

Бактериоцин-продуцираща способност на млечнокисели бактерии от български млечни продукти

Галя Благоева, Ангел Ангелов, Величка Гочева

Bacteriocin-producing ability of lactic acid bacteria isolated from Bulgarian dairy products: Bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB) are receiving much attention in the recent years due to their potential for application in the food industry as natural preserving agents. In this regard, the aim of the present work was to study the bacteriocin-producing ability of five LAB strains isolated from Bulgarian fermented dairy products. Agar spot tests and agar well diffusion assays employed in this study revealed that the antimicrobial activity of one of the strains - *Lb. casei* Ya₂ against food pathogens could be attributed to the production of bacteriocin or bacteriocin-like compounds.

Keywords: Bacteriocins, Biopreservation, Fermented milk, Lactic acid bacteria, Pathogens.

ВЪВЕДЕНИЕ

Бактериоцин-продуциращата способност на МКБ е обект на интензивни изследвания през последните години от една страна като важна пробиотична характеристика и от друга във връзка със съвременната концепция за производство и консумация на минимално третирани, естествени и трайни храни без консерванти [4]. Способността на МКБ да продуцират антимикробни вещества като органични киселини (млечна, оцетна, пропионова, сорбинова, бензоена), диацетил, водороден пероксид, различни фенолни вещества или други нискомолекулни съединения като ройтерин е добре документирана [2, 11]. Антимикробната активност на МКБ обаче може да се дължи и на продукцията на бактериоцини – семейство пептиди с антимикробна активност [7, 8, 10]. Бактериоцините са малки (2-6 kDa), рибозомно-синтезирани антимикробни пептиди или протеини в бактериите, които подтискат растежа на други генетично близки бактерии дори в рамките на един вид [3, 4, 7]. Бактериоцин-продуциращата способност на МКБ им осигурява конкурентно предимство в сложните микробни съобщества и дава възможност да бъдат използвани като биоконсерванти за подобряване на качеството и безопасността на храните [1, 12]. В тази връзка, целта на настоящата работа бе да се изследва бактериоцин-продуциращата способност на 5 варианта МКБ, изолирани от български ферментационни млечни напитки.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Микроорганизми

Щамове: *Lactobacillus paracasei* DA₁, *Lactobacillus casei* Pr₁, *Lb. casei* Ya₂, *Lactobacillus fermentum* ED₂, *Pediococcus acidilactici* PD₃, изолирани от ферментационни млечни продукти, идентифицирани чрез 16S рДНК секвенционен анализ.

Индикаторни микроорганизми: *Salmonella sp.* NBIMCC 1425, *Listeria monocytogenes* NBIMCC 8669 (Българска национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури); *Staphylococcus aureus* H7/12/31 (катедра „Микробиология и молекулярна биология“, Институт за хранителни изследвания, Братислава, Словакия.

Изследване на антимикробната активност на МКБ чрез агар-точковия метод

Антимикробната активност на щамове МКБ беше изследвана по агар-точковия метод, описан от Gonzales et al. [6] срещу Грам-отрицателни (*Salmonella sp.* NBIMCC 1425) и Грам-положителни (*Listeria monocytogenes* NBIMCC 8669 и *Staphylococcus aureus* H7/12/31) микроорганизми, които са най-често срещаните хранителни патогени. Изследваните щамове МКБ бяха посявани на MRS агар и инкубирани при

37°C за развитие на добре оформени колонии (24 h). Индикаторните микроорганизми бяха активирани в TSB бульон при 37°C за достигане на концентрация 1×10^6 cfu/ml и бяха посявани отново в полутвърд TSB агар (0.7% агар). Полутвърдата среда беше хомогенизирана внимателно и изливана върху повърхността на MRS агара с развитите МКБ. Петритата бяха инкубирани при 37°C за 24 h за отчитане на зоните на инхибиране около колонии МКБ.

Изследване на антимикробната активност на МКБ чрез агар-дифузионния метод

Бактериоцин-продуциращата способност на тестваните щамове МКБ беше изследвана и с агар-дифузионния метод, описан от Yang et al. [12], след изключване инхибиторния ефект, дължащ се на продукцията на органични киселини и водороден пероксид. Индикаторните патогенни микроорганизми бяха посявани в полутвърд (0.7%) TSB агар, в който след втвърдяване бяха оформяни по три ямки, с диаметър 5 mm, в които бяха поставяни третираните по определен начин свободни от клетки супернатанти (cell free supernatant, CFS) от всеки изследван щам МКБ. CFS бяха подготвяни както следва: 18-часовите култури МКБ бяха центрофугирани при 10 000 x g за 10 min и получените супернатанти бяха филтрувани през стерилни филтри (0.22 µm диаметър на порите). Към първата ямка в петритата с полутвърд TSB агар и индикаторните микроорганизми бяха добавяни по 30 µl от супернатантите, а рН на останалото количество CFS беше коригирано до 6.0 с 1 mol/l NaOH, за да се изключи потенциалния инхибиторен ефект на органични киселини в супернатантата. Обработените по този начин CFS бяха филтрувани отново и 30 µl бяха накапвани във втората ямка. Последната обработка на неутрализираните CFS включваше третиране с 1 mg/ml каталаза при 25°C за 30 min с цел елиминиране на водородния пероксид в супернатантите. Обработени по този начин CFS бяха филтрувани и накапвани към третата ямка. Петритата бяха инкубирани за 24 h при 37°C. Всеки от щамовете бе изследван в два независими експеримента.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от приложения агар-точков метод показаха, че никой от 5-те варианта МКБ не демонстрира антимикробна активност срещу всички индикаторни патогенни видове (таблица 1). От представените резултати се забелязва, че никой от анализиранияте варианти МКБ не инхибира растежа на *Salmonella sp.* Представителите на този род са сред най-често срещаните хранително-асоциирани патогени [10]. Вариант *Lb. casei* Ya₂ показва най-силно изразен инхибиторен ефект в сравнение с другите изолати. Този щам бе активен както срещу *L. monocytogenes* NBIMCC 8669 (5 ± 0.7 mm), така и срещу *Salmonella sp.* NBIMCC 1425 (5 ± 0.4 mm). Вариантите *Lb. casei* Pr₁ и *Lb. fermentum* ED₂ подтискат единствено развитието на *Salmonella sp.* NBIMCC 1425, а *Lb. paracasei* DA₁ инхибира *Staphylococcus aureus* H7/12/31 (4 ± 0.8). За разлика от посочените щамове, вариантът *P. acidilactici* PD₃ не прояви антимикробна активност към никой от индикаторните микроорганизми.

Наблюдаваният ефект на подтискане на индикаторните патогени от някои от изследваните щамове МКБ може да се дължи на продукцията на органични киселини или водороден пероксид. Най-характерен метаболитен продукт от МКБ е млечната киселина, чието бързо натрупване води до рязко понижаване нивото на рН, а оттам и до подтискане на различни патогенни (*Salmonella*, *Listeria*) и токсиногенни бактерии (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*) [4, 5, 10].

Таблица 1. Антимикробна активност на МКБ определена чрез агар-точковия метод

Щамове МКБ	Зони на инхибиране, mm		
	<i>Listeria monocytogenes</i> NBIMCC 8669	<i>Salmonella</i> sp. NBIMCC 1425	<i>Staphylococcus aureus</i> H7/12/31
<i>Lb. paracasei</i> DA ₁	-*	-	4 ± 0.8
<i>Lb. casei</i> Pr ₁	3 ± 0.5	-	-
<i>Lb. casei</i> Ya ₂	5 ± 0.7	-	5 ± 0.4
<i>Lb. fermentum</i> ED ₂	2 ± 0.4	-	-
<i>P. acidilactici</i> PD ₃	-	-	-

*Не се установява инхибиране на растежа на индикаторните микроорганизми

Инхибиторният ефект на органичните киселини се провокира от недисоциирани молекули, които преобладават в среда с ниско рН и които нарушават основни метаболитни функции в клетките, свързани с мембрания транспорт на субстрати и окислителното фосфорилиране [10, 11]. В допълнение, МКБ могат да редуцират молекулния кислород до водороден пероксид и поради липсата на каталазна активност концентрацията му се повишава силно и той проявява окислителното си антибактериално действие към различни микроорганизми.

Получените резултати с директния агар-точков метод за инхибиторния ефект на изследваните щамове МКБ срещу индикаторните патогенни, макар и информативни не позволяват разкриване на истинската природа на продуцираните инхибиторни вещества. Ето защо изолатите бяха анализирани посредством агар-дифузионния метод или т.нар. метод с ямки за способността им да синтезират бактериоцини или метаболити, сходни с бактериоцините. За целта, свободните от клетки супернатанти (CFS) бяха неутрализирани (рН 6.0) и обработени с каталаза, за да се изключи инхибиторният ефект, дължащ се на продукцията на органични киселини и водороден пероксид. Резултатите от този експеримент са обобщени в таблица 2.

От таблицата се забелязва, че отново никой от 5-те изследвани щама МКБ не демонстрира антимикробна активност срещу *Salmonella* sp. Неутрализираните и обработените с каталаза супернатанти на изследваните щамове не показаха активност и срещу *S. aureus*.

Таблица 2. Бактериоцин-продуцираща активност на МКБ от български млечни продукти

Щамове МКБ	<i>Listeria monocytogenes</i> NBIMCC 8669			<i>Staphylococcus aureus</i> H7/12/31		
	K ^a	CFS, рН 6.0 ^b	CFS без H ₂ O ₂ ^c	K ^a	CFS, рН 6.0 ^b	CFS без H ₂ O ₂ ^c
<i>Lb. paracasei</i> DA ₁	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. casei</i> Pr ₁	3 ± 0.08	-	-	-	-	-
<i>Lb. casei</i> Ya ₂	5 ± 0.2	4 ± 0.02	1 ± 0.08	5 ± 0.4	-	-
<i>Lb. fermentum</i> ED ₂	3 ± 0.1	-	-	-	-	-
<i>P. acidilactici</i> PD ₃	-	-	-	-	-	-

a – CFS без предварителна обработка (контрола, K);

b – Неутрализирана CFS, рН 6.0;

c – CFS с рН 6.0 и елиминиран H₂O₂ (обработка с каталаза);

- не се установява инхибиране на растежа на индикаторните микроорганизми

При щам *Lb. casei* Ya₂ обаче отново бе отчетена антимикробна активност срещу *Listeria monocytogenes*. Следователно, в този случай наблюдаваната антимикробна активност не е обусловена от продукцията на органични киселини и водороден пероксид, а най-вероятно се дължи на синтеза на бактериоцини или бактериоцин-подобни съединения. Антимикробната активност на бактериоцините с микробен

произход зависи от физико-химичните условия в храната, от която са изолирани микроорганизмите, условията на производствения процес, водната активност и окислително-редукционните процеси в средата, от взаимодействието на отделните компоненти в хранителната матрица, от инфекцирането на клетките с фаги и много др. фактори [9, 10].

Прегледът на литературата показва, че сред представители на микрофлората на разнообразни ферментационни продукти през последните години се откриват все повече продуценти на бактериоцини или подобни белтъчни вещества. Това заключение е в съответствие и с извода на Gonzales et al. [6], които твърдят, че продукцията на бактериоцини е характерно и относително често срещано свойство при щамове от род *Lactobacillus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можем да обобщим, че един от 5-те изследвани щама МКБ от български млечни продукти - *Lb. casei* Ya₂ демонстрира способност за продукция на бактериоцини или сходни антимикробни метаболити с активност спрямо Грам-положителни и Грам-отрицателни патогени. МКБ, способни да продуцират бактериоцини са особено ценни за хранителната промишленост за получаване без използване на химични консерванти на натурални микробиологично безопасни ферментационни продукти с удължен срок на годност.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Birri, D.J., D.A Brede, G.T. Tessema, I.F. Nes. Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy Ethiopian infants. *Microbial Ecology*, 2013, 65, 504–516.

[2] Cizeikiene, D., G. Juodeikiene, A. Paskevicius, E. Bartkiene. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 2013, 31, 539–545.

[3] Cotter, P.D., C. Hill, R. P. Ross. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3, 777–778.

[4] da Silva Sabo, S., M. Vitolo, J.M.D. González, R.P.de Souza Oliveira. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 2014, 64, 527–536.

[5] Fraga, M., P. Scavone, P. Zunino. Preventive and therapeutic administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in mouse model. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, 88, 25–34.

[6] Gonzalez, L., H. Sandoval, N. Sacristan, J.M. Castro, J.M. Fresno, M.E. Tornadijo. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 2007, 18, 716–722.

[7] Le Blanc, J.G., S.D. Todorov. Bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from Boza, a traditional fermented beverage from Balkan Peninsula – from isolation to application. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances Méndez Vilas, A. (Ed.). 2011.*

[8] Rodríguez, J.M., M.I. Martínez, N. Horn, H.M. Dodd. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 80, 101–116.

[9] Tokatli, M., G. Gülgör, S.B. Elmac, N.A. Isleyen, F. Filiz Özçelik. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 2015, 1 – 8.

[10] Tropcheva, R., S. Danova. Scening for antibacterial activity of new isolated Lactobacilli from yogurt and cheeses. *Medicine*, 2011, 1/1, 171–175.

[11] Vandenberg, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, 12, 221–238.

[12] Yang, J-L., M-S. Wang, A-C. Cheng, K-C. Pan, C-F. Li, S-X. Deng. 2008. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. *World Journal of Gastroenterology*, 2008, 14/18, 2872–2876.

За контакти:

Инж. Галя Благоева, Катедра “Биотехнология”, Университет по хранителни технологии, Пловдив, тел.: +359 32 603 646; моб. тел.: + 359 897 817 686, e-mail: galya@uft-bio.com

Докладът е рецензиран