

Изследване на пробиотичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от домашно приготвени сирена

Цветеслава Игнатова-Иванова, Севгинар Ибрямова, Нели Лодозова,
Радослав Иванов

Study of probiotics potential of lactic acid bacteria, isolated from homemade cheese : *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 helveticus and Lactobacillus casei isolated from homemade cheeses. Were tested antimicrobial activity, antibiotics resistance, and ability to live in vitro simulated terms of the gastrointestinal tract. Based on these observation is shown that strains L. helveticus and L. casei isolated from homemade dairy products have probiotic properties.*

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

ВЪВЕДЕНИЕ

Според Мечников основната причина за стареенето се явява размножаването на патогенната микрофлора и хроничното отравяне на организма от продуктите на гниенето. Известна е крилатата фраза “Голямото разнообразие от асоциирани микроорганизми в стомашночревния тракт на човека се определят от духовното и физическото му здраве”.

За борбата с дисбиозата гениалният руски учен предлага просто решение - да се допълни числеността на полезните микроорганизми отвън с помощта на млечнокисели продукти, в които *Bifidobacterium sp.* и *Lactobacillus sp.* се намират в относително големи количества.

Идеите на Мечников са определили направление в борбата с дисбиозата за целия XX век, чрез използване на пробиотици и пребиотици.

Сиренето заема важно място сред млечните продукти. Производството на сирене позволява да се концентрират най-ценните съставки на млякото – белтъците и мазнината и от концентрата да се получат трайни продукти с доказани вкусови качества и здравословен ефект. В сиренето пълноценно се съчетават незаменими аминокиселини, високо съдържание на калций, широка гама микроелементи, лесно усвояима форма на млечна мазнина, което го прави един много търсен и ценен продукт на пазара.

През последните години на пазара се предлагат разнообразен асортимент от сирена, но в същото време нарастват и изискванията на консуматорите за по-здравословно хранене.

Ограничена е информацията за микрофлората на домашно приготвените млечни продукти като потенциален източник на нови изолати от млечно кисели бактерии, които влияят положително на човешкото здраве, имат доказан пробиотичен ефект и могат да бъдат предложени за разработването на функционални храни.

Ето защо, получаването на нова информация относно състава и биологичните свойства на микрофлората от неиндустриални проби на традиционния продукт – бяло саламурено сирене може да създаде нови възможности за разработване на полезни, качествени и разнообразни продукти, в съответствие с новите тенденции на пазара и здравословните храни.

Основната цел на настоящото изследване е да се изолират млечно кисели бактерии (МКБ) от домашно приготвени сирена 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. Кочово – домашно приготвено краве сирене и от с. Белокопитово – домашно приготвено овче сирене. За удобство шамът изолиран от краве сирене е означен с префикс – К, а шамът изолиран от овче сирене с префикс – О.

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.

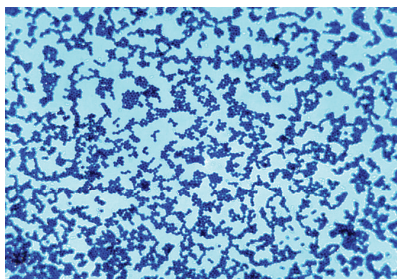
Видовата идентификация на изолираните щамове млечно кисели бактерии е определена на базата на данните получени от тестовете за усвояване на 49 въглеродни източника, с помощта на кит API 50 CHL. Резултатите по видовата идентификация на щамовете са обработени с програма IBIS (Intelligent Bacteria Identification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

Анализът за антибактериална активност на изпитваните щамове е проведен по метода на дифузия [1]. Активността на щамовете е определена спрямо тест култури (*Escherichia coli* HB101, *Staphylococcus 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 OPTIKA (Italy) с увеличение 1000 с имерсия.

При наблюдение под светлинен микроскоп клетките на изолираните два щамове имаха пръчковидна форма, разположени са поединично, 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 щамове. Получените резултати от идентификацията на изолираните щамове показват, че

щамът изолиран от краве сирене се отнася към вида *Lactobacillus helveticus*, а щамът изолиран от овче сирене се отнасят към вида *Lactobacillus casei* с достоверност 97%.

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.

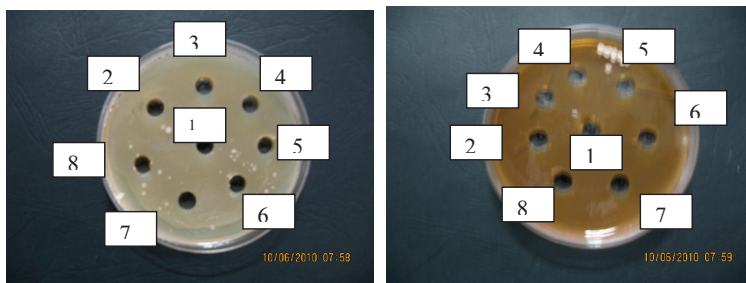
Определяне на антимикробна активност

Известно е, че МКБ са естествени антагонисти на нежелателни или патогенни микроорганизми благодарение продукцията на водороден пероксид, млечна киселина и синтез на бактериоцини и други инхибиращи субстанции. 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 – ФОЗ (Orafti, Belgium) и глюкотолигозахарид – ГОЗ (Solabia, France). Получените след култивиране супернатанти са неутрализирани до pH 6.5, за да бъде елиминиран инхибиращият ефект на продуцираната от лактобацилите киселина. Вторият вариант на теста бе проведен без да се неутрализират супернатантите.

Като тест-микроорганизми са използвани различни Грам положителни и Грам отрицателни тест-култури. Резултатите от трикратно повторените опити са представени в Фигура 2 и Фигура 3.

Staphylococcus aureus ATCC39592

Escherichia coli HB101



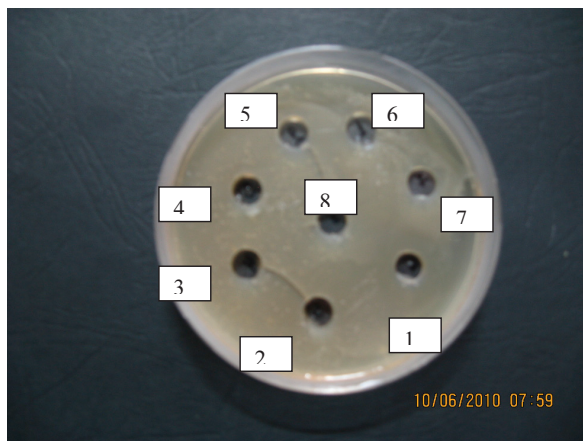
Фиг. 2 Инхибиторна активност на щамове без неутрализиране на супернатантите *L. helveticus* и *L. casei*. Легенда: 1,2- К на ГОЗ; 3-К на ФОЗ; 4-О на ФОЗ; 5,6- О на ГОЗ; 7-К на MRS; 8-О на MRS.

От данните на фигурата може да се каже, че и двата щам проявяват инхибиторна активност спрямо патогените *Staphylococcus aureus* ATCC39592 и *Escherichia coli* HB101. Само при култивиране на щамове на MRS (точки 7 и 8) не бяха отчетени зони на активност. Спрямо *Bacillus cereus* не бяха отчетени зони на активност в нито един от случаите.

От получените резултати можем да направим извод, че отчетената антимикробна активност вероятно се дължи на продуциране на различни киселини при ферментацията на въглехидрати и олигозахариди.

При проведените експеримент с неутрализирани супернатанти бяха получени зони на активност само спрямо *Bacillus cereus*. Резултатите са представени на фигура 3.

Bacillus cereus ATCC6633



Фиг. 3. Инхибиторна активност на щамове при неутрализиране на супернатантите *L. helveticus* и *L. casei*. Легенда: 1,2- К на ГОЗ; 3-К на ФОЗ; 4-О на ФОЗ; 5,6- О на ГОЗ; 7-К на MRS; 8-О на MRS.

От данните на фигурата е видно, че при култивиране върху олигозахариди е отчетена антибактериална активност дори и при неутрализирани супернатанти. Това вероятно може да се обясни с индуциране синтеза на вещества с различна природа, които проявяват антимикробна активност. Може да се касае за синтеза на бактериоцини.

Органичните киселини са краен продукт от ферментацията на МКБ. Знае се, че антибактериалната активност се проявява при по-високо pH, когато то е получено от органични киселини, в сравнение с това от минерални киселини.

Има три фактора, обясняващи инхибиращото действие на киселите вещества:

1. Ефектът на самото pH;
2. Степента на дисоциация на киселината;
3. Специфичният ефект на молекулата.

Инхибиращият ефект на слабите липофилни киселини, продуцирани от МКБ (млечна и оцетна киселини) е провокиран от недисоциирани молекули, преобладаващи в средата с ниско pH. Последните взаимодействат с основните метаболитни функции като транспорт на субстрати и окислително фосфорилиране и освобождавайки протони предизвикват промяна на вътрешното pH. Всичко това дестабилизира мембраната, което влияе на пропускливостта ѝ и намаляването на ензимната активност на редица ензими [3,8].

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 [5].

От получените от нас резултати можем да кажем, че и двата щам проявяват антибактериална активност спрямо различни патогени както при кисели така и при неутрализирани супернатанти. В първият случай това се дължи вероятно на

образувалите се като крайни продукти киселини, а във вторият случай може да се касае за синтеза на вещества с белтъчна природа.

Необходимо е да се отбележи и факта, че използваните от нас ФОЗ и ГОЗ стимулират висока антибактериална активност.

Способността на двата щама да подтискат развитието на значими патогени, представява 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

Съгласно изискването на Световната здравна организация познаването на спектъра на антибиотичната чувствителност е важен и задължителен критерий при избора на щамове за приложение в медицината и храните (FAO/WHO, 2002) [7].

Познаването на антибиотичната устойчивост на лактобацилите с пробиотичен потенциал е от съществено значение. 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.

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

Вид антибиотик		<i>L. helveticus</i> K	<i>L. casei</i> O
Инхибитори на синтеза на клетъчна стена	<i>Penicillin</i>	R	R
	<i>Ampicillin</i>	SR	R
	<i>Vancomycin</i>	SR	R
Инхибитори на протеиновия синтез	<i>Streptomycin</i>	R	R
	<i>Gentamicin</i>	R	R
	<i>Tetracycline</i>	S	SR
Инхибитори на синтеза на ДНК или клетъчното делене	<i>Ciprofloxacin</i>	R	R

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

Резултатите показват, че изследваните лактобацили в различна степен се повлияват от различните групи антибиотици. Щамът *L. helveticus* проявява висока чувствителност само към тетрациклин, интермедиерен е към ампицилина и ванкомицина и е резистентен към пеницилин, стрептомицин, гентамицин и циплофлоксацин. Щамът *L. casei* е интермедиерен е по отношение на тетрациклина и резистентен към всички останали използвани антибиотици.

Някои лактобацили имат висока естествена резистентност към ципрофлоксацин, канамицин, гентамицин, стрептомицин, тейкопланин и ванкомицин [4].

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 [4]. Разработени са правила и критерии за оценка на трансферуеми гени за резистентност при стартерните култури и при пробиотици за приложение при животни и хора [7]. При приложението на пробиотиците съвместно с антибиотици в определени случаи, не трябва умишлено да се селектират 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 [4].

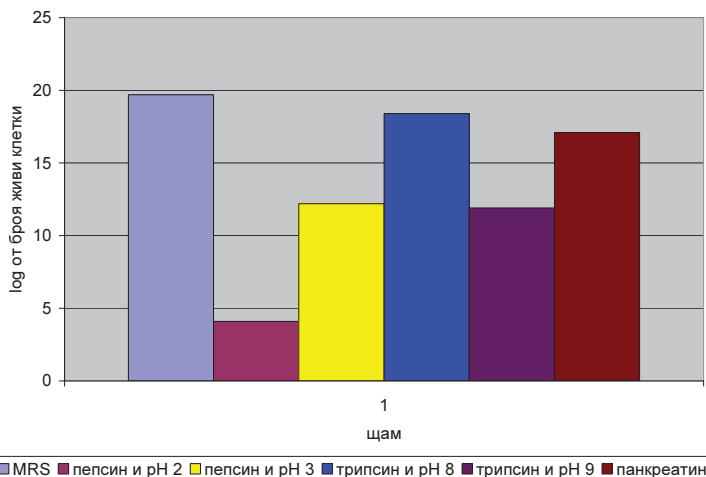
Изследването на антибиотичната чувствителност на потенциално пробиотичните щамове е важно и от гледна точка на прилагането им като агенти съпътстващи терапията с антибиотици. При получените от нас резултати се наблюдава, че и двата вида проявяват висока резистентност към антибиотиците, използвани в клиничната 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 рН 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 рН 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 [7].

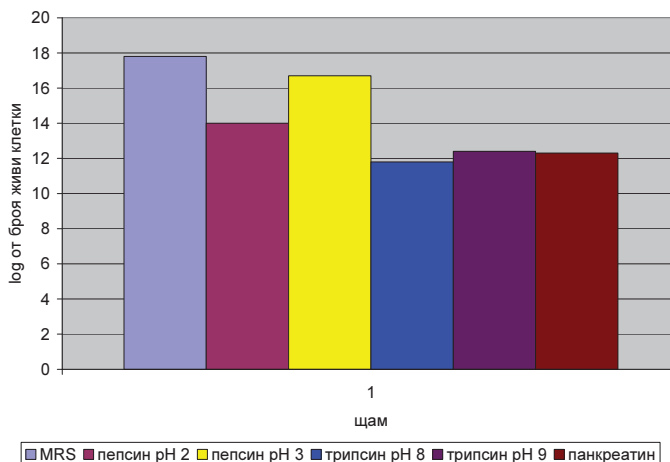
Проведено е изследване за способността на изолираните щамове лактобацили да преживяват в различните отдели на храносмилателния тракт при симулирани условия *in vitro*. При използваната методика, подобие на условията в горните отдели на храносмилателната система, е постигнато чрез съвместно въздействие на ниски стойности на рН и пепсин. *In vitro* симулацията на условията в тънките черва е проведена при неутрални стойности на рН. 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 рН 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 рН 2 и пепсин, където преживяемостта му е 44%, докато при въздействие на рН 3 и пепсин, преживяемостта му е 57%. При въздействие с алкално рН преживяемостта при стойности на рН 8 е 61%, а при рН 9 – 67%. Изводът, който можем да направим е, че жизнеността на изпитваните щамове се повлиява по-значително от ниските стойности на рН, но въпреки това щамът успешно преживява и киселото и алкалното рН.



Фиг.4 Преживяемост на *L. helveticus* при симулирани условия на различните отдели на СЧТ.

На базата на резултатите от Фигура 3, може да се направи извод, че щамът е изключително чувствителен при комбинираното въздействие на рН 2 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 рН 2 и пепсин, където преживяемостта му е 21%, докато при въздействие на рН 3 и пепсин, преживяемостта му е 62%. При въздействие с алкално рН преживяемостта при стойности на рН 8 е 93%, а при рН 9 – 61%. При въздействие с панкреатин преживяемостта е 87%. Изводът, който можем да направим е, че жизнеността на изпитвания щам се повлиява по-значително от ниските стойности на рН, но въпреки това щамът успешно преживява и киселото и алкалното рН.



Фиг. 5. Преживяемост на *L. casei* – О при симулирани условия на различните отдели на СЧТ.

От данните на Фигура 4 може да се направи извод, че шамът е по-чувствителен при комбинираното въздействие на алкалното рН и трипсина, но дори и след инкубирането при тези условия за 3 часа той не загубва напълно жизнеспособността си. Шамът е по-чувствителен на въздействието на рН 8 и трипсин, където преживяемостта му е 66%, докато при въздействие на рН 9 и трипсин, преживяемостта му е 70%. При въздействие с кисело рН и пепсин преживяемостта при стойности на рН 2 е 79%, а при рН 3 – 94%. При въздействие с панкреатин преживяемостта е 69 %. Изводът, който можем да направим е, че жизнеността на изпитваният шам се повлиява по-значително от високите стойности на рН, но въпреки това шамът успешно преживява и киселото и алкалното рН в значителни количества.

От двата изследвани щама, шамът изолиран от овче сирене е по-устойчив на кисело рН, а шамът изолиран от краве сирене е по-устойчив на алкално рН. Панкреатинът влияе повече на щама, изолиран от овче сирене.

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

Оцеляването на тези щамове при тези условия, ги прави надеждни колонизатори в дебелото черво.

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 [2, 6]

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

Щамово-зависимата толерантност към ниско рН, пепсин и алкално рН, 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.

За да бъдат предложени за промишлени цели обаче е необходимо да се проведат по-съвременни молекулярно генетични и биохимични изследвания.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Bertrand-Harb C., I. Ivanova, M. Dalgalarondo and T. Hartle. 2003. Evolution of b-lactoglobulin and a-lactalbumin content during yoghurt fermentation. *Int. Dairy J.* 13, 39–45.
- [2] Bezkorovainy A. 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin Nutr.* 73, Suppl. 399S-405S.
- [3] Booth, I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Mimbiol. Rev.* 49:359.
- [4] Danielsen, M., and A. A. Wind. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* ssp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82:1-11.
- [5] 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.
- [6] Ivanova I., I. Iliev, T. Haertle, J.M. Chobert. 2012. Food or medicine? Future of lactic acid bacteria. ISBN 978-954-423-877-3.
- [7] FAO/European Commission Cooperative Programme. Review of FAO/EC.Agricultural development projects. 2001 – 2002.

[8] Ray, B. and Sandine, W.E., 1992. Acetic, propionic, and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives. In: Ray, B. and Daeschel, M., Editors, 1992. *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 104–136.

Благодарност: Изследванията са осъществени със средства по проект РД 08-213/10.03.2014 от Фонд научни изследвания на Шуменски университет „Еп. К. Преславски“.

За контакти:

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 Севгинар Ибрямова, Катедра „Биология“, Шуменски университет „Еп. К. Преславски“

Докладът е рецензиран