

Кинетични растежни параметри на щамове *Lactobacillus delbrueckii*, култивирани в присъствие на олигозахариди

Цветеслава Игнатова-Иванова, Радослав Иванов, Илия Илиев, Искра Иванова

Kinetic growth parameters of strains *Lactobacillus delbrueckii*, cultivated in presence of oligosaccharides : The ability of lactic acid bacteria (LAB) strains identified as *Lactobacillus delbrueckii*, isolated from home made dairy products was tested to utilize and grow on different carbohydrates – glucose, sucrose, maltose and raffinose and oligosaccharides – fructooligosaccharides, glucooligosaccharides and galactooligosaccharides. The results clearly demonstrated that the growth rates on different oligosaccharides showed very different preferences.

Ke words: *Lactobacillus delbrueckii*, fructooligosaccharides, glucooligosaccharides, galactooligosaccharides.

ВЪВЕДЕНИЕ

Известно е, че микробиологичната екологична система в организма, както на възрастни, така и на деца е много сложен комплекс, който включва разнообразни по количествен и качествен състав асоциации от микроорганизми (МО) и продукти от тяхната биохимична активност в съответните условия на средата, която те обитават [2]. Състоянието на динамично равновесие между полезните и вредни микроорганизми е известно като „еубиоза“ [1]. На Нобеловия лауреат за 1908г. Илья Мечников принадлежи откритието: „Голямото разнообразие от асоциирани МО, населяващи стомашно-чревния тракт на човека, до голяма степен се определя от духовното и физическото му здраве“. За борбата с дисбиозата руският учен предлага просто решение, а именно да се допълни числеността на полезните МО с помощта на млечно кисели продукти, в които количеството на *Bifidobacterium sp.* и *Lactobacillus sp.* е значително. Така идеите на Мечников са предопределили направление в борбата с дисбиоза за целия XIX век, а именно чрез използване на пробиотици и пребиотици. **Пребиотиците** са селективно ферментиращи се добавки, които позволяват и специфично променят състава и/или активността в стомашно-чревната микрофлора, като влияят положително на човешкото здраве [3,9]. **Пробиотиците** са живи МО, които ако се прилагат подходящо имат положителен здравен ефект върху хората [4,8]. **Симбиотиците** са смесени препарати от живи пробиотични МО и неразградими олигозахариди (ОЗ). Основните кандидати за пребиотици са фруктоолигозахариди (ФОЗ), глюкотолигозахариди (ГОЗ), галактоолигозахариди (ГалОЗ), мананолигозахариди, соеви ОЗ (рафиноза и стахиоза), инулин, лактулоза и др. [7].

Ако някои въглехидрати, като ОЗ се ферментират от специфични щамове бифидобактерии и лактобацили, то тогава диетите съдържащи така наречените прбиотични субстрати могат да селектират щамове пробиотични бактерии. Ако това се окаже вярно би променило изцяло историята на храненето и чревната микробиология на границата на двете столетия [5,6].

ИЗЛОЖЕНИЕ

Основната цел на настоящото изследване е да се проучи спецификата на усвояване на различни олигозахариди с пребиотично действие от щамове *L. delbrueckii*, изолирани от домашно приготвени млечнокисели продукти.

За осъществяването на тази цел са поставени следните задачи:

Изследвани са кинетичните параметри на растеж на щамовете в MRS.

Изследвани са кинетичните параметри на растеж на щамовете в MRS съдържаща различни въглехидрати и олигозахариди.

Построени са растежните криви на щамовете в хода на периодичното култивиране.

Материали и методи

Всички изследвания са извършени с щамове *L. delbrueckii*, любезно предоставени от колекцията на катедра "Обща и промишлена микробиология" при СУ "Св. Климент Охридски". Щамовете са изолирани от домашно приготвени млечни продукти и се съхраняват при -80°C в течна среда MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) (MRS broth Fluka 69966) допълнена с 25% глицерол, като криотектант.

Ферментационният експеримент е изпълнен в модифицирана MRS среда (mMRS). Оригиналната MRS среда съдържа 20,0 g/l глюкоза, като единствен енергиен източник, който в mMRS средата е заменен съответно със захароза (Merck), малтоза (D+ малтоза, Merck), рафиноза (D+ Raffinose, Fluka AG), глюкоолигозахарид (ГОЗ) (Bioecolia; Solabia, pantin Cedex, France), фруктоолигозахарид (ФОЗ) (Orafti, Belgium) и галактоолигозахарид (ГалОЗ) (Borculo Domo Ingredients, Borculo, The Netherlands) в концентрация 20,0 g/l. При всички случаи, енергийните източници бяха стерилизирани през мембранен филтър (Minisart[®], 0,20 μm), след което са добавени стерилно към стерилната mMRS среда.

Периодичното култивиране е осъществено в стерилни епруветки с 5ml mMRS хранителна среда, съдържаща като единствен енергиен източник 2% р-р на глюкоза, захароза, малтоза, рафиноза, ФОЗ, ГОЗ или ГалОЗ. Преди автоклавиране pH на средата е коригирано до 6,5. Всичките щамове са двукратно култивирани, анаеробно в термостат за 12 h при температура 37°C в съответната mMRS среда, съдържаща един от посочените енергийни източници. От тези двойно пресети култури са инокулирани в опитните епруветки по 100 μl в mMRS среда, съдържаща един от посочените енергийни източници.

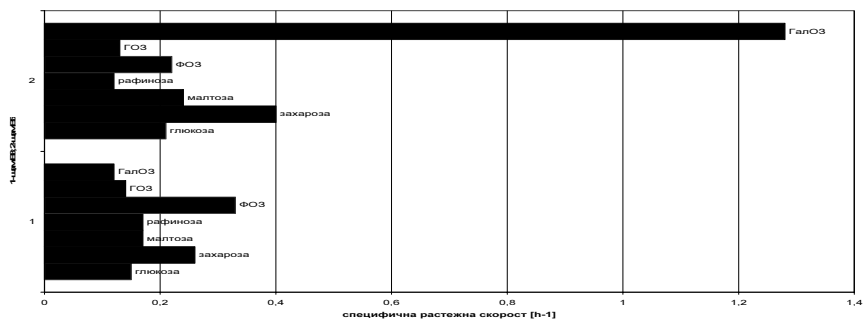
Всички опити в експеримента са проведени с трикратна повтораемост и обработени статистически чрез компютърна програма Excel XP –2000 и Programmable scientific calculation "CITIZEN" SRP-45N.

Анализ на микробния растеж.

В хода на периодичното култивиране на всеки 2 h е измервана оптичската плътност на бактериалната популация, на спектрофотометър (UV/VIS Shimadzu, Japan) при дължина на вълната 650 (OD 650) nm, срещу контрола от MRS и mMRS среда. След края на периодичното култивиране са изчислени растежните параметри и построени кривите на бактериален растеж отразяващи зависимостта между log от броя живи клетки и времето.

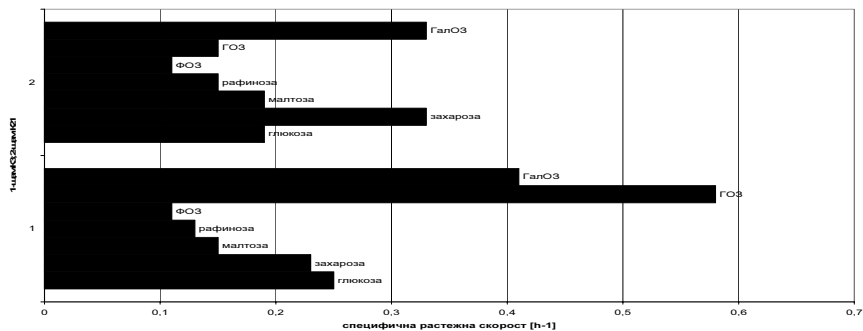
Селектираните щамове са означени така, че на щамове изолирани от краве кисело мляко съответства префикс "К", от овче кисело мляко префикс "О" и от биволско кисело мляко префикс "В".

Известно е, че всяка бактериална популация съдържа известен брой клетки, които не се делят, но присъстват в културалната среда те увеличават плътността на популацията. За да се проследи, какъв е реалният брой клетки, които се делят, т. е. изменението на биомасата за определено време много важен параметър е специфичната скорост на растеж μ , [h^{-1}]. На фиг.1 е показано промяната на μ на щамовете изолирани от различни екологични ниши (краве, овче и биволско мляко) способни да усвояват различните въглехидрати и олигозахариди използвани в експеримента в сравнение с монозахарида глюкоза.



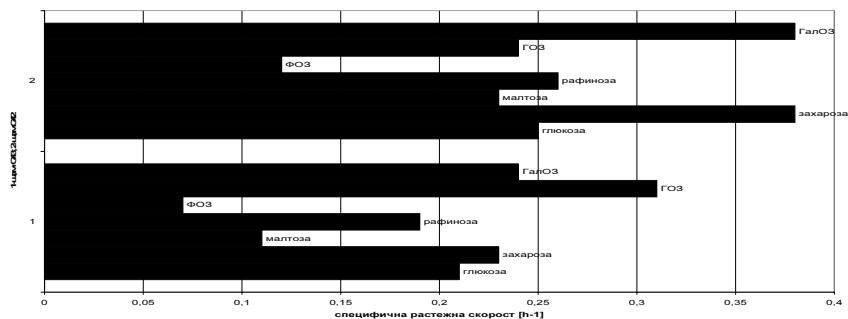
Фигура 1. Сравнение на стойностите на μ [h^{-1}] при култивиране на щамове изолирани от биволско кисело мляко на различни въглехидрати и олигозахариди

От данните на фигура 1 може да се каже, че щам В8 (точка 1) има най-висока стойност на специфичната скорост на растеж при култивиране на среда съдържаща ФОЗ – 0,33. При всички други случаи на култивиране стойността е около 0,15. Щам В5 (точка 2) има много висока специфичната скорост на растеж при култивиране върху ГалОЗ – 1,28. За сравнение при култивиране върху MRS-глюкоза стойността на μ е 0,21. Като цяло щамовете изолирани от биволско мляко усвояват най- добре ФОЗ в сравнение с щамовете от краве и овче мляко.



Фигура 2. Сравнение на стойностите на μ [h^{-1}] при култивиране на щамове изолирани от краве кисело мляко на различни въглехидрати и олигозахариди.

От данните на фигура 2 може да се каже, че щам К3 (точка 1) има най-висока стойност на μ -0,58 при култивиране на ГОЗ. Сравнително висока е и стойността при култивиране върху ГалОЗ – 0,40. Щам К21 (точка 2) има най-високи стойности на μ - 0,33 при култивиране върху ГалОЗ и дизахарида захароза. Като цяло щамовете изолирани от краве мляко усвояват най- добре ГОЗ в сравнение с щамовете от биволско и овче мляко.



Фигура 3. Сравнение на стойностите на μ [h⁻¹] при култивиране на щамове изолирани от овче кисело мляко на различни въглехидрати и олигозахариди

От данните на фигура 3 може да се каже, че и двата щам О43 и О42 имат сравнително високи стойности на μ при култивиране върху ГОЗ и ГалОЗ. ФОЗ се усвояват по-добре от щам О43, където стойността на специфичната скорост на растеж е по-висока. Тези два щама също усвояват добре и тризахарида рафиноза. Като цяло щамовете изолирани от овче мляко усвояват най-добре ГалОЗ и ГОЗ в сравнение с щамовете от краве и биволско мляко.

От получените резултати е ясно, че рафинозата се усвоява при всички изследвани щамове, но най-добре се усвоява от щамовете О43 и О42. Относително слабо се усвоява при щамовете от биволско мляко В8 и В5. По отношение на ФОЗ тяхното усвояване е сравнително слабо. Изключение правят само щамовете – В8, В5. ГОЗ се усвоява относително добре, като основните добри ферментатори са щамовете изолирани от краве мляко. ГалОЗ се хидролизират с относителна добра скорост, особено интерес в този случай представляват стойностите за специфичната скорост на растеж на щам В5.

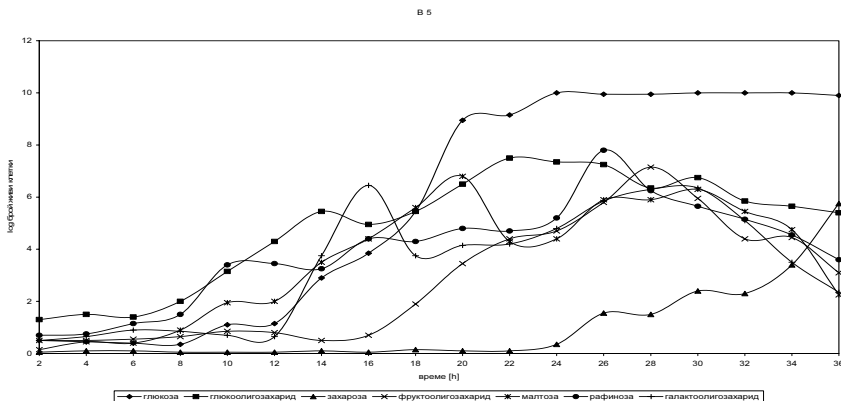
От казаното до тук може да се направи извод, че всички щамове проявяват щамова специфичност по отношение на способността им да растат и да се размножават върху рафиноза, ФОЗ, ГОЗ и ГалОЗ. Няма нито един от всички изследвани щамове, които еднакво да усвояват различните олигозахариди. Това допълнително засилва предположението за наличие на ензими с висока субстратна специфичност.

Поради спецификата на олигозахаридите, техните връзки и капацитета им като енергетически източници беше направен графичен израз на техния растеж.

Както е известно графичният израз на бактериалния растеж при периодично култивиране има S - образна форма и се нарича растежна крива, която отразява зависимостта между $\log$ от клетъчната биомаса и времето [h].

Графичният израз на бактериалния растеж на един от изследваните щамове е представен на Фигура 4.

На фиг. 4 са представени растежните криви на щам В5. Най-бързо расте щам В5 при усвояване на глюкоза следвана от рафиноза, ГОЗ, ФОЗ, малтоза, ГалОЗ и захароза. При всички случаи се наблюдава кратка lag фаза. Най-дълга lag фаза се наблюдава при култивиране върху захароза – до 12 h. Най-кратка е lag фаза при култивиране върху ГалОЗ – 2 h. Щам В5, като цяло дава най-висока биомаса върху всички използвани от нас въглехидрати и ОЗ. Като цяло този щам много добре усвоява всички въглехидрати и ОЗ с изключение на дизахаридът захароза.



Фигура 4. Растеж на щам В 5 при различни въглехидрати и олигозахари, изразен чрез зависимостта между log брой живи клетки и времето[h].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От проведените от нас изследвания може да се каже, че някои от изследваните щамове много добре растат върху съответните олигозахариди, но имат ниска плътност, а при други растежът е забавен, но плътността е по-висока. Така, че от промяната на оптичната плътност не винаги може да се съди доколко дадена бактериална популация метаболизира съответните въглехидрати. Някои видове могат да растат върху средата без да усвояват въглехидратите, а съставът на mMRS е доста богат на органични вещества. Това от своя страна може да доведе до увеличаване на оптичната плътност без да се ферментират въглехидратите.

От получените от нас резултати може да се направи извод, че всички щамове проявяват щамова специфичност по отношение на усвояването на различните въглехидрати и олигозахариди.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Коршунов В.М., В.В. Володин, Б.А. Ефимов. Дисбактериозы кишечника. 2000. №1, с.66-74.
- [2] Мазанкова Л.Н., А.М. Запруднов. Микроэкология кишечника у детей в норме и при патологии. Российские медицинские вести, 1996, №1, с.34-43.
- [3] Gibson, G.R., H.M. Probert, JAE van Loo, MB Roberfroid. Dietary Modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotic. 2004 Nutr Res Rev 17:257-259.
- [4] Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Working Group. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. <http://www.fao.org/esn/food>.
- [5] Kaplan, H. and Hutkins, R.W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. 2000. Appl. Environ. Microbiol. 66,6:2682-2684.
- [6] Loo, J.V., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., Vliet, T.V., and Heuvel, E. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). 1999. Brit. J. Nutr. 81: 121- 132.
- [7] Playne M. J. and R. Crittenden. Commercially available oligosaccharides. 1996. IDF Bulletin, 313:pp,10-22.

[8] Reid G., Sanders M.E., H.R. Gaskin, G.R. Gibson, A. Mercenier, R. Rastall, M. Roberfroid, I. Rowland, C. Cherbut and T.R. Klaenhammer. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. 2003. J Clin Gastroenterol. 37: 105-118.

[9] Roberfroid M.B. Prebiotics: the concept revisited. 2007. J Nutr 137:830-837.

Благодарност: Изследванията са осъществени със средства по проекти NATO SfP program in the frame of Project №. 982164 и РД-05-240/11.03.2009г. от Фонд научни изследвания на Шуменски университет „Еп. К. Преславски“.

За контакти:

Ас. д-р Цветеслава Игнатова-Иванова, Катедра „Биология“, Шуменски университет „Еп. К. Преславски“, тел: 0887 160 771, e-mail: radi_cvet@abv.bg

Доц. д-р инж. Радослав Иванов, Катедра „Органична химия и технологии“, Шуменски университет „Еп. К. Преславски“, тел: 0887 045 295, e-mail: radoslav@shu-bg.net

Доц. д-р Илия Илиев, Катедра „Биохимия и микробиология“, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, тел: 0888519288 e-mail: ilievini@abv.bg

Проф. дбн Искра Иванова, Катедра „Обща и промишлена микробиология“, Софийски университет „Св. К. Охридски“, тел: 0887 814887, e-mail: vitanova@biofac.uni-sofia.bg.

Докладът е рецензиран.