

Ugotavljanje deklariranih bakterij v probiotičnih prehranskih dopolnilih in zdravilih na slovenskem trgu

Determination of labeled bacteria in probiotic food supplements and medicinal products (OTC) on Slovenian market

Bojana Bogovič Matijašič, Metoda Zorič Peternel, Irena Rogelj

Povzetek: Na slovenskem trgu se število probiotičnih prehranskih dopolnil oziroma zdravil hitro povečuje. Pomemben kriterij kakovosti teh izdelkov je število živih probiotičnih mikroorganizmov, ki zagotavljajo njihovo učinkovitost. Proizvajalci, distributerji ali prodajalci se redko odločajo za preiskave probiotičnih izdelkov v neodvisnih laboratorijih, saj slovenska zakonodaja ne predpisuje preverjanja njihove sestave pred prodajo. Namen raziskave je bil zato pregledati ustreznost probiotičnih prehranskih dopolnil ter probiotičnih zdravil (OTC), naprodaj v slovenskih lekarnah. Od 20 probiotičnih prehranskih dopolnil je le pet izdelkov vsebovalo dovolj živih mikroorganizmov glede na deklaracijo, pri dveh izdelkih pa število ni bilo deklarirano. V šestih izdelkih z metodo PCR nismo našli živih predstavnikov vseh navedenih vrst. Obe probiotični zdravili sta ustrezali tako po vrstni sestavi kot po številu probiotičnih bakterij. Rezultati kažejo na potrebo po boljši kontroli kakovosti tovrstnih izdelkov.

Ključne besede: probiotična prehranska dopolnila, probiotična zdravila, kakovost probiotičnih izdelkov, PCR

Abstract: There are an increasing number of probiotic food supplements or medicinal products on the Slovenian market. Probiotic microorganisms in these products have to be viable otherwise the effects may not be expected. Producers, distributors or sellers do not decide often for the analysis of probiotic products in independent laboratories since Slovenian legislation does not require control of their content before being sold. The aim of this study was to survey the suitability of probiotic food supplements and medicinal products (OTC) available in Slovenian pharmacies. Five food supplements out of 20 tested contained enough viable microorganisms while the number was not declared in two products. In six products the viable representatives of all declared species were not found by PCR method. Both probiotic medicinal products were suitable regarding the species composition and number of probiotic bacteria. Results indicate the need for better quality control of such products.

Key words: probiotic food supplements, probiotic medicinal products, quality of probiotic products, PCR

1 Uvod

Na trgu so probiotiki na voljo v obliki funkcionalnih živil, prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta. Med funkcionalnimi živili s probiotiki prevladujejo probiotični jogurti in mlečni napitki, sledijo jim siri in mlečni namazi s probiotiki, vse več pa je tudi živil rastlinskega izvora, namenjenih predvsem vegetarijancem. Prehranska dopolnila in zdravila pa vsebujejo liofilizirane probiotične mikroorganizme v obliki kapsul, tablet, pastil, peroralnih praškov in peroralnih kapljic. Prehranska dopolnila daleč prednjačijo pred zdravili, saj so regulatorne zahteve za prehranska dopolnila bistveno blažje od tistih za zdravila (1). Posebnost zdravil s probiotiki je, da lahko navajajo neposredne

učinke na bolezenska stanja, ki so dokazani, medtem ko pri hrani oz. prehranskih dopolnilih to ni dovoljeno, oziroma so trditve in navedbe lahko samo splošne (2, 3). Podobno velja tudi za oglaševanje.

Kljub temu da proizvajalci, dobavitelji ali uvozniki prehranskih dopolnil niso dolžni preverjati sestave izdelkov pred prodajo, pa se v zadnjem času vse pogosteje odločajo za preiskave v neodvisnih laboratorijih, saj se zavedajo, da s tem pridobijo večje zaupanje kupcev. Ker je zanesljivo potrjevanje probiotičnih mikroorganizmov mogoče samo s kombinacijo klasičnih in sodobnih, nekoliko zahtevnejših mikrobioloških metod, ki se še razvijajo, v EU zaenkrat še ne obstajajo standardne

metode za preiskave probiotičnih izdelkov, prvi laboratoriji za tovrstne analize pa so šele v postopkih akreditacije.

Leta 2006 so bili prvič objavljeni podatki o ustreznosti probiotičnih izdelkov, naprodaj v Sloveniji (4). Avtorici sta v raziskavo zajeli 6 prehranskih dopolnil v obliki kapsul, tablet ali praška, enega probiotičnega zdravila brez recepta (OTC) ter 11 probiotičnih mlečnih izdelkov. Pokazalo se je, da je označevanje teh izdelkov pogosto pomanjkljivo ali neustrezno glede števila živih probiotičnih bakterij in navedenih vrst.

V raziskavi, katere rezultati so predstavljeni v tem delu, pa smo pregledali 20 probiotičnih prehranskih dopolnil ter dve probiotični

zdravili (OTC) s polic slovenskih lekarn, kupljenih v letu 2009. Ker s konvencionalnimi gojitvenimi metodami lahko ugotovljamo le določene skupine oziroma rodove probiotičnih bakterij v izdelku, ne moremo pa potrditi prisotnosti posameznih navedenih vrst, smo uporabili tudi molekularno biološke metode.

2 Materiali in metode

2.1 Probiotični izdelki

Probiotične izdelke smo kupili v lekarnah v Sloveniji. Hranili smo jih pri sobni temperaturi do analize, izvedene pred iztekom roka uporabnosti.

2.2 Bakterijski sevi in pogoji kultivacije

Imena in izvor bakterijskih sevov, ki smo jih uporabili kot referenčne seve v reakcijah PCR, so navedeni v Preglednici 1. Omenjene seve smo oživili iz zamrznjenih kultur, ki jih hranimo v mikrobnih zbirkah na Katedri za mlekarstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani, z dvakratnim precepljanjem v gojišče MRS (Merck). *Str. thermophilus* smo inkubirali pri 42 °C v aerobnih razmerah, vse ostale pa pri 37 °C. Bifidobakterije smo tako v tekočem kot v trdnem gojišču inkubirali v anaerobnih razmerah, ki smo jih zagotovili z uporabo sistema Genbox (Bio-Merieux). Laktobacile v trdnem gojišču smo inkubirali v anaerobnih razmerah, v tekočem gojišču pa v aerobnih. Bifidobakterije smo gojili v tekočem gojišču MRS (Merck) z dodanim cistein hidrokloridom (Merck) v koncentraciji 0,05 % (w/v), laktobacile pa v običajnem gojišču MRS.

2.3 Ugotavljanje števila mikroorganizmov z metodo štetja na ploščah

Število mikroorganizmov posameznih skupin, rodov oziroma vrst smo ugotavljali z nacepljanjem vzorcev na standardna selektivna gojišča (Preglednica 2). Uporabili smo hranljive podloge proizvajalca Merck. Anaerobne pogoje inkubacije smo zagotovili s sistemom GenBox (Bio-Mérieux). Analizirali smo po 1 g vzorca oziroma 1 ml izdelka v obliki suspenzije ali 5 kapljic izdelka v kapalni steklenički. Za razredčevanje smo uporabljali 1/4 Ringerjevo raztopino, ki smo ji dodali 0,05 % L-cistein hidroklorida. Po končani inkubaciji smo prešteli izrasle kolonije

Preglednica 1: Vrste in izvor referenčnih bakterijskih sevov.

Table 1: Species and source of reference bacterial strains.

Bakterija	Izvor
<i>Bif. animalis ssp. lactis</i>	LMG 8314
<i>Bif. bifidum</i>	ATCC 29521
<i>Bif. infantis</i>	FAM 14390
<i>Bif. longum</i>	ATCC 15708
<i>Ec. faecium</i>	ATCC 6057
<i>Lb. acidophilus</i>	ATCC 4356
<i>Lb. bulgaricus</i>	ATCC 11842
<i>Lb. casei</i>	ATCC 393
<i>Lb. paracasei</i>	DSM 5622
<i>Lb. gasseri</i>	ATCC 20243
<i>Lb. plantarum</i>	ATCC 8014
<i>Lb. reuteri</i>	ATCC 55730
<i>Lb. rhamnosus</i>	ATCC 53103
<i>Lb. salivarius</i>	LMG 9477
<i>Lc. lactis</i>	LMG 7930
<i>Str. thermophilus</i>	CCM 7711

ATCC, American Type Culture Collection

FAM, Swiss Federal Research Station for Animal Production and Dairy Products, Bern, Švica

LMG, Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Gent, Belgija

DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Nemčija

CCM, Czech Collection of Microorganisms, Brno, Češka Republika

Preglednica 2: Gojišča in pogoji gojenja mikroorganizmov.

Table 2: Media and cultivation conditions for microorganisms.

Vrsta mikroorganizma	Gojišče	Pogoji gojenja
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS+cli ^a +ciproflox ^b , pH=6,8	37 °C, anaer., 3 dni
<i>Lactobacillus gasseri</i>		
Skupni laktobacili	Rogosa	37 °C, anaer., 3 dni
Mezofilni laktobacili	Rogosa	30 °C, anaer., 3 dni
<i>Bifidobacterium</i>	MRS+0,05% cistein+mup ^c , pH=6,8	37 °C, anaer., 3 dni
<i>Streptococcus thermophilus</i>	M17	42 °C, aer., 3 dni
<i>Lactococcus</i>	M17	30 °C, aer., 3 dni
Plesni in kvasovke	YGC	24 °C, aer., 3-5 dni
<i>Enterococcus</i>	CATC	37 °C, aer., 3 dni
<i>Bacillus</i>	BHI	37 °C, aer., 2 dni

cli^a – clindamycin (Sigma), koncentracija v gojišču 0,1 µg/ml

ciproflox^b – ciprofloxacin (Fluka), koncentracija v gojišču 10 µg/ml

mup^c – mupirocin (AppliChem), koncentracija v gojišču 50 µg/ml

s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO Ljubljana). Število kolonijskih enot (KE) mikroorganizmov v enoti probiotičnega izdelka smo izračunali po naslednji formuli (5):

$$KE = n / ((f_a - 1 + f_b - 0,1) \cdot d)$$

Legenda:

n ... vsota kolonij izraslih na ploščah

f_a ... število plošč, uporabljenih v prvi razredčitvi

f_b ... število plošč, uporabljenih v drugi razredčitvi

d ... recipročni razredčitveni faktor najnižje razredčitve

2.4 Ugotavljanje prisotnosti deklariranih vrst iz rodov *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* in *Bifidobacterium* v izdelkih

DNA smo iz referenčnih sevov (Preglednica 1) osamili s komercialnim kitom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), po navodilih proizvajalca. Modificirali smo le liziranje bakterijskih celic na začetku protokola, ki je potekalo 45 minut pri 37 °C, s pomočjo lizocima (Sigma, 10 mg/ml) in mutanolizina (Sigma, 25 U/ml). Na podoben način smo izolirali tudi skupno DNA iz mešanice kolonij, zraslih po nacepljanju izdelkov na posamezna gojišča (Preglednica 2): M17 za laktokoke, Rogosa za laktobacile, gojišče z mupirocinom za bifidobakterije ter CATC za enterokoke. Prisotnost posameznih vrst probiotičnih bakterij smo ugotavljali s pomočjo metode PCR (eng. polymerase chain reaction - verižna reakcija s polimerazo), pri čemer smo uporabili v literaturi opisane vrstno specifične začetne oligonukleotide in reakcijske pogoje: *Bifidobacterium* (*Bif.*) *bifidum*, *Bif. lactis*, *Bif. infantis* in *Bif. longum* (6); *Lactobacillus* (*Lb.*) *acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* in *Lb. rhamnosus* (7); *Lb. paracasei* (8); *Lb. salivarius* (9); *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (10); *Lactococcus lactis* (11); *Enterococcus faecium* (12) in *Streptococcus thermophilus* (13).

Velikost pomnožkov PCR smo ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo (2 % agaroz), pri čemer smo gele obarvali z barvilom SybrGreen I.

2.5 Identifikacija izolatov *Bacillus*

Za vrsto *Bacillus coagulans*, ki smo jo ugotovili v 4 izdelkih, ni na voljo dovolj specifičnih začetnih oligonukleotidov za PCR, zato smo to vrsto potrjevali na podlagi ugotavljanja nukleotidnega zaporedja dela gena za bakterijsko 16S rRNA. Genomsko DNA smo iz kulture izolatov *Bacillus*, zraslih na gojišču BHI, osamili s komercialnim kitom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), po navodilih proizvajalca. 660 bp dolgi odsek variabilne regije V1/V3 gena za 16S rDNA (685-705 pri *E. coli*) smo pomnožili s PCR z začetnimi oligonukleotidi P1 in P4, kakor so opisali Klijn in sod. (14). Nukleotidno zaporedje pomnožkov PCR, očiščenih s pomočjo komercialnega kompleta Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), so ugotavljali v laboratoriju Microsynth (Balgach, Švica). Nukleotidna zaporedja smo primerjali s tistimi, ki so shranjena v genski banki NCBI (National Center for Biotechnology Information, Rockville, Bethesda, ZDA), s pomočjo

programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), ki je dostopen na medmrežju (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3 Rezultati in razprava

Rezultati pregleda prehranskih dopolnil s polic slovenskih lekarn, kupljenih v letu 2009, so strnjeni v priloženi preglednici (Preglednica 3). Od skupaj 20 pregledanih, je pet izdelkov (25 %) vsebovalo število probiotičnih mikroorganizmov, skladno z deklaracijo, pri 12 izdelkih je bilo ugotovljeno število nižje od navedenega, pri dveh izdelkih pa število ni bilo navedeno. V enem izdelku nismo uspeli potrditi živih bakterij. Navajanje vrst je bilo z izjemo enega izdelka zadovoljivo, oznake sevov pa so prej izjema kot pravilo. Navedene vrste smo večinoma tudi potrdili, z izjemo izdelkov z velikim številom različnih bakterij (6-8), pri katerih v nobenem primeru med živimi bakterijami nismo našli prav vseh navedenih vrst. Pregledali smo tudi dve probiotični OTC zdravili, ki pa sta bili ustrezni tako po vrsti kot po številu probiotičnih bakterij.

Pri navajanju pričakovanih učinkov probiotikov sicer nismo naleteli na deklarativne nepravilnosti, saj je le pri obeh probiotičnih OTC zdravilih zapisano, da je izdelek namenjen zdravljenju, in sicer »preventivo in podporno zdravljenje pri driskah« medtem, ko na prehranskih dopolnilih ni direktnih »zdravstvenih trditev«. Navedbe na prehranskih dopolnilih namreč omenjajo **pomoč** pri vzpostavitvi porušene črevesne mikroflore, **blagodejno delovanje** na imunski sistem, **preventivno delovanje** pri dietah in nekaterih bolezenskih stanjih (driska odraslih in otrok, driska ob antibiotični terapiji, kronične vnetne bolezni črevesja, atopijski dermatitis, različne alergije in kronična zaprtja), **prispevek** k dobri presnovi nujno potrebnih hranilnih snovi ali **boljše počutje** oseb v zrelih letih. Opozoriti pa je potrebno, da takšne navedbe potrošnika zlahka zavedejo, saj hitro spregleda malenkostne dodatke, kot so »pomoč, blagodejno, preventivno, prispevek ali boljše počutje« in ga pritegne bolj atraktivna paleta bolezenskih stanj, običajno navedena v oklepajih.

Na pomanjkljivosti probiotičnih izdelkov, predvsem prehranskih dopolnil s probiotiki, raziskovalci opozarjajo že vrsto let (15, 16, 17, 18, 19). Tudi raziskava izpred petih let o probiotičnih izdelkih na slovenskem trgu je potrdila neprimernost nekaterih izdelkov. Najpogostejše pomanjkljivosti so bile odsotnost živih predstavnikov deklariranih vrst, premajhno število živih bakterij in nepravilno poimenovanje probiotičnih bakterij (4). Od šestih prehranskih dopolnil je samo eno (~ 16,7 %) popolnoma odgovarjalo navedbam o sestavi in številu mikroorganizmov, kar je še nekoliko manj, kot v predstavljeni raziskavi. Žive bifidobakterije smo na primer dokazali le v dveh izdelkih, čeprav so bile deklarirane kar v petih, vrste *Lb. acidophilus* pa celo v nobenem od štirih, ki bi jo morale vsebovati. Pri treh izdelkih števila mikroorganizmov sploh ni bilo navedenega, dva izdelka pa sta jih vsebovala premalo. Probiotični jogurti in mlečni napitki so se takrat odrezali veliko bolje kot prehranska dopolnila. Po sestavi so večinoma ustrezali, le pri bifidobakterijah je bilo nekaj pomanjkljivosti pri navedbi vrst. Od 11 omenjenih izdelkov jih je pet vsebovalo več kot 10⁷ KE/ml vse do konca uporabnosti, ostali pa vsaj 10⁶ KE/ml (4). S 100 g izdelka z 10⁷ KE/ml zaužijemo 10⁹ živih probiotičnih bakterij – kar je povprečno število probiotikov v odmerku prehranskega dopolnila.

Preglednica 3: Ustreznost 20 probiotičnih prehranskih dopolnil in 2 probiotičnih zdravil, kupljenih v slovenskih lekarnah v letu 2009, glede prisotnosti deklariranih vrst mikroorganizmov in njihovega števila.

Table 3: Suitability of 20 probiotic food supplements and 2 probiotic medicinal products (OTC) obtained in Slovenian pharmacies in 2009 regarding the presence of labeled species of microorganisms and their number.

DEKLARIRANI PROBIOTIKI	DEKLARIRANO ŠTEVILO	UGOTOVLJENO ŠTEVILO	USTREZNOST
PROBIOTIČNA PREHRANSKA DOPOLNILA			
<i>Lb. acidophilus</i>	✓ Skupno: 10^{11} KE /stekleničko	Skupno: $1,8 \times 10^9$ KE/stekleničko-	ne ustreza prenizko število
<i>Lb. paracasei</i>	✓ <i>Bif. lactis</i> : 24×10^9 KE/stekleničko	<i>Bif. lactis</i> : $1,8 \times 10^9$ KE/stekleničko	
<i>Lb. plantarum</i>	✓ <i>Lb. acidophilus</i> : $6,4 \times 10^9$ KE/stekleničko	<i>Lb. acidophilus</i> : $1,2 \times 10^7$ KE/stekleničko	
<i>Bif. lactis</i>	✓ <i>Lb. plantarum</i> : 28×10^9 KE/stekleničko <i>Lb. paracasei</i> : $0,32 \times 10^9$ KE/stekleničko	<i>Lb. plantarum</i> + <i>Lb. paracasei</i> : $2,2 \times 10^7$ KE/stekleničko	
<i>Lb. gasseri</i>	✓ 10^7 KE/tableto	$1,5 \times 10^7$ KE/tableto	ustreza
<i>Bif. bifidum</i>	✓		
<i>Bif. longum</i>	✓		
<i>Lb. reuteri</i>	✓ 10^8 KE/tableto	$1,4 \times 10^7$ KE/tableto	ne ustreza prenizko število
Protectis			
<i>Lb. acidophilus</i>	7,5 $\times 10^8$ KE/kapsulo	$1,2 \times 10^7$ KE/kapsulo	ne ustreza prenizko število nepravilno ime v deklaraciji (<i>Lb. sporogenes</i>) odsotnost KE treh vrst
<i>Lb. bulgaricus</i>			
<i>Lb. sporogenes</i> (neobstoječa vrsta)			
= <i>Bacillus coagulans</i>			
<i>Streptococcus thermophilus</i>	✓		ne ustreza prenizko število odsotnost KE dveh vrst
<i>Bif. bifidum</i>	✓		
<i>Lb. acidophilus</i>	✓ $1,5 \times 10^9$ KE/vrečko	$4,8 \times 10^8$ KE/vrečko	
<i>Lb. bulgaricus</i>			
<i>Lb. sporogenes</i> (neobstoječa vrsta)=			
<i>Bacillus coagulans</i>	✓		
<i>Streptococcus thermophilus</i>	✓		ne ustreza prenizko število
<i>Bif. bifidum</i>			
<i>Lb. plantarum</i>	✓ 10^{10} KE/kapsulo	$3,8 \times 10^9$ KE/kapsulo	ne ustreza prenizko število
<i>Lb. gasseri</i>	✓ 10^7 KE/tableto	$4,3 \times 10^6$ KE/tableto	
<i>Bif. bifidum</i>	✓		
<i>Bif. longum</i>	✓		ne ustreza prenizko število
<i>Lb. reuteri</i>	10^8 KE/5 kapljic	$2,4 \times 10^7$ KE/5 kapljic	
Protectis			ne ustreza prenizko število delno ustreza skupno število je ustrezno odsotnost KE dveh vrst
<i>Bif. bifidum</i>	✓ 5×10^9 KE/vrečko	$1,1 \times 10^{10}$ KE/vrečko	
<i>Lb. acidophilus</i>	✓		
<i>Lb. casei</i>			
<i>Lb. plantarum</i>	✓		
<i>Lb. rhamnosus</i>			
<i>Lb. salivarius</i>	✓		
<i>Lactococcus lactis</i>	✓		
<i>Bif. bifidum</i>	5×10^9 KE/vrečko	$1,4 \times 10^{10}$ KE/vrečko	delno ustreza skupno število je ustrezno odsotnost KE dveh vrst
<i>Bif. lactis</i>			
<i>Lb. acidophilus</i> (2 $\times$)			
<i>Lb. paracasei</i>			
<i>Lb. plantarum</i>			
<i>Lb. rhamnosus</i>			
<i>Lb. salivarius</i>			
<i>Enterococcus faecium</i>			

Ugotavljanje deklariranih bakterij v probiotičnih prehranskih dopolnilih in zdravilih na slovenskem trgu

DEKLARIRANI PROBIOTIKI		DEKLARIRANO ŠTEVILO	UGOTOVLJENO ŠTEVILO	USTREZNOST
PROBIOTIČNA PREHRANSKA DOPOLNILA				
Lb. casei		4×10 ⁹ KE/vrečko	1,3×10 ¹⁰ KE/vrečko	delno ustreza skupno število je ustrezno odsotnost KE dveh vrst
Lb. rhamnosus				
Lb. plantarum	✓			
Bif. bifidum	✓			
Bif. lactis	✓			
Bif. longum	✓			
Lb. bulgaricus (2 seva)		1×10 ¹⁰ KE/ kapsulo	2×10 ⁸ KE/ kapsulo	ne ustreza prenizko število
Lb. gasseri				
Streptococcus thermophilus				
Bacillus coagulans	✓	2×10 ⁹ spor B. coagulans/stekleničko	2,9×10 ⁶ spor B. coagulans/stekleničko	ne ustreza prenizko število
Bacillus coagulans	✓	2×10 ⁹ spor B. coagulans/kapsulo	1,2×10 ⁷ spor B. coagulans/kapsulo	ne ustreza prenizko število
Lb. acidophilus La-14	✓	2,6×10 ¹⁰ KE/kapsulo	6,2×10 ¹⁰ KE/kapsulo	ustreza
Lb. paracasei Lpc-37	✓			
Lb. plantarum Lp-115	✓			
Bif. lactis BI-14	✓			
Lb. acidophilus DDS-1	✓	7,2×10 ⁹ KE/kapsulo	1,0×10 ⁹ KE/kapsulo	ne ustreza prenizko število
Lb. bulgaricus DDS-14	✓			
Bif. bifidum				
Lb. acidophilus	✓	4×10 ⁹ KE/kapsulo	3,5×10 ⁸ KE/kapsulo	ne ustreza prenizko število odsotnost KE dveh vrst
Lb .bulgaricus	✓			
Lb. paracasei	✓			
Bif. bifidum				
Bif. longum				
Str. thermophilus	✓			
»acidophilus«		Ni navedeno	1,0×10 ³ KE kvasovk/ml suspenzije	ne ustreza deklaracija ne navaja števila imena so nepopolna
»bifidus«			1,1×10 ⁷ KE bakterij/ ml suspenzije	
»saccharomyces«				
Lb. gasseri PA 16/8	✓	Ni navedeno	7,1×10 ⁶ KE/tableto	ne ustreza deklaracija ne navaja števila
Bif. bifidum MF 20/5	✓			
Bif. longum SP 07/3	✓			
Lb. rhamnosus		2×10 ¹⁰ KE laktobacilov/stekleničko	Nismo ugotovili živih bakterij	ne ustreza število živih bakterij pod mejo detekcije
Lb. acidophilus				
Lb. bulgaricus				
Bif. bifidum				
Str. thermophilus				
PROBIOTIČNI ZDRAVILI				
Lb. gasseri	✓	1,2×10 ⁷ KE/kapsulo	5,8×10 ⁷ KE/kapsulo	ustreza
Bif. infantis	✓			
Enterococcus faecium	✓			
Lb. acidophilus	✓	10 ⁹ KE/kapsulo	3,5×10 ⁹ KE/kapsulo	ustreza
Bif. animalis ssp. lactis	✓	10 ⁹ KE/kapsulo	3,7×10 ⁹ KE/kapsulo	



Slika 1: Reprezentativna slika agaroznega gela (2 % w/vol agaroze) po elektroforezi vzorcev DNA, osamljene iz kultivabilne populacije probiotikov iz različnih probiotičnih izdelkov, ter pomnožene v reakciji verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR), specifični za posamezne bakterijske vrste: *Bif. lactis* (proge 2-4, 680 bp), *Bif. bifidum* (proge 6-8, 278 bp), *Bif. longum* (proge 12-14, 831 bp) in *Bif. infantis* (proge 15-18, 828 bp).

Proge 1, 11 in 19, DNA velikostni standard 100 bp (Fermentas); Progi 10 in 20, DNA velikostni standard Ultra low range (Fermentas); proga 2, referenčni vzorec DNA za *Bif. lactis*; progi 3 in 4, DNA iz dveh izdelkov; proga 5, negativna kontrola; proge 6-8, DNA iz treh izdelkov; proga 9, negativna kontrola; progi 12 in 13, DNA iz dveh izdelkov; proga 14, negativna kontrola; proga 15, referenčni vzorec za *Bif. infantis*; proga 16, DNA iz izdelka; proga 17, DNA iz izdelka; proga 18, negativna kontrola.

Figure 1: Representative picture of agarose gel (2 % w/vol agarose) after electrophoresis of DNA samples isolated from the cultivable population of probiotics from different probiotic products and amplified in PCR specific for different bacterial species: *Bif. lactis* (lanes 2-4, 680 bp), *Bif. bifidum* (lanes 6-8, 278 bp), *Bif. longum* (lanes 12-14, 831 bp) and *Bif. infantis* (lanes 15-18, 828 bp). Lanes 1, 11 and 19, DNA ladder 100 bp (Fermentas); Lanes 10 and 20, DNA ladder Ultra low range (Fermentas); lane 2, reference DNA of *Bif. lactis*; lanes 3 and 4, DNA from two products; lane 5, negative control; lanes 6-8, DNA from three products; lane 9, negative control; lanes 12 and 13, DNA from two products; lane 14, negative control; lane 15, reference DNA of *Bif. infantis*; lane 16, DNA from a product; lane 17, DNA from a product; lane 18, negative control.

Velja pa omeniti, da mnogi menijo, da metoda štetja na ploščah, ki se tradicionalno uporablja za ugotavljanje kakovosti probiotičnih izdelkov, ni najprimernejša. Razen tega, da je selektivnost razpoložljivih gojišč nezadostna, kar lahko vodi v precenjeno število posameznih probiotičnih bakterij, je znano tudi, da sposobnosti razmnoževanja oz. kultivabilnosti probiotičnih bakterij v laboratorijskih pogojih ne moremo enačiti z živostjo in aktivnostjo. Lahtinen in sod. so na primer pokazali, da imajo tudi probiotične bakterije, ki niso sposobne zrasti na gojišču, nekatere lastnosti živih celic, kot so esterazna aktivnost, nepoškodovana citoplazma membrana in ohranjen pH gradient (20).

V zadnjem času se uveljavljajo tudi alternativne metode za ugotavljanje živosti, med katerimi je poleg tekočinske citometrije zelo obetavna tudi metoda PCR v realnem času, ki v kombinaciji s tretiranjem vzorcev s propidijevim monoazidom omogoča razlikovanje nepoškodovanih bakterij od mrtvih (21). V bližnji prihodnosti lahko zato pričakujemo nove in/ali izpopolnjene metode ter standarde, ki bodo omogočili zanesljivejšo in bolj striktno kontrolo probiotičnih izdelkov, kar bo v korist in zaščito tako potrošnika kot kakovostnih proizvajalcev.

4 Sklep

Na slovenskem trgu je trenutno naprodaj več probiotičnih prehranskih dopolnil, ki ne ustrezajo deklaracijam. Odstopanja so največja pri številu živih probiotičnih bakterij, v nekaterih izdelkih pa ni prisotnih živih predstavnikov vseh deklariranih vrst. Ugotovljeno stanje kaže na potrebo po boljši kontroli kakovosti tovrstnih izdelkov. Zagotavljanje

kakovosti otežuje tudi pomanjkanje ustreznih, standardiziranih metod za ugotavljanje števila živih probiotikov, ter akreditiranih laboratorijev. Kljub številnim pomanjkljivostim so zaenkrat še vedno najbolj razširjene kultivacijske metode. Kombinacija slednjih z molekularno biološkimi metodami omogoča preverjanje selektivnosti metode štetja na ploščah ter potrjevanje prisotnosti posameznih vrst v izdelkih.

5 Literatura

1. Tuš M, Mlinarič A. Prehranska dopolnila – zakonodaja, problematika, primeri. *Farm Vest*, 2007; 58:72-73.
2. Pravilnik o prehranskih dopolnilih (Uradni list RS, št. 82/03, 44/04, 72/05 in 22/07).
3. Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega Parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih.
4. Matijašič BB, Rogelj I. Demonstration of suitability of probiotic products. An emphasis on survey of commercial products obtained on Slovenian market. *Agro Food Ind Hi Tech*, 2006; 17(3): 38-40.
5. ISO 4833: Microbiology – General Guidance for the enumeration of micro-organisms – Colony count technique at 30 °C, 1991: 5.
6. Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. Distribution of Bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-target species-specific primers. *Appl Environ Microbiol*, 1999; 65: 4506–4512.
7. Walter J, Tannock GW, Tilsala - Timisjärvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatosava T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol*, 2000; 66: 297-303.

8. Ward LJH, Timmins MJ. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol, 1999; 29: 90-92.
9. Chagnaud P, Machinis K, Coutte LA, Marecat A, Mercenier A. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. J Microbiol Meth, 2001; 44: 139-148.
10. Torriani S, Zapparoli G, Dellaglio F. Use of PCR-Based Methods for Rapid Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Appl Environ Microbiol, 1999; 65(10): 4351-4356.
11. Deasy BM, Rea MC, Fitzgerald GF, Cogan TM, Beresford TP. Rapid PCR Based Method to Distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. Syst Appl Microbiol, 2000; 23: 510-522.
12. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant *Enterococci* by PCR. J Clin Microbiol, 1995; 33: 24-27.
13. Tilsala-Timisjärvi A, Alatossava T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. Int J Food Microbiol, 1997; 35: 49-56.
14. Klijn N, Weerkamp AH, De Vos WM. Identification of Mesophilic Lactic Acid Bacteria by Using Polymerase Chain Reaction-Amplified Variable Regions of 16S rRNA and Specific DNA Probes. Appl Environ Microbiol, 1991; 57(11): 3390-3393.
15. Hamilton-Miller JM, Shah TS, Winkler JT. Public health issues arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. Pub Health Nutr, 1999; 2: 223-229.
16. Temmerman R, Pot B, Huys G, Swings J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. Int J Food Microbiol, 2003; 81(1): 1-10.
17. Elliot E, Teversham K. An evaluation of nine probiotics available in South Africa, August 2003. S Afr Med J, 2004; 94(2): 121-4.
18. Huff BA. Caveat emptor. "Probiotics" might not be what they seem. Can Fam Physician, 2004; 50: 583-7.
19. Aureli P, Fiore A, Scalfaro C, Casale M, Franciosa G. National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. Int J Food Microbiol, 2010; 137(2-3): 265-273.
20. Lahtinen SJ, Ouwehand AC, Reinikainen JP, Korpela JM, Sandholm J, Salminen SJ. Intrinsic Properties of So-Called Dormant Probiotic Bacteria, Determined by Flow Cytometric Viability Assays. Appl Environ Microbiol, 2006; 72(7): 5132-5134.
21. Kramer M, Obermajer N, Bogovič Matijašić B, Rogelj I., Kmetec V. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. Appl Microbiol Biotechnol, 2009; 84(6): 1137-1147.