddziaływania między mikroorganizmami związane przede wszystkim z kwaśnymi produktami metabolizmu tych bakterii takich jak kwas mlekowy, octowy czy masłowy. Według zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), bakterie probiotyczne powinny produkować kwas mlekowy, z tym, że produkcja izomeru L(+) kwasu mlekowego powinna wynosić powyżej 50% całkowitej ilości produkowanego kwasu. W wyniku fermentacji bakterie produkują od 0,6 do 3% kwasu mlekowego [30]. Kwas L(+) mlekowy, jako identyczny z powstającym w mięśniach, jest w pełni metabolizowany przez człowieka [28]. Zaletą danego szczepu bakteriynego będzie synteza kwasu mlekowego z bardzo niskim udziałem izomeru D(-) kwasu mlekowego lub całkowitym jego brakiem. Zakwaszenie treści jelitowej sprzyja utrzymaniu równowagi mikrobiomu jelita grubego, a kwas masłowy może stanowić dodatkowe źródło energii dla kolonocytów [51], wywierając efekt troficzny na błonę śluzową jelit.

Proporcje wytwarzanych kwasów organicznych zależą oczywiście od szczepu bakterii metabolizujących określone substraty [51]. Niektóre bakterie mlekowe wytwarzają także kwas octowy, który łatwo wnika do wnętrza komórek i hamuje rozwój mikroorganizmów znacznie silniej niż kwas mlekowy. Inne kwasy organiczne, np. kwas mrówkowy, propionowy, benzoesowy czy mewalonowy, są produkowane przez bakterie w znacznie mniejszych ilościach. Śladowe ilości wymienionych kwasów często wzmacniają jednak działanie głównych czynników antibakteryjnych [18]. Jednocześnie bakterie kwasu mlekowego tolerują niskie pH (ok. 3–4) [6, 29]. Optymalne temperatury wzrostu bakterii probiotycznych wynoszą 20–28°C (gatunki mezofilne) i 37–45°C (gatunki termofilne) [28, 30]. Dodatkowo niskie pH treści jelitowej zwiększa rozpuszczalność soli wapniowych i magnezowych ułatwiając ich wchłanianie [51].

Bakterie probiotyczne charakteryzują się metabolizmem fermentacyjnym, a głównym produktem przemian węglowodanów, jak już wspomniano powyżej, jest kwas

mlekowy. Bakterie te wykorzystują mono- i disacharydy oraz niektóre oligo- i polisacharydy. Podczas hodowli bakterii kwasu mlekowego w mleku podstawowym substratem fermentacji jest laktoza [30], która jest rozkładana na glukozę i galaktozę. Możliwość rozkładania laktozy przez dany szczep jest bardzo ważna zwłaszcza podczas stosowania probiotyków przez pacjentów z nietolerancją laktozy. Podczas selekcji sprawdzana jest aktywność beta-galaktozydazowa danego szczepu [25].

Ważna z punktu widzenia skuteczności probiotyku jest ocena jego zdolności przylegania do komórek nabłonka jelit lub pochwy oraz żywotności w miejscu docelowym. Ważną cechą szczepu probiotycznego są jego właściwości powierzchniowe, decydujące o zdolności przylegania (adherencji). Przy selekcji szczepu należy wykonać badania sprawdzające jego hydrofobowe właściwości powierzchniowe [11, 25] oraz jakościowo produkcja śluzu przez bakterie. Bakterie probiotyczne powinny przylegać do komórek organizmu człowieka. Badanie siły przylegania przeprowadza się na ludzkich liniach komórkowych [22]. Konkurencja *in vivo* o adhezję do powierzchni nabłonka między mikrobiomem probiotycznym i komensalnym z jednej strony, a mikroorganizmami chorobotwórczymi z drugiej, decyduje o utrzymaniu odpowiednich relacji między tymi dwoma populacjami i tym samym ma zasadniczy wpływ na zdrowie człowieka. W adhezji bakterii decydującą rolę odgrywają hydrofobowość i ładunek powierzchniowy komórek bakteryjnych, ich struktury powierzchniowe takie, jak rzęski, fimbrie, białka i wielocukry powierzchniowe oraz powinowactwo tych struktur do receptorów komórek nabłonkowych [27]. Zdolność do adhezji jest cechą indywidualną poszczególnych szczepów bakterii [11]. Siła adhezji może decydować o właściwościach probiotycznych danego szczepu. Podczas przesuwania się masy pokarmowej w kierunku odbytnicy następuje oderwanie słabo przytwierdzonych bakterii oraz skrawków nabłonka wraz z zasiedlonymi tam bakteriami. W ten sposób tworzy się nowa powierzchnia do zasiedlenia przez bakterie. Proces ten jest jedną z przyczyn zmian w składzie mikrobiomu jelitowego. Wymiana gatunków na powierzchni jelit oraz fakt, że niektóre bakterie probiotyczne mogą mieć dłuższy kontakt z organizmem ludzkim poprzez silniejsze właściwości adhezyjne, może decydować o ich lepszej skuteczności prozdrowotnej [18].

Probiotyczne znaczenie mają tylko te komórki bakterii, które dotrą do miejsca oczekiwanego ich działania. W przypadku szczepów, które będą stosowane doustnie, selekcja musi obejmować wybranie bakterii opornych na działanie soku żołądkowego i żółci, aby mogły przetrwać pasaż przez przewód pokarmowy [7]. Wynik badania *in vitro* powinien potwierdzać brak lub minimalny spadek gęstości badanego szczepu po inkubacji ze sztucznym sokiem żołądkowym [7, 25]. Szczep nie powinien wyka-

zywać wrażliwości na niskie pH soku żołądkowego, trawienie przez pepsynę i sole żółci.

Ze względu na fakt, iż właściwości probiotyków są swoiste dla danego szczepu, sugeruje się, aby identyfikacja szczepu następowała za pomocą metod fenotypowych (morfologia kolonii na podłożu wzrostowym, morfologia mikroskopowa, fermentacja węglowodanów) oraz za pomocą metod genotypowych. Typowanie genetyczne powinno opierać się na najnowszych metodach biologii molekularnej takich, jak reakcja PCR ze starterami swoistymi dla danego gatunku, sekwencjonowanie 16S rRNA [16], elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), losowej amplifikacji polimorficznego DNA (RAPD) lub innych międzynarodowo uznawanych metod. Ustalenie obecności pozachromosomalnych elementów genetycznych, takich jak plazmidy, może pomóc w sklasyfikowaniu i określeniu charakterystyki szczepu. Wskazaniem jest, aby wszystkie szczepy były deponowane w ogólnie dostępnych, międzynarodowych kolekcjach drobnoustrojów [62].

W preparatach probiotycznych korzystnie jest stosować szczepy izolowane z populacji, w której mają mieć później zastosowanie. Wiadomo bowiem, że skład mikrobiomu organizmu człowieka, zwłaszcza mikrobiomu jelitowego, jest inny u mieszkańców różnych rejonów świata i zmienia się w zależności od diety i wieku [28].

Obecnie także uważa się, iż pałeczki kwasu mlekowego wchodzące w skład preparatu probiotycznego powinny pozytywnie modulować funkcje immunologiczne śluzówki jelit oraz układ odpornościowy organizmu [26, 33]. Probiotyki mogą stymulować zarówno odpowiedź humoralną jak i komórkową [24, 45]. Między innymi wykazano, że stosowanie szczepu probiotycznego powoduje wzrost liczby komórek syntetyzujących przeciwciała typu IgA na powierzchni błony śluzowej jelit [45] i co ciekawe, także dotyczy to błony śluzowej oskrzeli [36]. Różne szczepy probiotyczne są zdolne do aktywacji makrofagów i indukcję produkcji czynnika TNF- α oraz interleukin (IL-1, IL-6, IL-12 i IL-18), które zwiększają proces fagocytozy. Zwiększoną odpowiedź immunologiczną obserwowano także u zdrowych ochotników, którym podawano *L. rhamnosus*, gdzie zaobserwowano reakcję limfocytów T na antygeny chorobotwórczych bakterii jelitowych [42, 45].

W celu uzyskania efektu probiotycznego niezbędne jest zastosowanie minimalnej liczby jednostek tworzących kolonie (colony forming units, CFU) na dawkę [8]. Dawki stosowane w badaniach interwencyjnych (w celach leczniczych lub profilaktycznych) są bardzo zróżnicowane. Uważa się jednak, że minimalna dawka terapeutyczna wynosi od 10^6 – 10^9 [12] do 10^8 – 10^{10} CFU/dziennie [16]. Kanadyjski Natural Health Products Directorate zaleca minimalną dawkę w wysokości 5×10^9 CFU/dziennie przez 5 kolejnych dni [8]. Badania wykazały, że codzienne wzbogacenie diety w 10^9 – 10^{12} ko-

mórek bakterii probiotycznych już po kilku tygodniach stosowania może spowodować wzrost liczby naturalnych komórek bójczych w surowicy krwi, zwiększyć aktywność makrofagów i limfocytów [29, 44].

3. Bezpieczeństwo probiotyków

Stosowane w probiotykach drobnoustroje nie mogą być patogenne [16], czyli powinny posiadać status GRAS (generally recognized as safe). Ponadto, w aspekcie toksyczności ostrej i przewlekłej probiotyki są uważane za bezpieczne. Nawet podanie dożołądkowe myszom dawki dobowej *L. rhamnosus* w wysokości 10^{11} CFU nie wpływało na funkcje wątroby i śledziony oraz nie stwierdzono zmian w krezkowych węzłach chłonnych. Ustalona dawka letalna LD_{50} (dawka powodująca śmiertelność 50% badanych zwierząt w ciągu doby) dla *L. rhamnosus* przewyższa 50 g suchej masy bakterii na kilogram masy ciała myszy. Pomimo różnic międzygatunkowych, można założyć, że bezpieczna dawka bakterii probiotycznych dla człowieka o masie ciała 70 kg wynosi 35 g suchej masy bakterii [60]. Prowadzone badania nad ewentualną toksycznością przewlekłą bakterii kwasu mlekowego nie wykazały widocznych efektów toksycznych, w tym zaburzeń funkcji wątroby i śledziony. *L. rhamnosus* był podawany zwierzętom w wodzie pitnej w dobowej dawce 10^2 , 10^4 i 10^8 CFU na jedną mysz. Dodatkowo stwierdzono, że myszy, które przyjmowały w wodzie pitnej bakterie probiotyczne szybciej przybierały na wadze [1]. Dowiedziono także, że pałeczki kwasu mlekowego oraz inne bakterie probiotyczne nie wywołują efektów karcynogennych. Co ciekawe, stwierdzono, że bakterie probiotyczne mogą hamować rozwój raka okrężnicy u szczurów wywołwanego karcynogenem (azoksymetanem) [14, 26]. Preparaty zawierające żywe szczepy *Lactobacillus* pochodzenia ludzkiego mogą być przyjmowane bez obawy ich przedawkowania i działań niepożądanych.

4. Otrzymywanie produktów probiotycznych

Probiotyki stosowane profilaktycznie lub leczniczo są najczęściej przygotowywane w postaci liofilizowanej biomasy zamkniętej w szklanych ampułkach lub fiolkach, saszetkach lub kapsułkach twardych (celulozowych lub żelatynowych). Proces liofilizacji (suszenie sublimacyjne) zapewnia najlepsze parametry jakościowe suchego preparatu bakteryjnego. Większość bakterii probiotycznych jest wrażliwa na ogrzewanie (termolabilna) i ginie w temperaturze 60–85°C [17], stąd suszenie sublimacyjne, które można prowadzić długo i w niższych temperaturach jest najszerzej stosowaną techniką produkcyjną dla otrzymania suchej biomasy.

Preparaty liofilizowane dzięki dużej powierzchni cząstek, odznaczają się na ogół dobrą rozpuszczalnością, często są silnie higroskopijne. Technologia produkcji liofilizowanych bakterii probiotycznych pozwala na uzyskanie preparatów odznaczających się trwałością i cechujących wysokim poziomem żywotności podczas suszenia i przechowywania.

Rzadziej stosowaną metodą otrzymywania suchej biomasy bakteryjnej jest suszenie rozpyłowe. Istnieje wiele danych odnoszących się do kwestii jakości probiotyków po zastosowaniu suszenia rozpyłowego. Podczas tego procesu dochodzi do uszkodzenia komórek i utraty żywotności kultur probiotycznych [17]. Dlatego konieczne jest ulepszenie procesu suszenia rozpyłowego, aby zapewnić lepszą przeżywalność, w tym stosowanie środków osłonowych, które wykazałyby lepszą skuteczność przeżycia i adaptację do środowiska szczepu probiotycznego [4, 7]. Proszek bakterii otrzymywany suszeniem rozpyłowym ma złą zwilżalność, utrudniającą rehydratację. Głównym problemem technologicznym jest tu wysoka temperatura powietrza wylotowego, ale istnieją doniesienia, że także wzrost temperatury powietrza wlotowego ma wpływ na spadek przeżywalności komórek [37]. Zaobserwowano liniowy spadek żywotności szczepu *Lactobacillus paracasei* wraz ze wzrostem temperatury wylotowej. Przeżywalność z ponad 90% w temperaturze 70–75°C, spadła do zaledwie kilku procent w temperaturze 100–105°C, osiągając wartość zerową w temperaturze 120°C [17]. Stąd ważną informacją mogącą ułatwić dobór temperatur suszenia może dostarczyć określenie termotolerancji szczepu. Wrażliwość termiczna jest cechą indywidualną każdego szczepu bakterii i często kilka szczepów nawet bardzo blisko spokrewnionych ze sobą może odznaczać się zróżnicowaną wrażliwością. Za zastosowaniem suszenia rozpyłowego do utrwalania biomasy przemawiają przede wszystkim znacznie niższe koszty, które są sześć razy niższe niż koszty liofilizacji. Ważnym kryterium przemawiającym za suszeniem rozpyłowym jest możliwość prowadzenia procesu na dużą skalę oraz niska waga uzyskiwanego produktu, pozwalająca na obniżenie kosztów transportu [37].

Stabilność i przeżywalność szczepów probiotycznych w formie suchej zależy od temperatury przechowywania i zawartej w nich wody, przy czym aktywność wody jest tu funkcją temperatury [15]. Stąd trwają ciągle poszukiwania metod temu przeciwdziałających. Szczególnie korzystnym nośnikiem bakterii probiotycznych podczas suszenia jest mleko. Mleko jest naturalnym środowiskiem występowania bakterii kwasu mlekowego. Zapewnia buforowanie treści żołądka i lepsze przeżycie bakterii podczas lokacji przez przewód pokarmowy, a zawarta w mleku laktoza stanowi substrat wzrostowy dla bakterii [30, 31]. Przeżywalność podczas suszenia oraz stabilność podczas przechowywania udaje się także poprawić dodając substancji o charakterze ochronnym

takich jak kwas askorbinowy, glutaminian sodu, ekstrakt drożdżowy, maltodekstryny, skrobia, guma arabska, żelatyna lub nawet jogurt [2, 37].

Dla zapewnienia odpowiedniej żywotności bakterii w preparacie probiotycznym (kapsułki, tabletki, proszek) korzystne jest zapewnienie warunków chłodniczych, niskiego poziomu aktywnej wody oraz stosunkowo krótkiego czasu trwałości (12–24 miesięcy). Taki preparat powinien być przechowywany w suchym i chłodnym miejscu. Jednakże produkt konfekcjonowany z niską zawartością wody (<0,20) może być przechowywany w wyższej temperaturze (4–30°C) [15]. Przeżywalność liofilizowanych bakterii probiotycznych w dużej mierze zależy od ich właściwości ale także od sposobu produkcji, opakowania i przechowywania. Przy masowej produkcji probiotyku należy brać pod uwagę związane z żywotnością takie czynniki jak: metoda suszenia, rodzaj i rozmiar opakowania bezpośredniego, warunki przechowywania (np. temperatura, wilgotność), jakość nośnika (np. standardowego nośnika mleka w proszku), procedury nawodnienia czy postępowanie z nawodnionym produktem [62].

Wytwarzanie produktów probiotycznych będących lekami musi odbywać się zgodnie z dobrą praktyką wytwarzania (GMP). Taki produkt musi podlegać bezwzględny procedurom zapewnienia i kontroli jakości. Badania nad jakością produktów probiotycznych wykazują, że największym problemem technologicznym jest zachowanie wysokich stężeń bakterii probiotycznych (żywotności) podczas przechowywania i pasażowania przez żołądek. Wiele czynników działa toksycznie i zabójczo na bakterie mlekowe [7]. Ekspozycja na tlen, ciepło i wilgoć doprowadza do zniszczenia bakterii. Pojawiły się nowe techniki przygotowania probiotyków, na przykład z wykorzystaniem mikrokapsulek lub mikrogranulek chroniących przed działaniem kwasu żołądkowego i żółci, przez co wpływają na polepszenie przeżywalności w przewodzie pokarmowym [4, 7, 59]. Każda mikrogranulka jest powleczona specjalną polewą zabezpieczającą je przed działaniem kwasu i temperatury. W procesie mikrokapsulacji używa się takich substancji jak alginiany, gumy (żelatynowa i ksantanowa), K-karagenian, ftalan octanu celulozy, chitosan, skrobia, żelatyna, białka mleka [4]. Oprócz funkcji ochronnych [15] i kontrolujących reakcje oksydacyjne, mikrokapsułki pełnią także rolę maskowania smaku, koloru i zapachu, zapewnienia trwałego i kontrolowanego uwalniania, przedłużenia terminu ważności i wiele innych [4]. Granulki te mają równocześnie odpowiedni skład ułatwiający uwalnianie się bakterii w treści jelita cienkiego.

Probiotyk dopuszczony do sprzedaży musi zostać odpowiednio oznakowany [61, 62]. Etykieta powinna zawierać: skład opisujący rodzaj, gatunek i nazwę szczepu, minimalną ilość żywych bakterii pod koniec terminu ważności; odpowiednie warunki przechowywania oraz dane kontaktowe wytwórcy probiotyku. Nazew-

nictwo bakterii musi być zgodne z aktualnymi, naukowo rozpoznawalnymi nazwami. Pacjent po otrzymaniu probiotyku powinien być dokładnie poinstruowany, jak z nim postępować aby preparat zachował swoje parametry jakościowe.

Preparaty zawierające bakterie jelitowe mają kwaśny smak i zazwyczaj niezdecydowany aromat, który niekiedy może przeszkadzać w stosowaniu probiotyku doustnie. Często więc te parametry preparatów probiotycznych są polepszane poprzez dodatek aromatów, dosładzanie lub inne zabiegi zwiększające atrakcyjność smakowo-zapachową produktu.

Probiotykami określa się szeroki zakres produktów dostępnych na rynku. Preparaty zawierające bakterie probiotyczne są klasyfikowane pod kategorią żywność i w większości stanowią dodatki do żywności. Jednak różnią się one zasadniczo od leków, szczególnie jeśli chodzi o zakładane korzyści zdrowotne oraz wymagania jakościowe. Leki powinny mieć potwierdzoną jakość, bezpieczeństwo i skuteczność leczenia, łagodzenia lub zwalczania choroby, natomiast żywność, dodatki do pasz lub żywności wskazują na jakieś ogólne korzyści zdrowotne. Aby potwierdzić skuteczność określonego probiotyku należy przeprowadzić badanie kliniczne podwójnie ślepe, randomizowane, kontrolowane placebo fazy 2 i 3 na ludziach lub inne stosowne badanie z odpowiednią wielkością badanej grupy oraz pierwotnym punktem końcowym, służącymi określeniu efektywności szczepu/produktu. Wskazany jest także przeprowadzenie badania fazy 3 oceniającego efektywność przez porównanie probiotyków ze standardowym schematem leczenia określonego schorzenia [59]. Podczas badań klinicznych ważna jest identyfikacja i ocena efektów ubocznych. Leki w odróżnieniu od żywności podlegają także rygorystycznym wymaganiom rejestracyjnym potwierdzającym ich jakość, skuteczność i bezpieczeństwo monitorowane poprzez system zbierania działań niepożądanych (Pharmacovigilance).

Bezpieczeństwo stosowania probiotyków ocenia się również w aspekcie ich stabilności genetycznej. Niektóre szczepy probiotyczne, mogą w swoim materiale genetycznym posiadać plazmidy czy transpozony z genami lekooporności, stanowiąc potencjalny rezerwuuar tych genów dla naturalnego mikrobiomu, co jest istotne zwłaszcza w erze narastającej oporności drobnoustrojów na antybiotyki czy chemioterapeutyki. W związku z tym, istotne jest wykluczenie obecności tych struktur genetycznych u szczepów probiotycznych.

5. Probiotyki przyszłości – farmabiotyki?

W projektowaniu probiotyków, mającym na celu otrzymanie szczepów o udoskonalonych cechach użytkowych, wykorzystuje się metody biologii molekularnej.

Modyfikacje genetyczne probiotyków dotyczą zmian zarówno w zakresie funkcjonalnym jak i technologicznym szczepów probiotycznych. Jednym ze wspomnianych wcześniej problemów związanych z produkcją probiotyków jest wysoka wrażliwość bakterii na warunki fizyczne związane z przeprowadzaniem procesów technologicznych. Najczęściej spotykane ograniczenia dotyczą wysokiej temperatury oraz niskiej aktywności wody – a_w [48]. Klasyczne, „niemolekularne” metody uodparniania szczepów na trudne warunki procesów technologicznych polegają na poddaniu szczepów uprzedniemu działaniu sub-letalnego czynnika stresowego. Metody te mogą jednak znacznie obniżać aktywność komórkową oraz wydajność procesu produkcji preparatu. Wykorzystanie genetyki molekularnej pozwala na uniknięcie tych problemów.

Jednym z podstawowych mechanizmów chroniących bakterie przed stresem temperaturowym i niską a_w jest akumulacja osmoprotektantów – związków chroniących cytozol przed utratą wody oraz stabilizujących białka. Należą do nich m.in. trehaloza i betaina. Mechanizmy te są słabo rozwinięte u większości szczepów probiotycznych, jednak są one wysoce funkcjonalne u dzikich szczepów patogennych takich, jak np. *Listeria monocytogenes*. Dowiedziono, iż gen *betL*, warunkujący kodowanie systemu transportu betainy u *L. monocytogenes*, wklonowany do szczepu probiotycznego *Lactobacillus salivarius* UCC118 znacząco poprawia jego oporność na biotechnologiczne czynniki stresowe, wpływając na cechy takie jak osmo-, baro- i krio-oporność [46]. Podobne wyniki uzyskano po transformacji probiotycznego szczepu *Lactococcus lactis* genem *ostAB* warunkującym syntezę trehalozy u *E. coli* [58]. Innym przykładem jest zmodyfikowany genetycznie szczep *Lactobacillus paracasei* z nadekspresją genu warunkującego syntezę białka szoku cieplnego – GroESL, należącego do białek opiekuńczych – chaperonów; białko to odpowiada za przywrócenie prawidłowej konformacji białek (refolding) w warunkach wysokiej temperatury [9].

Bakterie probiotyczne po podaniu doustnym muszą wykazywać również odpowiedni poziom oporności na fizykochemiczne mechanizmy obronne organizmu gospodarza. Do mechanizmów tych należy kwaśne środowisko żołądka oraz działanie żółci i enzymów trawiennych. Transformacja genem *betL* szczepu *Bifidobacterium breve* UCC2003 pozwoliła osiągnąć jego wysoką przeżywalność w środowisku o podwyższonej osmolarności i obecności soków żołądkowych. Badania na zwierzętach wykazały przy tym wyraźnie zwiększoną liczebność probiotyków w jelitach, i co za tym idzie – zwiększoną skuteczność kliniczną, mierzoną obniżoną liczbą infekcji systemowych po podaniu doustnym *L. monocytogenes*, w stosunku do zwierząt kontrolnych [47]. Podobne wyniki uzyskano klonując również inne

geny odpowiedzialne za przeżywalność dzikich szczepów patogennych w przewodzie pokarmowym, np. gen warunkujący oporność na żółć (*bile*) występujący u *L. monocytogenes* [49].

Poza ulepszaniem szczepów probiotycznych w zakresie szeroko rozumianej oporności na czynniki stresowe, genetyczne modyfikacje probiotyków wykorzystywane mogą być również dla osiągnięcia lepszych efektów klinicznych. Możliwe jest wykorzystanie specyficznie modyfikowanych probiotyków w leczeniu infekcji jelitowych wywołanych przez enteropatogenne bakterie, wytwarzające toksyny [51]. W tym przypadku modyfikacje probiotyków polegają na ekspresji na powierzchni komórek bakteryjnych specyficznego receptora dla określonej toksyny. Przykładem jest zmodyfikowany szczep *E. coli* R1 z bardzo dużą liczbą analogów powierzchniowego receptora toksyny Stx produkowanej przez *Shigella dysenteriae*. Wykazano, iż jeden mg suchej masy tak zmodyfikowanego szczepu *E. coli* jest w stanie zneutralizować ponad 100 µg toksyny Stx [35]. Opisano również analogiczne probiotyki posiadające receptory toksyny wytwarzanej przez enteropatogenne szczepy *E. coli* czy toksyny *Vibrio cholerae*.

Podobne podejście zostało również zastosowane w projektowaniu nowych strategii w leczeniu zakażeń HIV. Prowadzone były próby z wykorzystaniem zmodyfikowanego szczepu *E. coli* wykazującego ekspresję hybrydy białka wirusowego gp41 i hemolizyny A; glikoproteina gp41 jest odpowiedzialna za wstępne etapy cyklu replikacyjnego HIV w komórce docelowej [39]. Białko hybrydowe syntetyzowane przez probiotyk jest wydzielane na zewnątrz komórki bakteryjnej i hamuje fuzję wirusa oraz jego wnikanie do komórek organizmu gospodarza. Zmodyfikowane probiotyki wykazywały zdolność kolonizacji nie tylko przewodu pokarmowego, ale również pochwy, co może stanowić potencjalną ochronę przed zakażeniem wirusowym. Prowadzone były również badania z wykorzystaniem szczepu *Streptococcus gordonii* transformowanego w celu ekspresji cyjanowiryny-N, białka pochodzącego z sinicy *Nostoc ellipsosporum*. Białko to wykazuje *in vitro* aktywność antyretrowirusową w wyniku specyficznego wiązania się do dwóch glikoprotein HIV – białka gp120 i białka gp41, ważnych z punktu widzenia wstępnych etapów cyklu replikacyjnego wirusa. Innym przykładem jest szczep *Lactobacillus jensenii* wydzielający rekombinowane białko CD4, hamujące wnikanie wirusa do komórek poprzez wiązanie się z glikoproteiną gp120 [5]. Ponieważ *L. jensenii* jest naturalnym kolonizatorem pochwy, wydaje się być odpowiednim kandydatem do „probiotycznego” zabezpieczenia tego ekosystemu przed infekcją wirusową. Jednak te nowe probiotyczne strategie walki z HIV wymagają dalszych badań *in vivo*.

Innym potencjalnym zastosowaniem probiotyków może stać się wykorzystanie ich jako nośnika antygenów

w celu przygotowania doustnych szczepionek. Probiotyki mogą być zmodyfikowane w celu służenia jako swoisty nośnik dla genów kodujących antygeny specyficzne dla danych patogenów. Przeprowadzono badania w celu wykorzystania do tego celu szczepu probiotycznego *Lactococcus lactis* [20]. Bakterie zostały uprzednio zmodyfikowane genetycznie w kierunku wyrażania ekspresji internaliny A, białka powierzchniowego warunkującego infekcję *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* jest patogenem wewnątrzkomórkowym, zaś internaliny są białkami powierzchniowymi odpowiedzialnymi za wnikanie komórek bakteryjnych do komórek gospodarza. Zmodyfikowany szczep *L. lactis* posiada zatem możliwość indukowania fagocytozy w komórkach nefagocytycznych, a co za tym idzie – wnikania do komórek nabłonka jelita niczym pasożyt wewnątrzkomórkowy. Komórki bakterii ulegają wtedy lizie i uwalniają plazmid, który jest wektorem odpowiednich genów kodujących antygeny – czyli szczepionką DNA.

Podejście takie może łączyć zalety szczepionek DNA i podawania szczepionek drogą doustną.

Szczepionki DNA stymulują silną odpowiedź zarówno miejscową jak i ogólną. Zaś doustna droga podania imituje zakażenie, co stymuluje układ odpornościowy i jest w stanie indukować długoterminową odpowiedź ogólną. Dodatkową zaletą wynikającą z tej formy szczepienia jest możliwość rezygnacji z wkłuc wymagających warunków ambulatoryjnych i wyszkolonego medycznie personelu.

Zastosowanie modyfikowanych genetycznie probiotyków – farmabiotyków niesie ze sobą jednak pewne ograniczenia związane z bezpieczeństwem biologicznym. Niektórych z tych zagrożeń można z pewnością uniknąć przez zastosowanie podwyższonych norm bezpieczeństwa biologicznego. Jednakże szerokie zastosowanie farmabiotyków wymagałoby opracowania metody zapewniającej pasywne i aktywne bezpieczeństwo. Tego typu rozwiązanie może stanowić gen *thyA* – warunkujący ekspresję syntazy tymidylanowej [49]. Wyłączenie tego genu powoduje, iż szczep stanie się całkowicie zależny od obecności tyminy, zaś jej brak jest bezwzględnie letalny dla bakterii. W efekcie bakterie nie będą w stanie akumulować się w środowisku. Wydaje się, iż ta metoda może stanowić pewny sposób na zapewnienie odpowiedniego poziomu bezpieczeństwa biologicznego.

6. Podsumowanie

Znaczenie ludzkiego mikrobiomu na ogólną kondycję organizmu ludzkiego w obecnych czasach staje się coraz bardziej zrozumiałe. Aktualnie uznaje się wręcz, iż organizm ludzki wraz z jego symbiotycznym mikrobiomem (zwłaszcza jelitowym) stanowią superorganizm

[3]. Probiotyki wykorzystywane do wspierania roli mikroorganizmów jelitowych, mają w tej chwili znaczenie nie tylko wspierające oporność przed zakażeniami, ale również mogą być modyfikowane genetycznie w celu otrzymywania szczepów o ukierunkowanym działaniu terapeutycznym. W tym kontekście jeszcze bardziej istotne staje się zadbanie o bezpieczeństwo i skuteczność szczepów probiotycznych. W związku z tym szczepy probiotyczne selekcjonowane ze szczepów dzikich oraz szczepy modyfikowane cechować muszą się odpowiednimi właściwościami, zarówno funkcjonalnymi jak i technologicznymi. Znaczące jest tu precyzyjne wyróżnienie owych cech i konsekwentne wykorzystanie metod badania owych pożądaných właściwości szczepów. Świadomość odpowiednich własności wymaganych od szczepów probiotycznych oraz technologie pozwalające na ich usprawnianie, zagwarantować mogą odpowiednią skuteczność i stabilność farmaceutyczną preparatów probiotycznych. Badania prowadzone w tych kierunkach wraz w połączeniu z rozwijającymi się leczniczymi preparatami probiotycznymi mogą stanowić o tym, iż probiotyki będą odgrywać znaczącą rolę w przyszłości mikrobiologii farmaceutycznej i lecznictwa.

Piśmiennictwo

- Bernardeau M., Vernoux J.P., Gueguen M.: Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *Int. J. Food Microbiol.* **77**, 19–27 (2002)
- Bielecka M., Majkowska A.: Effect of spray drying temperature of yoghurt on the survival of starter cultures, moisture content and sensoric properties of yoghurt powder. *Nahrung/food.* **44**, 257–262 (2000)
- Binek M.: Mikrobiom człowieka – zdrowie i choroba. *Post. Mikrobiol.* **51**, 27–36 (2012)
- Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J.: Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food. Engineering.* **104**, 467–483 (2011)
- Chang TL-Y., Chang C-H., Simpson D.A., Xu Q., Martin P.K., Lagenaur L.A.: Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11672–11677 (2003)
- Chapman C.M.C., Gibson G.R., Rowland I.: Health benefits of probiotics: are mixture more effective than single strains? *Eur. J. Nutr.* **50**, 1–17 (2011)
- Chen S., Zhao Q., Ferguson L.R., Shu Q., Weir I., Garg S.: Development of a novel probiotic delivery system based on microencapsulation with protectans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1447–1457 (2012)
- Coeuret V., Gueguen M., Vermoux J.P.: Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* **97**, 147–156 (2004)
- Corcoran B.M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Dockery P., Stanton C.: Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying. *Appl. Environ. Microb.* **72**, 5104–5107 (2006)
- Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S.: In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Res. Int.* **40**, 629–639 (2007)
- Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S.: Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.* **226**, 1065–1073 (2008)
- Czerwonka-Szaflarska M., Romańczuk B.: Probiotics for the prevention and treatment of selected gastrointestinal disorders in children. *F. Med. Rodz.* **4**, 135–140 (2010)
- Dunne C., O'Mahony L., Murphy E.: In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**(suppl), 386–92S (2001)
- Femia A.P., Lucern C., Dolara P., Giannini A., Biggeri A., Salvadori M., Clune Y., Collins K.J., Paglierani M., Caderni G.: Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, **23**, 1953–1960 (2002)
- Förstner S.D., Sindelar C.W., Ouwehand A.C.: Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*, **17**, 410–413 (2011)
- Fric P.: Probiotics and prebiotics – renaissance of a therapeutic principle. *CEJ Med.* **2**, 237–270 (2007)
- Gardiner G., O'Sullivan E., Kelly J., Auty M.A.E., Fitzgerald G.F., Collins J.K., Ross R.P., Stanton C.: Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus rhamnosus* and *L. salvarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2605–2616 (2000)
- Grajek W., Sip A.: Antagonistic activity of probiotics against pathogenic microorganisms. *Zakażenia, zesz.* **1**, 49–54 (2006)
- Granato D., Branko G.F., Cruz A.G., de Assis Fonseca Faria J., Shah P.N.: Probiotic dairy products as functional foods. *Comp. Rev. Food Science Food Safety*, **9**, 455–470 (2010)
- Guimaraes V.D., Gabriel J.E., Lefevre F., Cabanes D., Gruss A., Cossart P.: Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes Infect.* **7**, 836–44 (2005)
- Gupta V., Garg R.: Probiotics. *Ind. J. Med. Microbiol.* **27**, 202–209 (2009)
- Haeri A., Khodaii Z., Ghaderian S.M.H., Panah A.S.T., Najar R.A.: Comparison of adherence patterns of a selection of probiotic bacteria to Caco-2, HEp-2, and T84 cell lines. *Ann. Microbiol.* **62**, 339–344 (2012)
- Hairul Islam V.I., Praksh Babu N., Pnadikumar P., Ignacimuthu S.: Isolation and characterization of putative probiotic bacteria strain, *Bacillus amyloliquefaciens*, from North East Himalayan Soil Based on in vitro and in vivo functional properties. *Probiotics & Antimicrob. Prot.* **3**, 175–185 (2011)
- Heczko P.B., Strus M., Jawień M., Szymański H.: Medical applications of probiotics. *Wiad. Lek.* **58**, 640–646 (2005)
- Karasu N., Simsek O., Con A.H.: Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Ann. Microbiol.* **60**, 227–234 (2010)
- Kaur I.P., Chopra K., Saini A.: Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* **15**, 1–9 (2002)
- Knight S.D., Berglund J., Choudhury D.: Bacterial adhesions: structural studies reveal chaperone function and pilus biogenesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 653–660 (2000)
- Libudzisz Z.: Probiotics and prebiotics in fermented milks. *Ped. Wsp.* **4**, 19–25 (2002)
- Libudzisz Z.: Human intestinal microflora and probiotics. *Zakażenia, zesz.* **6**, 47–51 (2004)
- Libudzisz Z., Klewicka E.: Lactic Acid Bacteria in Probiotics Products. *Zakażenia, zesz.* **4**, 57–62 (2006)
- Livney Y.D.: Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 73–83 (2010)

32. Maeada N., Nakamura Y., Hirose Y.: Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 1122–1125 (2009)
33. Oelschlaeger T.A.: Mechanisms of probiotic action – A review. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 57–62 (2010)
34. Pagliaro G., Battimo M.: The use of probiotics in gastrointestinal diseases. *J. Nutr. Metab.* **3**, 105–113 (2010)
35. Paton A.W., Morona R., Paton J.C.: Receptor-mimic probiotics: potential therapeutics for bacterial toxin-mediated enteric diseases. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 253–255 (2010)
36. Perdigon G., Alvarez S., Medina M., Vintini E., Roux E.: Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on iga producing cells associated to bronchus. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **12**, 97–102 (1999)
37. Powalowski S., Cyplik P.: Methods for improving of lactic acid bacteria survival during spray drying. *Biotechnol.* **3**, 129–139 (2004)
38. Rachmilewitz D., Karmeli F., Takabayashi K.: Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology*, **122**, 1428–1441 (2002)
39. Rao S., Hu S., McHugh L., Lueders K., Henry K., Zhao Q.: Toward a live microbial microbicide for HIV: commensal bacteria secreting an HIV fusion inhibitor peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11993–11998 (2005)
40. Ruszczyński M., Szajewska H.: Probiotyki w zapobieganiu biegunce związanej ze stosowaniem antybiotyków – aktualizacja metaanalizy badań z randomizacją. *Pediatr. Współcz. (Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziec.)*, **10**, 96–104 (2008)
41. Schrezenmeir J., de Vrese M.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* **111**, 1–66 (2008)
42. Schulz M., Gottl C., Youn R.J., Iwen P., Vanderhoof J.A.: Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **38**, 293–297 (2004)
43. Shah N.P.: Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food-technol. Chicago: Institute of Food Technologists* **55**, 46–56 (2001)
44. Shanahan F.: Probiotics in perspective. *Gastroenterology*, **139**, 1808–1812 (2010)
45. Shandilya U.Kr., Jadhav S., Panwar V., Kansal V.K. Probiotics: Potent Immunomodulatory Tool Against Allergy. *Probiotics & Antimicro. Prot.* **3**, 151–158 (2011)
46. Sheehan V.M., Sleator R.D., Fitzgerald G.F., Hill C.: Heterologous expression of *BetL*, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2170 (2006)
47. Sheehan V.M., Sleator R.D., Hill C., Fitzgerald G.F.: Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology (Reading, England)*, **153**(Pt 10), 3563–3571 (2007)
48. Sleator R.D., Hill C.: New frontiers in probiotic research. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**, 143–147 (2008)
49. Sleator R.D., Hill C.: Rational design of improved pharmabiotics. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, 275–287 (2009)
50. Sleator R.D.: Probiotic therapy – recruiting old friends to fight new foes. *Gut Pathogens*, **2**, 5 (2010)
51. Stolarczyk A., Socha P., Socha J.: Probiotics and prebiotics in prophylactic and therapeutic use in children. *Terapia*, **1**, 116 (2002)
52. Steinka I.: Wybrane aspekty stosowania antybiotyków: *Ann. Acad. Med. Gedan.* **41**, 97–108 (2011)
53. Szajewska H., Mrukowicz J.Z.: Skuteczność probiotyków w leczeniu i zapobieganiu alergii pokarmowej – systematyczny przegląd piśmiennictwa. *Pediatr. Współcz. (Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziec.)*, **4**, 79–83 (2002)
54. Szajewska H.: Rola probiotyków w zapobieganiu i leczeniu chorób przewodu pokarmowego. *Pediatr. Współcz. (Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziec.)*, **7**, 53–60 (2005)
55. Szajewska H., Horvath A., Dziechciarz P.: Probiotyki, prebiotyki i synbiotyki w leczeniu nieswoistych zapaleń jelit – przegląd systematyczny. *Pediatr. Współcz. (Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziec.)*, **9**, 266–275 (2007)
56. Szajewska H.: Advances and Limitations of Evidence-Based Medicine – Impact for Probiotics. *Ann. Nutr. Metab.* **57**(suppl 1), 6–9 (2010)
57. Szajewska H.: Probiotyki w Polsce – kiedy, jakie i dlaczego? *Gastr. Klin.* **2**, 1–9 (2010)
58. Termont S., Vandenbroucke K., Iserentant D., Neiryneck S., Steidler L., Remaut E.: Intracellular accumulation of trehalose protects *Lactococcus lactis* from freeze-drying damage and bile toxicity and increases gastric acid resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7694–700 (2006)
59. Young R.J., Huffman S.: Probiotics use in children. *J. Pediatr. Health Care.* **17**, 277–283 (2003)
60. Zou J.S., Shu Q., Rutherford K.J., Prasad J., Gopal P.K., Gill H.S.: Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 153–161 (2000)
61. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Export Consultation, Cordoba, Argentina, 1–4 października 2001.
62. Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group, London, Ontario, Canada, 30 kwietnia – 1 maja 2002.