

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА АНТИКОРОЗИОННАТА АКТИВНОСТ НА ВИДА
LACTOBACILLUS PLANTARUM ИЗОЛИРАН ОТ ДОМАШНО
ПРИГОТВЕНО КРАВЕ КИСЕЛО МЛЯКО****STUDY OF ANTICORROSION ACTIVITY OF STRAIN *LACTOBACILLUS*
PLANTARUM ISOLATED FROM COW HOMEMADE YOGURT****Цв. Игнатова-Иванова**
ШУ"Еп. К. Преславски"**К. Дойчинова**
ШУ"Еп. К. Преславски"**Д. Нешева**
ШУ"Еп. К. Преславски"**Р. Иванов**
ШУ"Еп. К. Преславски"**Abstract**

It was proved that strain Lactobacillus plantarum K synthesized exopolysaccharides in the presence of different concentration carbohydrate sucrosa - 4%. The obtained information was used in a study treating the anticorrosive properties of exopolysaccharides synthesized by the latter strains. The study of the corrosive stability in 10% HCl of steel samples was conducted on the gravimetric method. The rate of corrosion, the degree of protection, and the coefficient of protection have been calculated.

Keywords: corrosion, inhibitor, *Lactobacillus plantarum*, exopolisaccharides.

ВЪВЕДЕНИЕ

Екзополисахаридите (ЕПЗ), и олигозахаридите са изградени от две до десетки мономерни единици (монозахариди), свързани чрез глюкозидни връзки. Млечнокиселите бактерии продуцират екзополисахариди при култивиране на хранителни среди, богати на лесно усвоими въглехидратни субстрати. Количеството на формираните ЕПЗ зависи от фазата на растеж, температурата, рН и въглехидратният източник и не е непременно функция от растежа [2]. Продуценти на ЕПЗ са и млечно киселите бактерии от микрофлората на устната кухина, някои представители на *Streptococcus* и почвените бактерии *Leuconostoc*. В зависимост от техния състав и механизъм на биосинтеза те се разделят на два класа: хомополизахариди и хетерополизахариди [7,12].

Според проведените много *in vivo* и *in vitro* опити е показано, че млечнокиселите бактерии са способни да разграждат олигозахаридите и да ги използват като източник

на енергия. От друга страна, когато попаднат при неблагоприятни условия млечнокиселите бактерии са способни да продуцират екзополисахариди, като предпазват себе си от изсушаване, фагоцитоза и атака от бактериофаги, антибиотици или токсични компоненти, като метални йони, етанол и осмотичен стрес [9,13,14].

Все повече научни изследвания и разработки са насочени и към една нова област на приложение на ЕПЗ, а именно използването им като инхибитори на корозия на стоманени изделия [4].

ИЗЛОЖЕНИЕ

Целта на настоящата работа е да се изследват инхибиторните свойства на ЕПЗ, продуцирани от вида *Lactobacillus plantarum* - K, отглеждани върху модифицирана MRS среда, съдържаща 4% захароза.

За постигане на поставената цел са реализирани следните задачи:

1. Проведено е периодично култивиране на вида *L. plantarum* - K, изолиран от домашно приготвено краве кисело мляко.

2. Изследвана е в динамика растежната скорост.

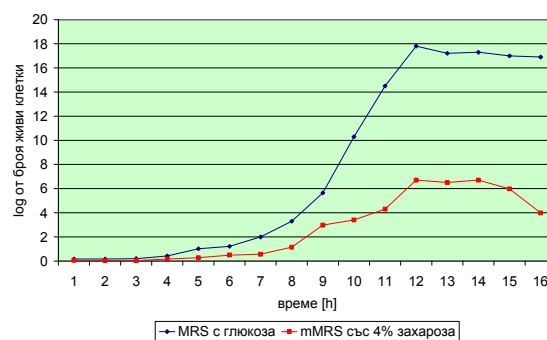
3. Проведено е изследване за антикорозионната активност на синтезираните ЕПЗ по гравиметричния метод. Определени са скоростта на корозия, степента на защита и коефициента на защита.

Материали и методи

Микроорганизми - Изследването в настоящата работа е проведено с домашно приготвено краве кисело мляко от с. Надарево от района на Североизточна България. Изолираният щам се съхранява при -80°C в течна среда MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) (MRS broth Fluka 69966) допълнена с 25% глицерол, като криотектант. След предварително обогатяване на културата в 0,5% обезмаслено мляко (Merck, KGaA, Darmstadt Germany) за 16-18 h при 37°C и серия от разреждания, културата е култивирана на агарова MRS среда.

Биохимичен анализ – основава се на способността на щам да усвоява 49 въглеродни източника. Проведен е с помощта на API тест система и обработка с компютърна програма. Щамът е отнесен към вида *Lactobacillus plantarum*.

Ферментация - За някои видове МКБ е установено, че в присъствието на захарозата като акцептор са способни да синтезират ЕПЗ – глюкоолигозахариди в културалната среда (извънклетъчно). Ферментацията е проведена в модифицирана MRS среда с въглехидратен източник 4% захароза (MERK). В хода на ферментацията през 1h е измервана оптичната плътност на спектрофотометър (UV/VIS Shimadzu, Japan) при дължина на вълната 650nm. Построени са растежни криви в случая на периодичното култивиране със захароза спрямо контрола в оригиналната среда. Получените резултати са представени на фигура 1.



Фиг. 1. Растежни криви при култивиране на различни въглеродни източници

Както се вижда от растежните криви при култивиране върху различни от глюкоза въглеродни източници се наблюдава удължаване на подготвителната lag-фаза. При култивиране на среда с 4% захароза lag-фазата продължава до 7-ия час на ферментацията. Дизахаридите, преди да се ферментират, претърпяват хидролиза до съответните хексози. Захарозата се хидролизира под действието на ензима захараза до D-глюкоза и D-фруктоза. Глюкозата се метаболизира по пътя на Ембден-Майерхоф-Парнас (ЕМП), а фруктозата се фосфорилира чрез киназа до фруктозо-6-фосфат и тогава се включва в пътя на ЕМП.

При провеждане на ферментационен експеримент [5,6] е показано, че захарозата слабо се ферментира от някои млечнокисели бактерии, влизащи в състава на тестото, но някои видове са способни да ферментират този дизахарид тъй като притежават ензими леванзахарази [11].

От получените резултати можем да кажем, че видът *L. plantarum* – K расте добре и дава висока плътност не само в обичайната среда с въглехидратен източник глюкоза, но и при случая на модифицирана среда с висок процент на използвания дизахарид захароза – 4%.

Антикорозионна активност – проведена е по гравиметричния метод [1]. Изчислени са скоростта на корозия, степента на защита, и коефициента на защита.

На 8-ия час при ферментиране на 4% захароза получената културална течност се центрофугира при 6000 об. за 15 мин. за от

страняване на клетките. Половината от всяка проба се обезбелтъчва с разтвори на Carrez I - р-р на $K_4[Fe(CN)_6 \times 3.H_2O]$ и Carrez II - р-р на $ZnSO_4 \times 7H_2O$ за 5 мин. на водна баня. За проследяване на антикорозионната активност са използвани стоманени образци, предварително претеглени и оразмерени. Образците са поставени в 10% р-ри на HCl, към които предварително е добавен инхибитор - 8 часова култура на щам К в среди (обезбелтъчени и необезбелтъчени) с 4% захароза (ЕПЗ) в отношение 1:100. Изпитването е проведено в термостат при 20°C в продължение на 72 часа. Успоредно са заложи и контролни образци в 10% р-ри на HCl без добавка на инхибитор. След 72-ия час (края на опита) образците са извадени от разтворите, измити на течаща вода, почистени, подсушени и отново претеглени на аналитична везна. На базата на данните за измененията в масата (ΔG) на образците вследствие на корозията и пълната им повърхнина (S) са пресметнати скоростта на корозия (K), степента на защита (Z) и коефициента на защита (γ) [5]. Обработените резултати са представени в табличен вид в таблица 1.

Таблица 1. Параметри на корозия на метални образци в 10%HCl.

№ проба	инхибитор (ЕПЗ)	K.10 ⁻³ , g/cm ² .h	Z, %	γ
Конт-рола	-	2,28	-	-
1	необезбелтъчен	1,35	40,79	1,69
2	обезбелтъчен	1,64	28,07	1,39
3	среда без ферментация	1,93	15,35	1,18

От данните в таблицата е видно, че протектиращи свойства са отчетени и в двата случая на използвания инхибитор (проби 1 и 2). Протекцията в обезбелтъчената проба най-вероятно се дължи само на синтезираните ЕПЗ, докато протекцията в необезбелтъчената проба се дължи освен на синтезираните ЕПЗ и на бофилма, който образуват микробните клетки. Синтезата на ЕПЗ не е функция от растежа на една микробна популация, но се влияе силно от рН на средата. Използваният от нас вид *L. plantarum* – К е факултативен хетероферментативен и следователно би трябвало да метаболизира въглехидратите до различни крайни продукти като млечна киселина, оцетна кисе-

лина и етилов алкохол. Това би довело до рязко понижаване на рН на средата, което обаче е нежелателно, защото стойности на рН под 4,6, а дори 5,0 могат да доведат до дезактивиране на ензимите, отговорни за синтезата на ЕПЗ. Така например за щамове от род *Leuconostoc* е установено, че максимална стойност на ензимната активност се отчита при стойности на рН между 5.0-5.2, а стойностите на рН под 5.0 понижават значително ензимната активност [3,8,10]. По тази причина анализът за антикорозионна активност е проведен с културална течност, получена в хода на ферментациите, когато рН е било между 5,0-4,5.



Фиг. 2. Външен вид на образците, третиран в 10%HCl в продължение на 72 часа.

Изводът, който можем да направим е, че вид *L. plantarum* – К при ферментация на захароза продуцира най-вероятно ЕПЗ, които имат добри протектиращи свойства.

Това се потвърждава и от снимките на фиг. 2, показващи външния вид на третираните образци. Снимките са направени с микроскоп лупа ОПТИКА (Italy) с увеличение WF 10x20.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На базата на получените резултати може да се каже, че видът *L. plantarum* – К вероятно продуцира ЕПЗ в присъствието на захароза като донор. Продуцираните ЕПЗ притежават добри инхибиторни свойства.

Acknowledgements

We would like to express our gratitude for the support of this work by research grant of NSF Bulgaria RNF 02-02-2009 and FSI 05-311/9.03.2010, FSI 05-310/9.03.2010 of Shumen University.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Райчев Р.,Л. Фачиков, В. Запрянова. 2002. Корозия и защита на материалите, Ръководство за лабораторни упражнения.София.

- [2] Cerning, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., and Topisirovic, L. 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by 49 *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3914-3919.
- [3] Dols M., M. Rемаud-Simeon and P. Monsan. 1998. Optimization of the production of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 and its application to the synthesis of non digestible glucooligosaccharides. In *Proceedings of the 2nd European Symposium on Biochemical Science* ed. Feyer de Azevedo, S., Ferreira, E.C., Luyben, K. Ch.A.M. and Osseweijer, P., pp.86-92. Porto: European Federation of Biotechnology, Section on Biochemical Engineering Science.
- [4] Finkenstadt, V.L., Bucur, C.B., Evans, K.O., Cote, G.L., Willett, J.L. 2010. Bacterial Exopolysaccharides For Corrosion Inhibition on Metal Substrates [abstract]. American Chemical Society. Paper #210.
- [5] Gobbetti M., A. Corsetti, J. Rossi.1994a. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. Appl Microbiology and Biotechnology 41,456-460.
- [6] Gobbetti M., A. Corsetti, J. Rossi.1994b. The sourdough microflora. Evolution of soluble carbohydrates during the sourdough fermentation. Microbiologie, Aliments, Nutrition 12, 9-15.
- [7] Jolly, L., S. J. Vincent, P. Duboc, and J. R. Neeser. 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 82:367-374.
- [8] Kobayashi M., K. Mihara and K. Matsuda. 1985. Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F: Characterisation of the enzyme bound to Sephadex gel. Agric. Biol. Chem., 50 (3), pp.551-556.
- [9] Roberts, I.S. 1995. Bacterial polysaccharides in sickness and in health. Microbiology 141, 2023- 2031.
- [10] Robyt J., D. Kim and L. Yu. 1995. Mechanism of dextran activation of dextranucrase. Carbohydr Res 266, pp.293-299.
- [11] Tieking, M., M. Korakli, M. A. Ehrmann, M. G. Ganzle, and R. F. Vogel. 2003. In situ production of exopolysaccharides during Sourdough fermentation by cereal and
- [12] Welman, A. D. and I. S. Maddox. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends Biotechnol. 21:269-274.
- [13] Weiner, R., Langille, S., and Quintero, E. 1995. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. J. Ind. Microbiol. 15, 339-346.
- [14] Whitfield, C. 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. Can. J. Microbiol. 34, 415-420.