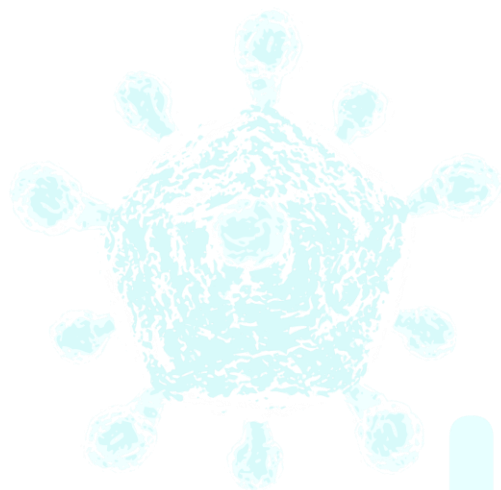


Raport z badań **„Potencjał probiotyczny suplementu diety Ekosynbiotyk”**

Dotyczy badań realizowanych zgodnie ze zleceniem nr 271 i 272 z dnia 03.09.2021

Nr oferty O-2021-09-02 i O-2021-09-03 z dnia 03.09.2021



itm

Zamawiający: ProBio Koło, 62-600 Koło, ul. Krokusowa 8

Przyjmujący zlecenie: Stowarzyszenie Ekosystem-Dziedzictwo Natury, ul. Erazma Ciołka 15 lok. 203, 01-445 Warszawa;

Miejsce wykonania i wykonawca badań: Instytut Technologii Mikrobiologicznych, al. NSZZ Solidarność 9, 62-700 Turek.

Turek, dnia 13.09.2021

Instytut Technologii Mikrobiologicznych
al. NSZZ Solidarność 9, 62-700 Turek, +48 571 204 022

Stowarzyszenie Ekosystem-Dziedzictwo Natury
ul. Erazma Ciołka 15, lok. 203, 01-445 Warszawa

Spis treści

Wprowadzenie	3
Cel i zakres badań.....	4
Materiał i metody badań.....	5
Badania przeżywalności w symulowanym przewodzie pokarmowym.....	5
Kontrola jakości produktów użytych do badania	5
Symulowanie przewodu pokarmowego – przebieg	5
Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej	6
Wyniki.....	8
Badanie przeżywalności w układzie pokarmowym	8
Kontrola jakości produktów użytych w eksperymencie	8
Przeżywalność w trakcie pasażu i kolonizacja	8
Aktywność przeciwdrobnoustrojowa.....	11
Podsumowanie.....	12
Bibliografia.....	13



Wprowadzenie

Zgodnie z założeniami formułowanymi przez Organizację Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Światową Organizację Zdrowia (WHO), probiotyki to żywe szczepy drobnoustrojów, które podawane w odpowiednich ilościach, modulują równowagę bakteryjną flory jelitowej i wywierają korzystny efekt na zdrowie konsumenta. Preparaty probiotyczne coraz częściej stosowane są w suplementacji. Dostępne są w formie pojedynczego szczepu lub w mieszaninie kultur różnych szczepów, które zostały wyselekcjonowane ze względu na ich korzystny wpływ. Kultury probiotyczne selekcjonowane są spośród głównie bakterii fermentacji mlekowej (LAB), a wśród nich z takich rodzajów jak *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*; probiotyki są również izolowane spośród *Saccharomyces* lub niepatogennych *Escherichia*.

Podstawowymi kryteriami, które muszą zostać spełnione, aby dany szczep lub produkt, przeznaczone do stosowania jako suplement diety, uznać za probiotyczny to wykazanie przeżywalności mikroorganizmów w warunkach przewodu pokarmowego oraz aktywność przeciwdrobnoustrojowa wobec mikroorganizmów niepożądanych, w tym chorobotwórczych. Przeżywalność w warunkach przewodu pokarmowego nie jest cechą powszechną wśród wymienionych powyżej grup mikroorganizmów. Jest również cechą, którą można sterować; tzn. jeśli szczep nie ma wrodzonej zdolności do przeżywania w warunkach panujących w żołądku, szczep można zabezpieczyć w celu zachowania jego przeżywalności w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego za pomocą np. kapsułkowania.

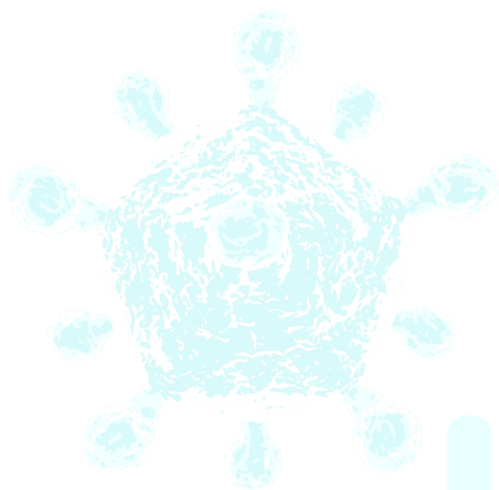
Mikroorganizmy głównie infekujące przewód pokarmowy to enteropatogenne *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*. Są to mikroorganizmy dostające się do organizmu ludzkiego ze środowiska (np. kontakt ze zwierzętami) lub z pokarmem. Ze względu na ryzyko infekcji i jej skutki mikroorganizmy te zostały objęte obowiązkiem monitoringu występowania w żywności (rozporządzenie WE 2073/2005 o kryteriach bezpieczeństwa żywności). Stąd też wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa szczepów rozpatrywanych jako probiotyki wobec takiego zestawu patogenów jest cechą bardzo pożądaną.

W ramach otrzymanego zlecenia badań podjęto ocenę potencjału probiotycznego preparatu Ekosynbiotyk, suplementu diety zawierającego żywe i aktywne mikroorganizmy probiotyczne w postaci płynnej. Skład preparatu to: niechlorowana woda (93,00%), melasa z trzciny cukrowej (4,60%), sok z jagód (0,60%), sok z wiśni (0,60%), sok z granatów (0,60%), kompleks probiotycznych mikroorganizmów SCD EP11 (0,30%), topinambur (0,15%), sól kamienna z Kłodawy (0,15%). Kompleks probiotycznych mikroorganizmów powstaje w wyniku fermentacji z udziałem: *Lactobacillus acidophilus* SCD208, *Lactobacillus plantarum* SCD014, *Lactobacillus casei* SCD469, *Lactobacillus bulgaricus* SCD210, *Lactobacillus fermentum* SCDPPW, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* SCD919, *Bifidobacterium bifidum* SCD521, *Bifidobacterium longum* SCD697, *Bifidobacterium animalis* SCD918, *Streptococcus thermophilus* SCD258, *Saccharomyces cerevisiae* SCD058.

Cel i zakres badań

Celem pracy było zbadanie przeżywalności mikroorganizmów zawartych w suplemencie diety Ekosynbiotyk w warunkach panujących w przewodzie pokarmowym. Cecha ta została oceniona w warunkach *in vitro* w symulowanym przewodzie pokarmowym człowieka.

Celem pracy było również zbadanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej suplementu diety, z oceną spektrum tej aktywności w odniesieniu do zestawu szczepów niepożądanych w przewodzie pokarmowym oraz z oceną skali tego oddziaływania.



itm

INSTYTUT TECHNOLOGII
MIKROBIOLOGICZNYCH

Instytut Technologii Mikrobiologicznych

al. NSZZ Solidarność 9, 62-700 Turek, +48 571 204 022

Stowarzyszenie Ekosystem-Dziedzictwo Natury

ul. Erazma Ciołka 15, lok. 203, 01-445 Warszawa

Materiał i metody badań

Badania przeżywalności w symulowanym przewodzie pokarmowym

Kontrola jakości produktów użytych do badania

Ponieważ wyniki eksperymentu były monitorowane i interpretowane w oparciu o zmiany liczby bakterii fermentacji mlekowej, ogólnej liczby drobnoustrojów i liczby drożdży, kontrola jakości suplementu diety oraz produktów spożywczych użytych w celu symulowania treści pokarmowej obejmowała wykonanie posiewów tych próbek w tożsamych kierunkach badań.

Symulowanie przewodu pokarmowego – przebieg

W celu określenia przeżywalności mikroorganizmów zawartych w analizowanym suplemencie diety zastosowano model *in vitro* układu pokarmowego (Tab. 1) za pomocą którego odwzorowano warunki trawienia w ludzkim przewodzie pokarmowym.

Na każdym etapie odcinka dokonywano pomiaru pH przed i po dodaniu buforów, badaną mieszaninę inkubowano w temp. $37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ w warunkach ciągłego mieszania (60 obr./min) na wytrząsarce obrotowej w celu zapewnienia jednorodnego rozkładu wszystkich składników oraz zasymulowania ruchu treści pokarmowej i perystaltyki jelit. Przez cały czas trwania eksperymentu z każdego z odcinków przewodu oraz po upływie czasu zalegania pokarmu pobierano próbki do badań mikrobiologicznych. Wykonywano posiewy ilościowe na liczbę bakterii fermentacji mlekowej, ogólną liczbę drobnoustrojów, liczbę drożdży, analizy molekularne jakościowego składu konsorcjum mikroorganizmów. Po zakończonej inkubacji zliczano kolonie wyrosłe na płytkach i oceniano przeżywalność badanych mikroorganizmów. Badania przeprowadzono w trzech powtórzeniach; wyniki uśredniono.

Próbki treści po trawieniu w jelicie cienkim i grubym poddano przedłużonej inkubacji (3 dni) w celu oceny stopnia rozwoju populacji mikroorganizmów i oceny ich potencjału do kolonizowania tych odcinków przewodu pokarmowego. W tym celu w trakcie trwania symulowania trawienia, treść z jelita cienkiego i grubego po fizjologicznym czasie trawienia w tych odcinkach (2 godziny i 18 godzin odpowiednio dla jelita cienkiego i grubego) została odebrana i poddana przedłużonej inkubacji. Analiza zdolności do kolonizacji nie obejmowała oceny zdolności do przylegania do nabłonka.

Tabela 1.: Cechy charakterystyczne badań w przewodzie pokarmowym symulowanym *in vitro*

Produkty wchodzące w zakres treści pokarmowej	<p><u>Preparat Ekosynbiotyku</u> (seria ALEA22123821200, ważny do 06/05/2023)</p> <p>Woda mineralna niegazowana (ogólna mineralizacja (mg/l) 742, główne składniki mineralne (mg/l) Ca^{2+} 130,3; Mg^{2+} 21,9; Na^{+} 11; HCO_3^{-} 539,1; SiO_2 22,1)</p> <p><u>Mleko krowie UHT 2,0 % tłuszczu</u> (wartość odżywcza z etykiety w (100g): wartość energetyczna 212 kJ, wartość energetyczna 50kcal, tłuszcz 2g, w tym kwasy tłuszczowe nasycone 1,2g, węglowodany 4,8g, w tym cukry 4,8g, białko 3,3g, wapń 120mg; data przydatności 12/10/2021)</p> <p><u>Owsianka</u> (skład: przecier z jabłek (45%), przecier z mango z zagęszczonego przecieru (41%), przecier z bananów (9%), płatki owsiane błyskawiczne (4%), sok jabłkowy z zagęszczonego soku (1%), witamina C; wartość odżywcza z etykiety w (100g): wartość energetyczna 341 kJ, wartość energetyczna 81kcal, tłuszcz 0,7g, w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0,1g, węglowodany 16,6g, w tym cukry 13,6g, białko 1,5g, sól 0g, witamina C 12mg; data przydatności 10/02/2022)</p>
--	---

	<u>Sok owocowy</u> (skład: soki z soków zagęszczonych: pomarańczowy (25%), mandarynkowy (25%), woda, regulator kwasowości – kwas cytrynowy, substancja słodząca – sukraloza, witamina C, naturalny aromat pomarańczowy; wartość odżywcza z etykiety w (100ml): wartość energetyczna 89kJ, wartość energetyczna 21kcal, tłuszcz 0g, w tym kwasy tłuszczowe nasycone 0g, węglowodany 5,0g, w tym cukry 4,9g, białko 0,2g, sól 0g, witamina C 8mg; data przydatności 23/06/2022)
Warianty badawcze	A – wariant „na czczo”, zawartość układu stanowi badany preparat oraz woda, pH na etapie początku trawienia w żołądku wynosi $2,5 \pm 0,2$ B – wariant „po posiłku”, bez matrycy spożywczej, zawartość układu stanowi badany preparat oraz woda, regulacja pH do wartości $4,0 \pm 0,2$ C – wariant „po posiłku”, zawartość układu stanowi badany preparat oraz mleko UHT, regulacja pH do wartości $4,0 \pm 0,2$ D – wariant „po posiłku”, zawartość układu stanowi badany preparat oraz owsianka, regulacja pH do wartości $4,0 \pm 0,2$ E – wariant „po posiłku”, zawartość układu stanowi badany preparat oraz sok wieloowocowy, regulacja pH do wartości $4,0 \pm 0,2$ F – wariant „po posiłku”, zawartość układu stanowi woda mineralna, mleko UHT, owsianka i sok wieloowocowy (1:1:1:1)
Odcinki przewodu pokarmowego	Jama ustna, żołądek, jelito cienkie, jelito grube
Warunki inkubacji	$37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$; warunki tlenowe (odcinki: jama ustna, żołądek, jelito cienkie początek trawienia) oraz beztlenowe (odcinki: jelito cienkie, jelito grube)
Pożywki hodowlane	MRS (de Man, Rogosa i Sharpe), pH neutralne ($6,5 \pm 0,2$) – pożywka przeznaczona do określenia liczby bakterii fermentacji mlekowej. PCA (Plate Count Agar) – pożywka do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów YGC (podłoże z chloramfenikolem) – podłoże do analizy liczby grzybów WP (Peptone Water)
Enzymy i odczynniki	Jama ustna: symulowany roztwór śliny, roztwór alfa-amylazy (Fisher Scientific, 0,29g/l), czas trawienia 1 min, pH w zależności od stosowania suplementu diety w zakresie od 3,4-6,7 Żołądek: roztwór pepsyny (ALINESS Betaine HCL Pepsyna 650/150 mg) w buforze PBS, czas trawienia 120 min, pH jak w opisie powyżej, w zależności od wariantu przewodu pokarmowego Jelito cienkie: roztwór wodorowęglanu sodu 1M, roztwór pankreatyny (Kreon® 10 000 (Solvay Pharmaceuticals) o aktywności 10 000 jednostek FIP lipazy, 8 000 jednostek FIP amylazy, 600 jednostek FIP proteazy), sole żółci 0,4% w objętości przewodu, czas trawienia 120 min, pH 6,0-6,2 Jelito grube: roztwór wodorowęglanu sodu 2M, czas trawienia 18h, pH 7,6-8,0

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Analizę przeprowadzono zgodnie z metodą farmakopealną USP51. Wprowadzone modyfikacje polegały na zastosowanym zakresie szczepów niepożądanych:

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Candida krusei* ATCC 14243

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* M/473/M/16, szczep wyizolowany jako zakażenie z żywności
- *Listeria innocua* ATCC 33090
- *Listeria innocua* M/475/M/16, szczep wyizolowany jako zakażenie z żywności
- *Listeria ivanovii* ATCC 19119
- *Listeria monocytogenes* ATCC 13932
- *Listeria monocytogenes* M/468/M/16
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145
- *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076
- *Salmonella enterica* serovar Indiana M/472/M/16
- *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Staphylococcus epidermidis* M/476/M/16

oraz na wyznaczeniu punktów czasowych, w których wykonano monitoring doświadczenia (0h, 2h, 8h, 24h, 48h, 72h).



Wyniki

Badanie przeżywalności w układzie pokarmowym

Kontrola jakości produktów użytych w eksperymencie

Tabela 2.: Wyniki badań kontroli jakości preparatu Ekosynbiotytk.

Kierunek badań	Metoda Badawcza	[Liczba, log ₁₀ jtk/ml]
Liczba drobnoustrojów tlenowych Metoda płytkowa	PN-EN ISO 4833-1:2013-12	8,3
Liczba bakterii fermentacji mlekowej Metoda płytkowa	PN-EN ISO 15214:2002	8,4
Liczba drożdży Metoda płytkowa	PN-EN ISO 21527-1:2009	5,1
pH	PB-M-24	3,33

Tabela 3.: Wyniki badań kontroli jakości produktów żywnościowych symulujących treść pokarmową.

Kierunek badań	Metoda Badawcza	Woda mineralna	Mleko UHT	Sok wielowocowy	Owsianka
		[Liczba, log ₁₀ jtk/ml]			[Liczba, log ₁₀ jtk/g]
Liczba drobnoustrojów tlenowych Metoda płytkowa	PN-EN ISO 4833-1:2013-12	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Liczba bakterii fermentacji mlekowej Metoda płytkowa	PN-EN ISO 15214:2002	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Liczba drożdży Metoda płytkowa	PN-EN ISO 21527-1:2009	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10

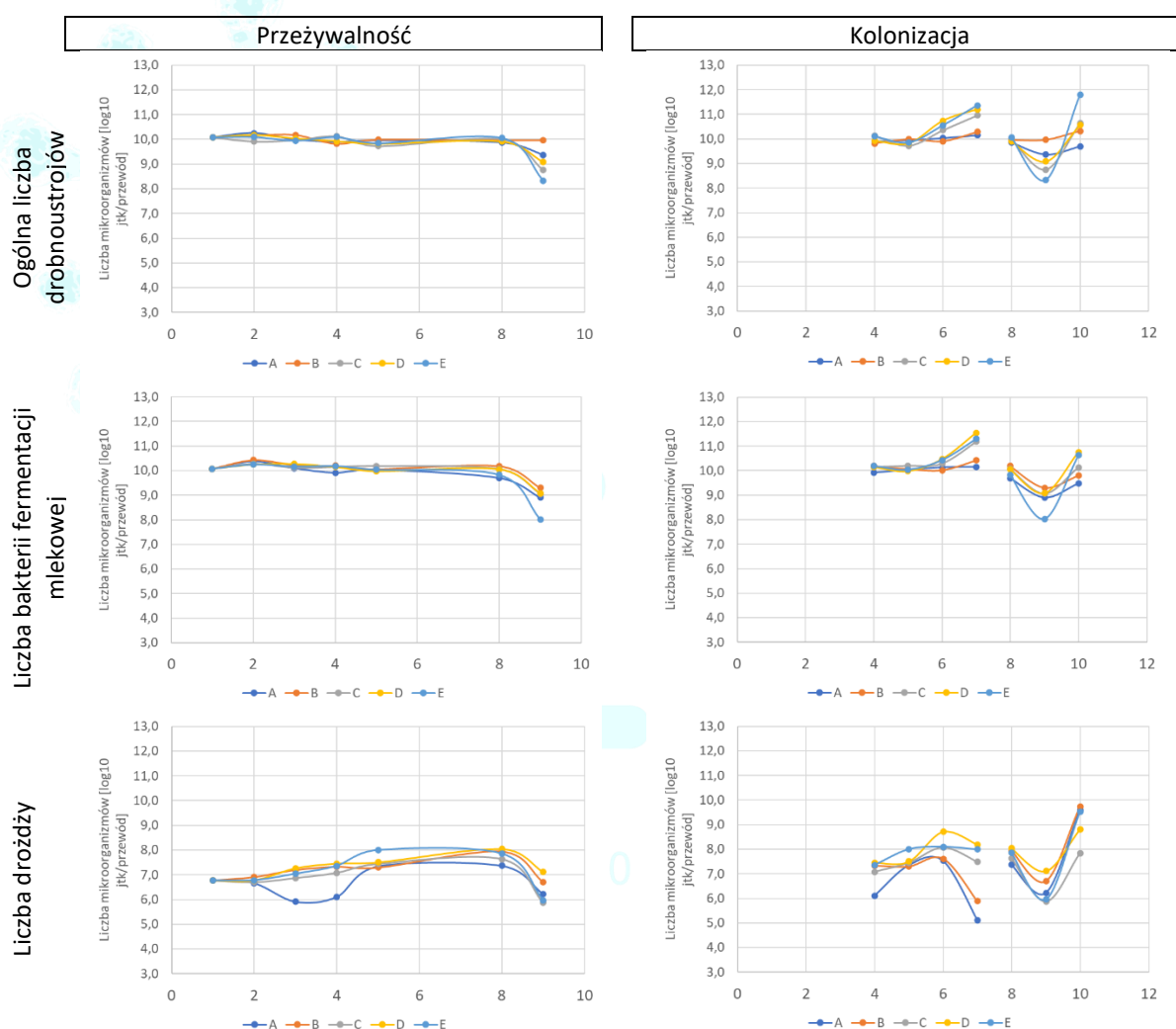
Potwierdzono wymaganą jakość suplementu diety (wysoka liczebność bakterii fermentacji mlekowej i ich dominujący udział w ogólnej liczbie drobnoustrojów) (Tab. 2). Na podstawie braku mikroorganizmów w pozostałych produktach spożywczych potwierdzono ich przydatność do zastosowania w eksperymencie monitorowanym i interpretowanym na podstawie zmian w liczbie bakterii fermentacji mlekowej, ogólnej liczbie drobnoustrojów, liczbie drożdży (Tab. 3).

Przeżywalność w trakcie pasażu i kolonizacja

Mikroorganizmy probiotyczne zawarte w preparacie Ekosynbiotytk poddano badaniom oceniającym:

1. Ich przeżywalność w trakcie trwania fizjologicznie przebiegającego procesu trawienia (z uwzględnieniem oddziaływania enzymów trawiennych, zmiennego pH i składu środowiska, w tym zawartość soli żółci, z uwzględnieniem wpływu różnej matrycy pokarmowej oraz różnego stanu przewod pokarmowego („na czczo” vs „po posiłku”);
2. Ich potencjalnej zdolności do kolonizowania przewod pokarmowego na odcinkach szczególnie istotnej dla zachodzenia interakcji między probiotykiem a organizmem gospodarza (jelito cienkie i jelito grube).

Tabela 4.: Przeżywalność mikroorganizmów zawartych w preparacie Ekosynbiotyki w warunkach przewodu trawienia w symulowanym *in vitro* ludzkim przewodzie pokarmowym oraz zmiany liczebności mikroorganizmów w czasie przedłużonej inkubacji – ocena zdolności do kolonizacji jelita cienkiego i jelita grubego. Oznaczenia: A – przewód pokarmowy „na czczo”, B – przewód pokarmowy „po posiłku” (tylko woda), C – przewód pokarmowy „po posiłku” (mleko jako pokarm), D – przewód pokarmowy „po posiłku” (owsianka z owocami jako pokarm), E – przewód pokarmowy „po posiłku” (sok owocowy jako pokarm); na osiach poziomych 1 – jama ustna, 2 – żołądek, początek trawienia, 3 – żołądek, po trawieniu (2h), 4 – jelito cienkie, początek trawienia, 5 – jelito cienkie, po trawieniu (2h), 6 – jelito cienkie, przedłużona inkubacja (24h), 7 – jelito cienkie, przedłużona inkubacja (72h), 8 – jelito grube początek trawienia, 9 – jelito grube, po trawieniu (18h), 10 – jelito grube, przedłużona inkubacja (72h).

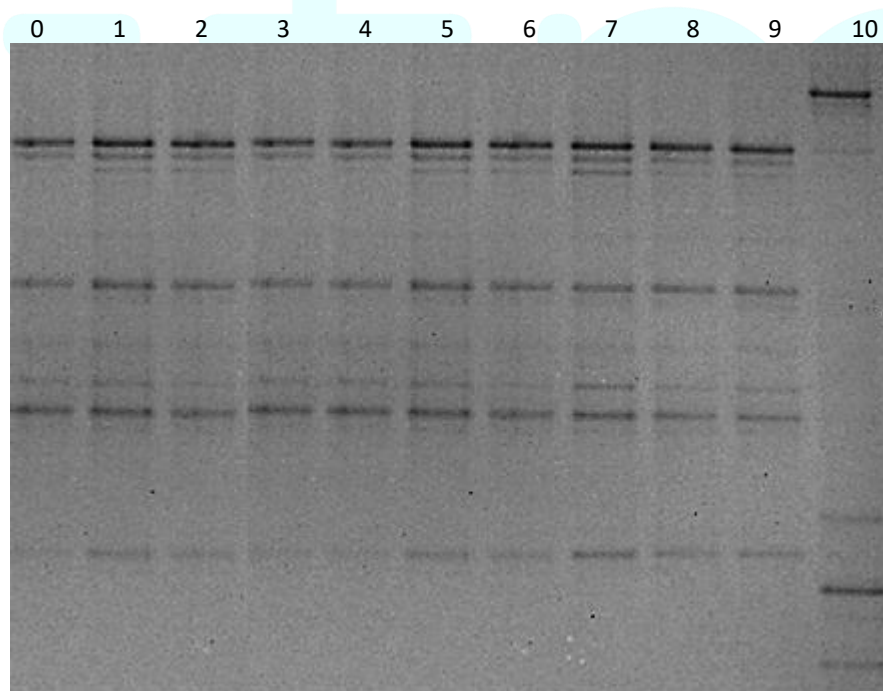


W trakcie oceny przeżywalności (Tab. 4) zaobserwowano umiarkowany spadek liczebności mikroorganizmów zawartych w preparacie Ekosynbiotyki na etapie trawienia w żołądku (dotyczy bakterii fermentacji mlekowej) lub znaczny spadek liczby drożdży na tym samym odcinku (dotyczy analizy w przewodzie pokarmowym „na czczo”) lub wzrost liczby drożdży (dotyczy analizy w przewodach pokarmowych „po posiłku”). Po przejściu treści pokarmowej w każdym wariancie analizy (na czczo i po posiłku) liczebność bakterii fermentacji mlekowej wracała do początkowego poziomu, a

liczebność drożdży utrzymywała się. Dopiero po 18 godzinach trawienia w jelicie grubym zaobserwowano spadek liczebności w obrębie każdej grupy mikroorganizmów; należy to tłumaczyć wyzeraniem łatwo dostępnych źródeł pokarmu w układzie doświadczalnym.

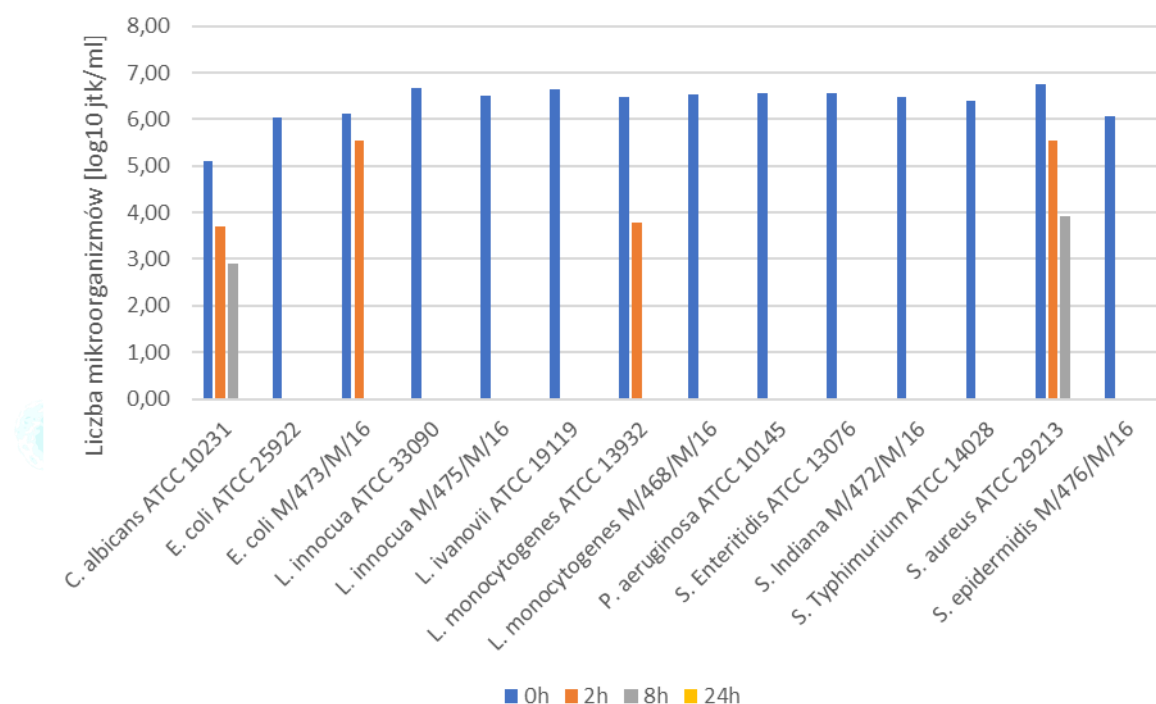
Ocena zdolności do kolonizacji została przeprowadzona w sposób pośredni na podstawie oceny zmian liczebności grup mikroorganizmów w trakcie przedłużonej inkubacji doświadczenia w warunkach jelita cienkiego oraz jelita grubego (Tab. 4). Kolonizacja jelita cienkiego przez probiotyki zawarte w preparacie Ekosynbiotyk jest prawdopodobna; liczebność bakterii fermentacji mlekowej nie spada (warianty „na czczo” lub „po posiłku” z samą wodą) lub zwielokrotnia się (warianty z pokarmem mlecznym, owocowo-zbożowym, owocowym); podobne obserwacje dotyczą liczby drożdży. Kolonizacja jelita grubego jest również prawdopodobna jednak osiągana jest przez wybrane szczepy z konsorcjum (Fot. 1), które przetrwały okres adaptacji do warunków panujących w trakcie eksperymentu prowadzonego wg zastosowanej metodyki.

Fot. 1. Badanie molekularne (PCR-DGGE) składu konsorcjum mikroorganizmów zawartych lub pochodzących z preparatu Ekosynbiotyk oraz zmiany w składzie na kolejnych etapach trawienia w przewodzie pokarmowym w warunkach symulowanych *in vitro*. Oznaczenia: 0 – skład konsorcjum mikroorganizmów w preparacie Ekosynbiotyk, 1 – jama ustna, 2 – żołądek, początek trawienia, 3 – żołądek, po trawieniu (2h), 4 – jelito cienkie, początek trawienia, 5 – jelito cienkie, po trawieniu (2h), 6 – jelito cienkie, przedłużona inkubacja (24h), 7 – jelito cienkie, przedłużona inkubacja (72h), 8 – jelito grube początek trawienia, 9 – jelito grube, po trawieniu (18h), 10 – jelito grube, przedłużona inkubacja (72h).



Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Tabela 5.: Aktywność przeciwdrobnoustrojowa preparatu Ekosynbiotyki wobec szczepów niepożądanych



Aktywność przeciwdrobnoustrojową oceniono wobec szerokiego zakresu szczepów niepożądanych i patogennych. Wyniki badania wskazują na wysoką aktywność mikroorganizmów zawartych w preparacie Ekosynbiotyki wobec wszystkich zastosowanych patogenów (Tab. 5). Aktywność wobec większości umożliwia osiągnięcie efektu bójkowego wobec patogenów już po dwóch godzinach od kontaktu probiotyków z patogenem, co ma duże znaczenie dla szybkiego zwalczania zakażeń. W 8-iej godzinie trwania eksperymentu obecne są tylko *S. aureus* ATCC 29213 i *C. albicans* ATCC 10231 spośród wszystkich 15 szczepów patogennych. Po 24-ech godzinach nie wykryto żadnych żywych komórek mikroorganizmów patogennych.

INSTYTUT TECHNOLOGII
MIKROBIOLOGICZNYCH

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań i obserwacji zmian liczebności analizowanych mikroorganizmów w symulowanych *in vitro* warunkach, panujących w trakcie trwania w przewodzie pokarmowym człowieka, można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Przeżywalność mikroorganizmów probiotycznych zawartych w preparacie Ekosynbiotytek jest wysoka na każdym etapie trwania procesu trawienia.
2. W zastosowanych warunkach trawienia mikroorganizmy probiotyczne zawarte w preparacie Ekosynbiotytek mają wysoki potencjał do kolonizacji jelita cienkiego z jednoczesnym zachowaniem składu konsorcjum minimum do 72 godzin od podania.
3. W zastosowanych warunkach trawienia możliwe jest doprowadzenie do licznej kolonizacji jelita grubego przez zaadaptowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej wprowadzone w preparacie Ekosynbiotytek.
4. Preparat Ekosynbiotytek ma wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec mikroorganizmów patogennych. Aktywność ta ma przebieg dynamiczny, doprowadzając do szybkiego wykluczenia obecności analizowanych patogenów.

Aleksandra Jafra
Specjalista mikrobiolog

(Sporządziła)

Michał Świątek
Kierownik Laboratorium Mikrobiologii

(Autoryzował)

ITM
INSTYTUT TECHNOLOGII
MIKROBIOLOGICZNYCH

1. Przedstawione wyniki odnoszą się wyłącznie do próbek badanych.
2. W przypadku gdy próbka dostarczona jest przez zleceniodawcę, laboratorium nie ponosi odpowiedzialności za pobieranie próbek, a wyniki badań odnoszą się do otrzymanej próbki.
3. Zleceniodawcy przysługuje prawo złożenia skargi/reklamacji. Na życzenie klienta Laboratorium udostępnia procedurę wewnętrzną postępowania w przypadku zgłoszenia skargi/reklamacji.
4. Sprawozdanie z badań bez pisemnej zgody Instytutu Technologii Mikrobiologicznych nie może być powielane inaczej, jak tylko w całości.

Instytut Technologii Mikrobiologicznych
al. NSZZ Solidarność 9, 62-700 Turek, +48 571 204 022

Stowarzyszenie Ekosystem-Dziedzictwo Natury
ul. Erazma Ciołka 15, lok. 203, 01-445 Warszawa

Bibliografia

1. [FAO/WHO] Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 2002, 1-11
2. DE CARVALHO, Katia Gianni, et al. Evaluation of the role of environmental factors in the human gastrointestinal tract on the behaviour of probiotic cultures of *Lactobacillus casei* Shirota and
3. *Lactobacillus casei* LC01 by the use of a semi-dynamic in vitro model. *Annals of microbiology*, 2009, 59.3: 439-445.
4. KONG, Chunli, et al. Human Milk Oligosaccharides Mediate the Crosstalk Between Intestinal Epithelial Caco-2 Cells and *Lactobacillus Plantarum* WCFS1 in an In Vitro Model with Intestinal Peristaltic Shear Force. *The Journal of nutrition*, 2020, 150.8: 2077-2088.
5. RODES, Laetitia, et al. Transit time affects the community stability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in an in vitro model of human colonic microbiota. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 2011, 39.6: 351-356.
6. Joanna Kobus-Cisowska i wsp.: „Enriching novel dark chocolate with *Bacillus coagulans* as a way to provide beneficial nutrients”
7. Dorota Zaręba I wsp.: „Przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej w warunkach modelowych jelita cienkiego” *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, 5 (60), 197 – 205
8. Elżbieta Klewicka „Ocena przeżywalności bakterii *Lactobacillus* zawartych w preparacie probiotycznym podczas pasażu w symulowanym układzie pokarmowym” *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, 6 (97), 170 – 181
9. SUTTON, Scott VW; PORTER, David. Development of the antimicrobial effectiveness test as USP chapter < 51>. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2002, 56.6: 300-311.

