Изследване на пробиотичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от домашно приготвени млечни продукти

Цветеслава Игнатова-Иванова, Нели Ерменлиева, Севгинар Мехмедова, Радослав Иванов, Искра Иванова

Study of probiotics potential of lactic acid bacteria, isolated from homemade dairy products : *Probiotic bacteria are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host. There is a growing interest in probiotics within the scientific community, with consumers, and in the food industry. Lactic acid bacteria (LAB) are able to produce antimicrobial compounds against competing flora, including food-borne spoilage and pathogenic bacteria. LAB strains identified as Lactobacillus plantarum isolated from artisanal dairy products. Were tested antimicrobial activity, antibiotics resistence, and ability to live in in vitro simulated terms of the gastrointestinal tract. Based on these observation is shown that strains L. plantarum isolated from homemade dairy products have probiotic properties.*

Key words: *probiotics,lactic acid bacteria, antimicrobial activity .*

ВЪВЕДЕНИЕ

Терминът пробиотици е въведен от Lilly and Stillwell, (1965), като фактор, подпомагащ растежа на микроорганизмите. Терминът “пробиотик” е даден от Greek и означава “за живот”. Свойствата, които трябва да притежават потенциалните пробиотични видове според много автори [7,10,11,16] са:

1. Да имат човешки произход (да са безопасни за използване от хората);

2. Да бъдат резистентни към стомашните киселини и токсини на жлъчният сок (тези свойства ще предсказват добро преживяване при преминаване през стомашно-чревният тракт);

3.Адхезия към чревните епителни клетки (изискване за сполучлива колонизация in vivo). Терминът колонизация описва способността на отделните бактериални видове за постоянно установяване според [3];

4.Продуциране на антимикробни субстанции или бактериоцин (за патогенен антагонизъм);

5.Способност към модулиране на имунния отговор и за влияние метаболитната активност на изпражненията (за предотвратяване на стомашните карценоми).

Съвремените концепции за пробиотиците, предложени през последните години са:

1.“Пробиотиците са живи микроорганизми, които при поемане в определени количества упражняват положителен здравен ефект” [8];

2.“Живи микробни хранителни елементи, които са полезни за здравето” Съобщено от Salminen (1998) и възприето като концепция и дефинирано от Европейската асоциация на консуматорите FUFOSE [6].

3.“Живи микроорганизми, които когато се прилагат подходящо имат положителен здравен ефект върху хората”. Дефиницията от Joint Food и Agriculture Organization/World Health Organization Working Group [9] е възприета неотдавна и от Интернационалната научна асоциация за про- и пребиотици [14].

4.“Пробиотичните бактерии са живи хранителни добавки, които подобряват здравето на консуматорите”.

Един от основните аспекти свързани с разработването на функционални храни е подбора на микроорганизми, които да притежават специфични пробиотични свойства. Една перспектива в това отношение е изолиране на млечно кисели бактерии от естествени местообитания (домашно приготвени кисели млека).

Разработването на млечни продукти съдържащи пробиотични бактерии понастоящем има важно индустриално и търговско значение.

Изучаването на пробиотичния потенциал на млечно киселите бактерии е предпоставка за влагането им не само в млечните продукти, но и в различни други хранителни продукти и препарати с профилактично или терапевтично действие.

Основната цел на настоящото изследване е да се изолират млечно кисели бактерии (МКБ) от домашно приготвени кисели млека от Североизточния регион и да се изследва пробиотичния им потенциал с оглед използването им като функционални храни.

Изследванията в настоящата работа са проведени с два вида домашно приготвено кисело мляко от района на Североизточна България, от с. Надарево – домашно приготвено краве мляко и от с. Дибич – домашно приготвено овче мляко, За удобство щамът изолиран от краве мляко е означен с префикс – К, а щамът изолиран от овче мляко с префикс – О.

Щамовете са изолирани от домашно приготвени млечни продукти и се съхраняват при –80^{0}C в течна среда MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) (MRS broth Fluka 69966) допълнена с 25% глицерол като криптотектант.

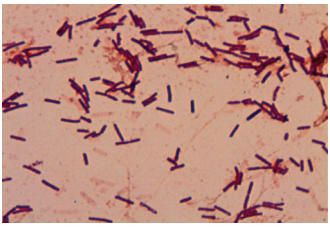
Видовата идентификация на изолираните щамове млечно кисели бактерии е определена на базата на данните получени от тестовете за усвояване на 49 въглеродни източника, с помощта на кит API 50 CHL. Резултатите по видовата идентификация на щамовете са обработени с програма IBIS (Intelligent Bacteria Identification System).

Анализът за антибактериална активност на изпитваните щамове е проведен по метода на дифузия по [2,15]. Активността на щамовете е определена спрямо тест култури (*Escherichia coli HB101, Staphilococcus aureus ATCC39592* и *Bacillus cereus ATCC6633*). Активността е отчитана в mm зони.

Антибиотичната чувствителност е тествана спрямо седем антибиотика с различен механизъм на действие, от основните групи използвани в медицинската практика.

Проведено е изследване за способността на изолираните щамове да преживяват в различните отдели на храносмилателния тракт при симулирани условия *in vitro*. При използваната методика, подобие на условията в горните отдели на храносмилателната система е постигнато чрез съвместно въздействие на ниски стойности на pH и пепсин. *In vitro* симулацията на условията в тънките черва е проведена при неутрални стойности на pH.

Изолираните щамове са анализирани микроскопски (фигура 1).



Фиг. 1. Светлинно-микроскопски снимки на оцветяване по Грам на изолираните лакобацилни щамове. Снимките са направени с Микроскоп „Олимпус" модел SZ61TR и увеличение 1000 пъти с имерсия.

При наблюдение под светлинен микроскоп клетките на изолираните два щама имаха пръчковидна форма, разположени са по единично , по двойки или във верижка и по Грам се оцветяват положително.

Видова идентификация на щамовете с API-тест

След охарактеризирането на основните морфологични критерии, изследваните щамове са подложени на определяне на биохимичния им профил със системата за бърза идентификация API 50 CHL. Според способностите си да усвояват 49 въглеродни източника е определена видовата принадлежност на двата щама. Получените резултати от идентификацията на изолираните щамове показват, че и двата щама изолирани от краве и овче мляко се отнасят към вида *Lactobacillus plantarum* – с достоверност от 98 %.

Изследване на пробиотичния потенциал на изолираните щамове

Млечнокиселите бактерии се отнасят към пробиотиците, ако успешно се конкурират с вътрешните патогени и благоприятстват възстановяването на нормалната чревна микрофлора.

Определяне на антимикробна активност

За определяне на пробиотичния потенциал се прилагат редица критерии, като един от важните сред тях е способността на щамовете да повишават естествената защита на гостоприемника по отношение на ентеропатогените, чрез продуциране на антимикробни субстанции или чрез конкурентно инхибиране и изключване на тези патогени. Във връзка с това е проучена антибактериалната активност на изследваните щамове по метода на дифузия в агар. За целта са използвани безклетъчни супернатанти, получени след 24-часово култивиране на модифицирана среда – mMRS, в която глюкозата е заменена с фруктоолигозахарид (Orafti, Belgium) и глюкоолигозахарид (Solabia, France). Получените след култивиране супернатанти са неутрализирани до pH 6.5, за да бъде елиминиран инхибиращият ефект на продуцираната от лактобацилите киселина. Като тест-микроорганизми са използвани различни Грам положителни и Грам отрицателни тест-култури. Резултатите от трикратно повторените опити са представени в Таблица 1 и Фигура 2.

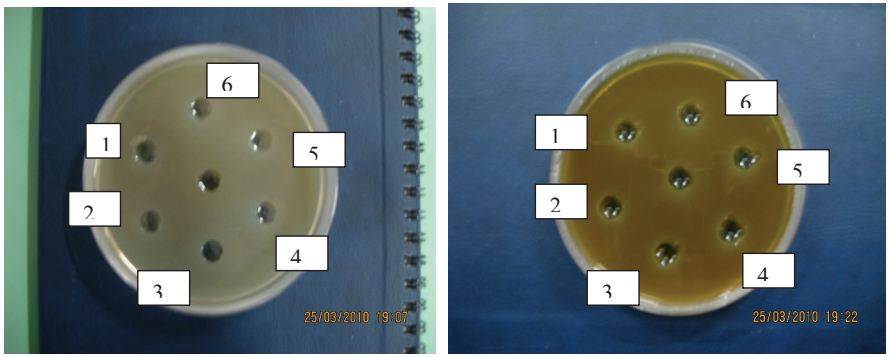
Таблица 1. Антимикробна активност на изолираните лактобацили спрямо бактериални патогени.

Тест-микроорганизми / Щам	*Bacillus cereus* ATCC6633	*Staphilococcus aureus* ATCC39592	*Escherichia coli* HB101
К1, култивиран на MRS	-	-	12
О, култивиран на MRS	-	-	10
К1, култивиран на ФОЗ	9 мм	8 мм	9
О, култивиран на ФОЗ	11 мм	9	10 мм
К1, култивиран на ГОЗ	12 мм	11	11 мм
О, култивиран на ГОЗ	8 мм	10 мм	13

От данните в Таблица 1 можем да направим извод, че при култивиране върху олигозахариди се индуцира синтезата на вещества с различна природа, които проявяват антимикробна активност. Може да се касае за синтеза на бактериоцини.

Получените резултати са в подкрепа на разбирането за механизмите на антагонистичното действие при пробиотичните щамове. Пробиотиците са способни да повлияват интестиналните патогени чрез продуциране на антибактериални вещества, включително млечна киселина, оцетна киселина и антибиотик-подобни субстанции (бактериоцини), чрез конкуренция за хранителни компоненти. Най-често лактобацилните щамове проявяват антимикробен ефект по отношение на бактериалните патогени чрез продуциране на метаболити като млечна и оцетна киселина и последващо понижаване на pH [13].

Staphilococcus aureus ATCC39592 *Escherichia coli* HB101



Фигура 2. Инхибиторна активност на щамовете *L. plantarum* - K_1 и *L. plantarum – O.* Легенда: 1- К1 на MRS; 2-О на MRS; 3-К1 на ФОЗ; 4-О на ФОЗ; 5- К1 на ГОЗ; 6 – О на ГОЗ.

От получените от нас резултати можем да кажем, че сравнително висока е антибактериалната активност на щама *L. plantarum – K1,* култивиран върху ГОЗ и на вида *L. plantarum – O*, култивиран върху ФОЗ. Способността на двата вида да подтискат развитието на значими патогени, представлява интерес във връзка с тяхното терапевтично приложение като пробиотици. Това определя необходимостта от по-нататъшно комплексно охарактеризиране на тези видове като кандидати за пробиотици.

Антибиотична устойчивост

Познаването на антибиотичната устойчивост на лактобацилите с пробиотичен потенциал е от съществено значение. От една страна това може да се разглежда като значим критерий при селекцията на пробиотични култури поради възможността за провеждане на комбинирана терапия с антибиотик и пробиотик, с цел възстановяване на нормалната микрофлора на стомашно-чревния тракт [4]. От друга страна редица автори изказват хипотезата, че нормално срещащите се в организма бактерии, включително и лактобацилите могат да служат като източник на гени за антибиотична устойчивост, трансферирайки ги към различните патогенни микроорганизми [12]. Затова едно от условията за подбор на потенциално пробиотични щамове е познаването на тяхната антибиотична чувствителност.

За целта са подбрани седем антибиотика с различен механизъм на действие от основните групи, използвани в медицинската практика и е тествана чувствителността на изолираните щамове към тях.

Получените резултати от проведените изследвания са обобщени в Таблица 2.

Резултатите показват, че изследваните лактобацили в различна степен се повлияват от различните групи антибиотици. Щамът *L. plantarum – K1* проявява висока чувствителност към пеницилин, ампицилин, ванкомицин и тетрациклин, интермедиерен е към стрептомицин, гентамицин и ципрофлоксацин. Щамът *L. plantarum – O* проявява висока чувсвителност към тетрациклин, гентамицин, ванкомицин и пеницилин, интермедиерен е по отношение на ципрофлоксацина и резистентен – към стрептомицин и ампицилин.

Някои лактобацили имат висока естествена резистентност към ципрофлоксацин, канамицин, гентамицин, стрептомицин, тейкопланин и ванкомицин [5].

При проучване на Temmerman et al. [17] са изследвани 55 пробиотични продукта на европейския пазар и е установена антибиотична резистентност при изолираните от тях бактерии.

Таблица 2. Чувствителност на изследваните лактобацили към антибиотици от различните групи.

Вид антибиотик		Щам К1	Щам О
Инхибитори на синтезата на клетъчна стена	*Penicillin*	S	S
	Ampicillin	S	R
	Vancomycin	S	S
Инхибитори на протеиновия синтез	*Streptomycin*	SR	R
	Gentamicin	SR	S
	Tetracycline	S	S
Инхибитори на синтезата на ДНК или клетъчното делене	*Ciprofloxacin*	SR	SR

Легенда: S – чувствителен (зона по-голяма от 16мм); SR- интермедиерен (зона от 7-16 мм); R- резистентен.

Данните за спектъра на антибиотична устойчивост трябва да бъдат внимателно анализирани при подбор на пробиотични щамове, поради възможностите за трансфер на генетични елементи, обуславящи резистентност. Наличието на придобити фактори за антибиотична резистентност се счита за силно нежелателно в Европа [5]. Разработени са правила и критерии за оценка на трансферуеми гени за резистентност при стартерните култури и при пробиотици за приложение при животни и при хора (FAO/WHO, European Commission). При приложението на пробиотиците съвместно с антибиотици в определени случаи не трябва умишлено да се селекционират пробиотични щамове с по-широк спектър на резистентност от тяхната естествена. Във връзка с това се препоръчва при лактобацилите да се извършва скрининг за потенциално трансферуема резистентност към хлорамфеникол, клиндамицин, еритромицин, гентамицин, рифампицин, тетрациклин [5].

Изследването на антибиотичната чувствителност на потенциално пробиотичните щамове е важно и от гледна точка на прилагането им като агенти, съпътстващи терапията с антибиотици. При получените от нас резултати се наблюдава, че и двата вида проявяват резистентност към някои от антибиотиците, използвани в клиничната практика при терапии на различни инфекции. Следователно, и двата вида съчетават полезни свойства, които ги определят като перспективни, съгласно критериите за *in vitro* оценка на пробиотични щамове.

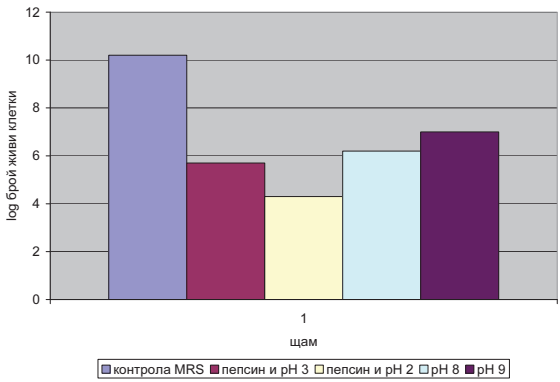
Оценка на способността да преживяват при *in vitro* симулирани условия на гастроинтестиналния тракт

Храносмилателните сокове в стомашно-чревния тракт (СЧТ) на бозайниците представляват сериозна бариера за навлизането на микроорганизми. При избора на пробиотични бактерии, които се включват като компоненти на функционалните храни се изисква те да са устойчиви на въздействията в различните отдели на СЧТ. Навлезлите в СЧТ бактерии с храната попадат първо в стомаха в условията на ниски стойности на pH и в присъствието на пепсин. След това, заедно с разградената храна се отправят в тънките черва, където концентрацията на жлъчни киселини достига до 0.3% и преминават към дебелото черво, където стойностите на pH са неутрални. Тези, които оцеляват при екстремните условия в стомаха, след това са подложени на стрес в тънките черва, причинени от жлъчните и панкреатични

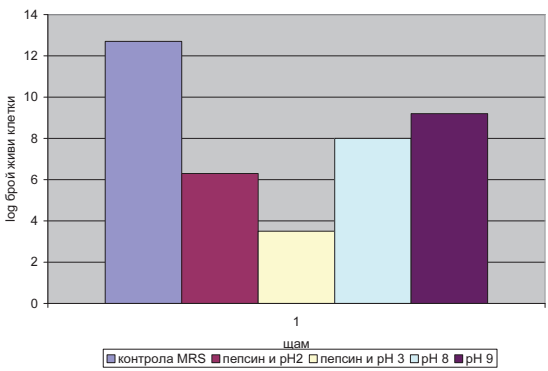
сокове и само преживелите достигат дебелото черво и колонизират мукозните повърхности [13].

Проведено е изследване за способността на изолираните щамове лактобацили да преживяват в различните отдели на храносмилателния тракт при симулирани условия *in vitro.* При използваната методика, подобие на условията в горните отдели на храносмилателната система, е постигнато чрез съвместно въздействие на ниски стойности на pH и пепсин. *In vitro* симулацията на условията в тънките черва е проведена при неутрални стойности на pH. Получените резултати са представени на Фигури 3 и 4.

На базата на резултатите от Фигура 3, може да се направи извода, че щамът *L. plantarum – K1* е чувствителен при комбинираното въздействие на кисело pH и пепсин, но дори и след инкубирането при тези условия за 3 часа той не загубва напълно жизнеспособността си. Щамът е по-чувствителен на въздействието на pH 2 и пепсин, където преживяемостта му е 44%, докато при въздействие на pH 3 и пепсин, преживяемостта му е 57%. При въздействие с алкално pH преживяемостта при стойности на pH 8 е 61%, а при pH 9 – 67%. Изводът, който можем да направим е, че жизнеността на изпитваните щамове се повлиява по-значително от ниските стойности на pH, но въпреки това щамът успешно преживява и киселото и алкалното pH.



Фигура 3. Преживяемост на *L. plantarum – K1* при симулирани условия на различните отдели на СЧТ.



Фигура 4. Преживяемост на *L. plantarum – O* при симулирани условия на различните отдели на СЧТ.

От данните на Фигура 4 може да се направи извода, че щамът *L. plantarum – O* е чувствителен при комбинираното въздействие на кисело pH и пепсин, но дори и след инкубирането при тези условия за 3 часа той не загубва напълно жизнеспособността си. Щамът е по-чувствителен на въздействието на pH 2 и пепсин, където преживяемостта му е 50%, докато при въздействие на pH 3 и пепсин, преживяемостта му е 31%. При въздействие с алкално pH преживяемостта при стойности на pH 8 е 66%, а при pH 9 – 75%. Изводът, който можем да направим е, че жизнеността на изпитваните щамове се повлиява по-значително от ниските стойности на pH, но въпреки това щамът успешно преживява и киселото и алкалното pH.

Получените резултати свидетелстват, че способността за развитие в киселинни и алкални условия е щамово специфична характеристика.

Изследванията на някои автори показват, че не всички видове лактобацили преживяват в условията на висока киселинност, но се счита, че преживяемостта на тези видове в условията на киселинен и ензимен стрес на храносмилателната система може да се увеличи значително чрез защитното действие на съставките на млякото [1].

От получените от нас резултати можем да кажем, че пробиотичният потенциал на тези два щама, с произход от домашно приготвено българско кисело мляко, може да се оценява в аспектите на подобряване асимилацията на лактозата и качествените характеристики на храните.

Щамово-зависимата толерантност към ниско pH, пепсин и алкално pH в концентрации, подобни на тези в различните отдели на СЧТ, са използвани като пре-селективни критерии за подбор на потенциално пробиотични щамове. На базата на анализа по тези критерии може да се посочи, че и двата щама са способни да преминават успешно през раличните отдели на СЧТ. Това, в съчетание с антимикробната активност и антибиотичната чувствителност, ги прави интересни като потенциално пробиотични щамове.

ЛИТЕРАТУРА

[1].Чомаков, Хр.,Пробиотици – минало, настояще и бъдеще, изд. Е спринт, София, 2007.

[2].Bertrand-Harb C., I. Ivanova, M. Dalgalarrondo and T. Hartle. 2003. Evolution of b-lactoglobulin and a-lactalbumin content during yoghurt fermentation. Int. Dairy J. *13*, 39–45.

[3].Bezkorovainy A.2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. Am. J. Clin Nutr. 73, Suppl. 399S-405S.

[4].Charteris A.,1997.Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora**,** Vol. 88, p.29-37.

[5].Danielsen, M., and A. A. Wind. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* ssp. to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbiol. 82**:**1-11.

[6].Diplock A.T., P. J. Aggett, M. Ashwell, F. Bornet, E.B. Fern, M.B. Roberfroid.1999. Scientific consepts of fuctional foods in Europe: consensus document. Brit J. Nutr 81, Suppl.1, pp.11-27.

[7].Guarner F., G. Perdigon, G. Corthier, Seppo Salminen, B. Koletzko and L. Morelli.2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic? British. J Nutr.93:783-786.

[8].Guarner F. and G. Schaafsma.1998. Probiotics. Int. J Food Microbiol 39:237-238.

[9].Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Working Group.2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. http://www.fao.org/es/esn/food.

[10].Kullen M. J., T. R. Klaenhammer.1999. Genetic modification of intestinal lactobacilli and bifidobacteria. In: *Probiotics: A Critical Review*, G. W. Tannock (Ed.), Horizon Scientific Press, Wymondham, pp. 65–83.

[11].Marteau P., J. C. Rambaud.1993. Potentia of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev. 12*, 207–220.

[12].Mathur S, Singh R (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria--a review. Int J Food Microbiol 105:281-295.

[13].Naidu A. S., W. R. Bidlack[a]; R. A. Clemens[b],1999. Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). Food Scien. And Nutrition, vol.39, 1, pp. 113-126.

[14].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.2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. J Clin Gastroenterol. 37: 105-118.

[15].Tagg J.R. and McGiven A.R.1971. Assay system for bacteriocins. Applied Microbiology 21,943.

[16].Tannock, G. 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenary of scope for fundamental R & D. Trends in Biotechnology. 15: 270-274.

[17].Temmerman R., B. Pot, G. Huys and J. Swings,2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. International Journal of Food Microbiology, Volume 81, Issue 1, 25 February 2003, Pages 1-11.

Благодарност: Изследванията са осъществени със средства по проект РД 08-266/2013от Фонд научни изследвания на Шуменски университет „Еп. К. Преславски”.

За контакти:

Проф. дбн Искра Иванова, Катедра „Промишлена Микробиология”, Софийски Университет „Еп. К. Преславски”, тел. 0887 814887, e-mail: iskrai3@yahoo.com

Доц. 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

Асистент-Докторант Нели Ерменлиева, Катедра „Биология”, Шуменски университет „Еп. К. Преславски”

Асистент Севгинар Мехмедова, Катедра „Биология”, Шуменски университет „Еп. К. Преславски”

Докладът е рецензиран