

***In vitro* Изследване на пробиотичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от комерсиални млечни продукти**

Цветеслава Игнатова-Иванова, Севги Етем, Елвин Исмаил, Радослав Иванов

***In vitro* study of probiotics potential of lactic acid bacteria, isolated from commercial dairy products** : The intestinal microbial population is a dynamic ecosystem of high complexity, consisting of an estimated number of 10^{14} microorganisms including more than 400 bacterial species. "Probiotic" refers to viable microorganisms that promote or support a beneficial balance of the autochthonous microbial population of the gut. Functional properties used to characterize probiotics are the production of antimicrobial compounds, the ability to modulate immune response and adhesion to gut tissues. The mechanism through which probiotics may antagonise pathogens involves production of antimicrobial compounds such as lactic acid, acetic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins. *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains from 5 commercial dairy products were identified and research *in vitro* for their antimicrobial activity, utilization of prebiotics oligosaccharides – inulin, fructooligosaccharides and raffinose and adhesion. Based on these observation is shown that strains isolated from commercial dairy products have probiotic properties.

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

ВЪВЕДЕНИЕ

Организмът на човека и животните е подложен на въздействието на цял комплекс от неблагоприятни фактори, които влияят на нормалното функциониране на основните жизнени системи. От една страна влиянието на замърсената околна среда, от друга увеличаването на стреса и не на последно място масовото приемане на химиотерапевтични препарати в това число и антибиотици. Във връзка с това възникват въпроси да се конструира и възстанови оптималната микрофлора, т.е. микроекология и ендоекология на макроорганизма. В научната литература и официалните документи, имащи отношение към проблемите на микроекологията широка популярност придобива биотерапията. Теоретично това понятие е описано отдавна от Илья Мечников, който открива положителния ефект, оказван от млечнокиселите бактерии върху човешкия организъм. Биотерапията включва термините: пробиотици, пребиотици и биопродукти.

През последните години се появяват големи количества пробиотични препарати и научни публикации, характеризиращи тяхната ефективност. Една от основните трудности се явява голямото разнообразие от изучавани микроорганизми (МО): *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Saccharomyces boulardii* и др. Освен това има и достатъчно фактически данни, че пробиотични свойства притежават и други представители на нормалната микрофлора, чиито среди на местообитание не е стомашно-чревния тракт (СЧТ), а природни и производствени субстрати. Тук се отнасят представители на родовете *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, които влизат в състава на закваски за получаване на млечнокисели продукти с пробиотични свойства – йогурт, меки и твърди сирена, прокиш и други.

Днес най-голяма популярност придобиват пробиотици, състоящи се от няколко вида микроорганизми принадлежащи към различни родове. Един пробиотичен препарат трябва да съдържа безопасни щамове; да притежава: антагонистични свойства, за да може да се конкурира с МО в СЧТ; устойчивост към антибиотици; добра адхезионна способност; висока скорост на растеж и наличие на голям брой живи МО; да е устойчив към лизоцима и храносмилателните ензими и жлъчния сок;

да синтезира биологично активни вещества и да проявява антимикробна активност към хранителните патогени.

Важно при подбора на пробиотични щамове е да се отчита тяхната технологичност в производствени условия и стабилност при култивирани на цел да се съхранят техните свойства по време на технологичния цикъл. Това гарантира висока ефективност на комерсиалните пробиотични препарати при тяхното използване.

Основната цел на настоящото изследване е да се изследва пробиотичния потенциал на микроорганизми, изолирани от комерсиални пробиотични продукти, които се предлагат като хранителни добавки в аптечната мрежа.

Материали и методи

Изследванията в настоящата работа са проведени с 5 вида комерсиални пробиотични продукти, продавани като хранителни добавки от търговската мрежа. За удобство изолираните щамове са означени като: *L. bulgaricus* S1, *L. acidophilus* S2, *L. plantarum* S3, *L. casei* S4 и *S. thermophilus* S5.

Щамовете са изолирани от комерсиалните продукти и се съхраняват при – 80°C в течна среда MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) (MRS broth Fluka 69966) допълнена с 25% глицерол като криопротектор.

За изолиране на различните видове бяха използвани следните хранителни среди:

1. MRS среда в състав (g/l): Tween 80 – 1,0; пептон от казеин - 10,0; местен екстракт - 8,0; дрождев екстракт - 4,0; K₂HPO₄ - 2,0; натриев ацетат - 5,0; амониев цитрат - 2,0; MgSO₄·7H₂O - 0,2; MnSO₄ - 0,05; глюкоза – 20,0. рН на средата е коригирана до 6,5 с 0,1 M NaOH преди автоклавиране.

2. M-17 в състав (g/l): пептон от соя – 5,0; пептон от месо – 2,5; пептон от казеин – 2,5; дрождев екстракт – 2,5; месен екстракт – 5,0; лактоза монохидрат – 5,0; аскорбинова киселина – 0,5; натриев – β-глицерофосфат – 19,0; магнезиев сулфат – 0,25; dhd – 12,75. рН на средата е 7,2.

Беше определен общия брой на клетките, сравнен с количествата, указани върху опаковките от производителя по формулата:

$$N = n/D \cdot V, \text{ където:}$$

N е брой клетки; n – брой колонии в петри; D – разреждане и V – количеството на посевния материал.

Видовата идентификация на изолираните щамове млечно кисели бактерии беше 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).

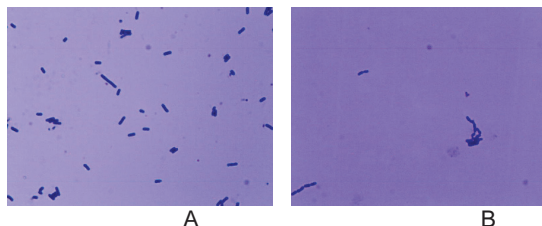
Анализът за антибактериална активност на изпитваните щамове беше проведен по метода на дифузия [1,8]. Активността на щамовете е определена спрямо тест култури (*Escherichia coli* HB101, *Staphylococcus aureus* ATCC39592, *Enterobacter aerogenes* 3691, *Salmonella Typhimurium*). За изолиране на *E. coli* HB101 и *E. aerogenes* 3691 беше използвана среда LB (g/l): 10g триптон; 5g дрождев екстракт; 10g NaCl; рН-7.0, а за останалите щамове среда МПА. Активността е отчитана в mm зони.

Изследвана е способността на щамовете да усвояват различни олигозахариди - фруктоолигозахарид (Raftilose P95, Orafi, Belgium), инулин (Raftiline HP), Orafi (Belgium) и рафиноза (Fluka, Switzerland 99% purity), които са известни с пребиотичните си свойства.

Проведено е изследване за способността на изолираните щамове да проявяват адхезионни свойства. Изследването е проведено със сканираща електронна микроскопия.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изолираните щамове са анализирани микроскопски (фигура 1).



Фиг. 1. Светлинно-микроскопски снимки на оцветяване по Грам на изолираните лактобацилни щамове. А) *L. acidophilus* S2; В) *L. plantarum* S3. Снимките са направени с микроскоп ОПТИКА (Italy) с увеличение 1000 с имерсия.

При наблюдение под светлинен микроскоп клетките на изолираните 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 въглородни източника е определена видовата принадлежност на изследваните щамове. Получените резултати от идентификацията на изолираните щамове показват, че четири от тях се отнасят към вида *Lactobacillus* sp., а един към вида *Streptococcus* sp.– 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;
- притежават добра адхезионна способност към чревния епител.

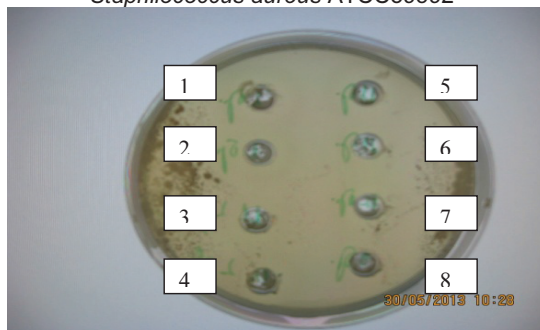
Определяне на антимикробна активност

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, инулин и рафиноза. 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 щамове спрямо бактериални патогени.

Тест-микроорганизми / Щам	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC39592	<i>Enterobacter aerogenes</i> 3691	<i>Salmonella Thyphimurium</i>	<i>Escherichia coli</i> HB101
<i>L. bulgaricus</i> S1	12mm	10mm	12mm	0mm
<i>L. acidophilus</i> S2	14mm	0mm	15mm	12mm
<i>L. plantarum</i> S3	14mm	0mm	0mm	0mm
<i>L. casei</i> S4	13mm	0mm	0mm	10mm
<i>St. thermophilus</i> S5	0mm	9mm	14mm	13mm

Резултатите в експеримента са проведени с трикратна повтаряемост.
Staphylococcus aureus ATCC39592



Фигура 2. Инхибиторна активност на щамовете.

Легенда: 1 - S1, култивиран върху рафиноза; 2 - S2, култивиран върху ФОЗ; 3 - S3, култивиран върху ФОЗ; 4 - S4 - B5, култивиран върху инулин; 5 - S5, култивиран върху рафиноза; 6 - S1, култивиран върху ФОЗ; 7 - S5, култивиран върху инулин; 8 - S2, култивиран върху инулин.

От данните в Таблица 1 и фигура 2 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.

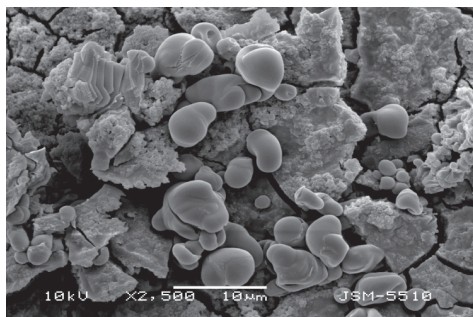
От получените от нас резултати можем да кажем, че сравнително висока е антибактериалната активност на щамовете, култивирани върху ФОЗ – два от тях показват антимикробна активност *L. bulgaricus* S1 и *L. plantarum* S3. Получените резултати са в подкрепа на разбирането за механизмите на антагонистичното 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 рН [5].

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.

Оценка на адхезионната способност на изследваните щамове

При избора на пробиотични бактерии, които се включват като компоненти на функционалните храни се изисква от една страна те да са устойчиви на въздействието на различните бариери в стомашно чревния тракт и от друга -

достигайки в достатъчни количества до дебелото черво да притежават добра адхезионна способност към мукозните повърхности [5,6]. Проведено е изследване за способността на изолираните щамове *in vitro* да проявяват адхезионни свойства с помощта на Сканираща електронна микроскопия (СЕМ). Получените резултати за един от изследваните щамове са представени на Фигура 3.



Фигура 3. СЕМ на щам *L. bulgaricus S1*. Снимките са направени със сканиращ електронен микроскоп JSM-5500 с увеличение 2500.

От данните на фигура 3 можем да кажем, че щамът *L. bulgaricus S1*, изолиран от комерсиален пробиотичен продукт притежава добри адхезионни свойства и би могъл добре да се колонизира върху чревния епител.

През последните години все по-често в аптечната мрежа се предлагат симбиотици – комбинирани препарати, съдържащи от една страна пробиотични бактерии, а от друга пребиотици, които се използват за да увеличат количеството на полезните бактерии, способни да ги усвояват. За съжаление има много данни за това как *Bifidobacterium sp.* усвояват пребиотични олигозахариди, но много малко са данните за това как другите полезни бактерии, например *Lactobacillus sp.* или *Streptococcus sp.* ги усвояват. В тази връзка ние проведохме изследване за това как изолираните от нас видове усвояват три доказани пребиотика. Изследването бе осъществено чрез провеждане на периодично култивиране в mMRS, където основният въглехидратен източник - глюкоза беше заменен с инулин, фруктоолигозахарид или рафиноза. Като контрола беше използвана основната MRS среда. Беше измерван бактериалният растеж с помощта на спектофотометър JENWAY6315 UV/VIS при дължина на вълната 600nm. Получените резултати са показани в таблица 2.

Таблица 2. Плътност на бактериалната популация след 24h култивиране.

МО изолирани от комерсиални пробиотични продукти	OD 600 nm Глюкоза	OD 600 nm ФОЗ	OD 600 nm инулин	OD 600 nm рафиноза
<i>L. bulgaricus S1</i>	10,4±0,15	1,36±0,02	1,35±0,5	1,33±0,5
<i>L. acidophilus S2</i>	9,89±0,7	1,33±0,02	1,42±0,9	2,38±0,02
<i>L. plantarumS3</i>	8,87±0,7	2,01±0,7	1,99±0,15	1,33±0,9
<i>L. caseiS4</i>	15,23±0,7	1,38±0,1	1,97±0,9	1,88±0,5
<i>St. thermophilusS5</i>	7,89±0,9	1,23±0,7	1,73±0,5	1,66±0,7

Резултатите в експеримента са обработени статистически.

От данните в таблица 2 е видно, че ФОЗ най-добре се усвоява от вида *L. plantarum*S3, инулинът - от видовете *L. plantarum*S3 и *L. casei*S4, а рафинозата - от вида *L. acidophilus* S2. Не може да се каже дали един от трите тествани пребиотици е предпочитан от пробиотичните бактерии. Способността да се ферментира всеки въглехидрат зависи от наличието на съответните ензими. От една страна пребиотиците стимулират млечнокиселите бактерии към активно нарастване, а от друга - при ферментацията им се отделят компоненти като къси вериги мастни киселини, които влияят положително върху здравето.

По данни на [4,7] в зависимост от въглехидратният източник и условията на растеж (рН, брой бактериални клетки в инокулама), млечнокиселите бактерии могат да променят метаболитните си пътища. При ферментирането на въглеродни източници, различни от глюкоза, млечнокиселите бактерии са "гладуващи" и хомоферментативните видове *Lb. acidophilus* sp. променят метаболизма си към типичен смесено-кисел тип [2]. Това показва, че различните видове млечнокисели бактерии притежават индивидуални способности за промяна във ферментационните пътища, зависещи от използваните субстрати и особеностите на вида. Въглехидратите и олигозахаридите, които стигат в неразграден вид в червата имат разхлабителен ефект. Механизмът им на действие върху чревната структура е свързан със стимулиране на микробния растеж, увеличаване на бактериалната клетъчна маса и така се стимулира перисталтиката чрез увеличаване на чревното съдържимо.

Ако известен като олигозахарид въглехидрат се ферментира единствено от специфичните видове бифидобактерии и лактобацили, обитаващи стомашно-чревния тракт на животните и човека, това би било "еволюция" в представата за съвременните диети, основаващи се на пребиотици [3].

Следователно, щамовете с пробиотични свойства биха могли да се комбинират със съответния пребиотик и да се създаде симбиотичен препарат с полезни свойства за хората и животните.

Последната наша задача беше да установим как се отразява технологията на процеса на получаване на пробиотичните продукти, като проверим какъв е броят на живите микроорганизми и дали той отговаря на данните в опаковката. Получените резултати са показани в таблица 3.

Таблица 3. Брой живи МО

МО изолирани от комерсиални пробиотични продукти	Брой МО по данни на опаковката	Брой МО по експериментални данни
<i>L. bulgaricus</i> S1	2.10 ⁸	1,90.10 ⁸
<i>L. acidophilus</i> S2	6,90.10 ⁸	5,40.10 ⁸
<i>L. plantarum</i> S3	2,25.10 ⁸	2,02.10 ⁸
<i>L. casei</i> S4	5.10 ⁷	5,10.10 ⁶
<i>St. thermophilus</i> S5	3,6.10 ⁸	3,40.10 ⁷

Резултатите в експеримента са обработени статистически.

От получените резултати е видно, че за съжаление във всички изследвани случаи броят на живите МО, които отчетохме в лабораторни условия е по-малък в сравнение с посочения. Най-добри резултати са получени за видовете *L. acidophilus* S2 и *L. bulgaricus* S1. Вероятно в технологията на процеса на лиофилизация и опаковане част от живите МО загиват. Освен това в някои от комерсиалните продукти пълнителят съдържа и хранителни оцветители и консерванти, които за да увеличат срока на съхранение на готовия продукт биха могли да доведат до намаляване броя и жизнестостта на МО.

От всички изследвани видове само щамовете *L. bulgaricus* S1, *St. thermophilus*S5 и *L. acidophilus* S2 проявяват антимикробна активност към три от

тестваните патогени. В останалите случаи антимикробна активност беше отчетена спрямо един или два патогена.

От получените резултати може да се направи извод, че е необходимо всички известни хранителни добавки да бъдат по-обстойно тествани за всички необходими свойства, които трябва да притежава един щам за да бъде предложен като пробиотичен продукт. Получените резултати поставят едно ново начало и ще продължат в тази насока.

ЛИТЕРАТУРА

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

[2].Hill M.1995. The metabolic activity of gut bacteria in Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Pharmacology. Taylor and Francts, United Kingdom,pp.19-25.

[3].Kaplan, H. and Hutkins, R.W. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66,6:2682-2684.

[4].Kontula P., A. Suihko, V. Wright, T. Mattila-Sandholm.1998. The effect of lactose derivatives on intestinal Lactic acid bacteria. VTT Biotechnology and Food Research,82,pp.249-256.

[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].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.

[7].Smart J., C. Pillidge, J. Garman.1993. Growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria on lactose and lactose-related mono-, di- and trisaccharides and correlation with distribution of β -galactosidase and phospho- β -galactosidase. J. Dairy Res.60:557.

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

Благодарност:

Изследванията са осъществени със средства по проект РД 08-266/2013 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

Докладът е рецензиран