ИСЗЛЕДВАНЕ НА АНТИМИКРОБНАТА АКТИВНОСТ НА МЛЕЧНО КИСЕЛИ БАКТЕРИИ ОТ *РОД LACTOBACILLUS* ИЗОЛИРАНИ ОТ ДОМАШНО ПРИГОТВЕНИ МЛЕЧНИ ПРОДУКТИ

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA FROM *LACTOBACILLUS SP.* ISOLATED FROM DAIRY PRODUCTS

Цв. Игнатова-Иванова
ШУ"Еп. К. Преславски"

Н. Ерменлиева
ШУ"Еп. К. Преславски"

С. Мехмедова
ШУ"Еп. К. Преславски"

Р. Иванов
ШУ"Еп. К. Преславски"

Abstract

Four Lactobacillus strains were isolated from two types Balkan home made yogurt and white brined cheese. These stains were tested for their ability produce antimicrobials agains Gram positive and Gram negative bacteria as Escherichia coli HB101, Staphilococcus aureus ATCC39592, and Bacillus cereus ATCC 6633. The obtained results indicated that some of the strains produced bacteriocin-like substances.

Keywords: antimicrobial activity, *Lactobacillus sp*. lactic acid bacteria, dairy product.

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 [6,7, 9,10,16] 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 Bezkorovainy, (2001) [2];

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" [7];

2. "Живи микробни хранителни елементи, които са полезни за здравето" Съобщено от Salminen (1998) [14] и възприето като концепция и дефинирано от Европейската асоциация на консуматорите FUFOSE [4].

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 (2002) [5] е възприета неотдавна и от Интернационалната научна асоциация за про- и пребиотици [13].

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

Обикновенно ролята на пробиотици се изпълнява от млечно киселите бактерии и бифидобактерии.

Известно е, че МКБ са естественни 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

ИЗЛОЖЕНИЕ

Материали и методи

Микроорганизми - Изследванията в настоящата работа са проведени с два вида домашно приготвени сирена и млека от района на Североизточна България, от с. Кочово – домашно приготвено краве сирене и от с. Надарево – краве мляко и от с. Белокопитово – домашно приготвено овче сирене и от с. Дибич – овче мляко. За удобство щамовете изолиран от краве сирене и мляко са означен с префикс – К, а тези изолирани от овче сирене и мляко с префикс – О. Щамовете са изолирани от домашно приготвени млечни продукти - сирена 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. След предварително обогатяване на културата в 0,5% обезмаслено мляко (Merck, KGaA, Darmstadt Germany) за 16-18 h при 37^{0}C и серия от разреждания, културата е култивирана на агарова MRS среда.

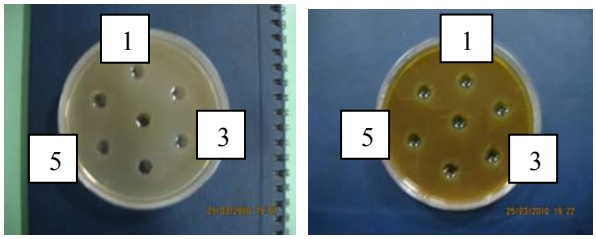
Ферментацията е проведена в модифицирана MRS среда с въглехидратен източник фруктоолигозахарид - ФОЗ (Raftilose P95, Orafti, Belgium) и глюкоолигозахарид - ГОЗ (BioEcolians, Solabia, France).

С помощта на API тест система и обработка с компютърна програма щамовете изолирани от киселите млека бяха отнесени към вида *Lactobacillus plantarum*; щамът изолиран от овче сирене към вида *Lactobacillus casei* и щамът изолиран от краве сирене към вида *Lactobacillus helveticus.*

Антибактериална активност - Анализът за антибактериална активност на изпитваните щамове е проведен по метода на дифузия по [15,1]. Активността на щамовете е определена спрямо тест култури (*Escherichia coli HB101, Staphilococcus aureus* ATCC39592 и *Bacillus cereus* ATCC 6633). Щамът от *E. coli ATCC* (American Type Culture Collection) 25922 е поддържан на хранителна среда LB (Luria-Bertani) (Sighma, St. Louis, MO,USA), щамът *St. aureus* върху месопептонен бульон, щама *B. cereus* върху среда със състав [g/l]: глюкоза – 2; натриев ацетат – 2; дрождев екстракт – 2; KH_2PO_4 – 1,64; K_2HPO_4 – 2,64. И трите щама се съхраняват при –80^{0}C в съответната бульон среда с 20% глицерол. Преди експеримента щамовете са култивирани на съответните среди за 24 h при 30^{0}C. След култивиране на щамовете при стандартни условия са накапани по 100 µl от неутрализираните супернатанти, получени след центрофугиране при 10000 x g за 10 мин. в предварително подготвени ямки в агара , инокулиран със съответната тест култура. Периодът на дифундиране е 2 h при 4^{0}C. Активността е отчитана в mm зони.

Вторият вариант на теста бе проведен без да се неутрализират супернатантите.

Резултатите от двукратно повторените опити са представени в Фигура 1 и Фигура 2.

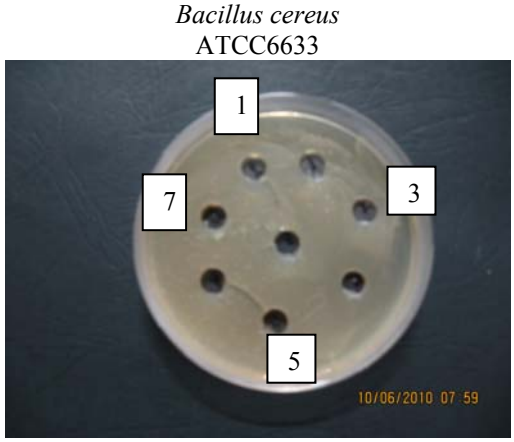


Фиг. 1. *Инхибиторна активност на щамовете без неутрализиране на супернатантите L.helveticus и L. casei. Легенда: 1- L. casei на ФОС; 2-L. helveticus на ФОС; 3-L. plantarumK на ФОЗ; 4 L. plantarum-O на ФОЗ; 5- L. casei на ГОЗ; 6 L. helveticus – на ГОЗ;7-L. plantarum на ГОЗ.*

От данните на фигурата може да се каже, че и четирите щама проявяват инхибиторна активност спрямо патогените *Staphilococcus aureus* ATCC39592 и *Escherichia coli* HB101. Само при култивиране на щама от краве сирене на ГОЗ (точка 7) не беше отчетена зона на активност. Спрямо *Bacillus cereus* не бяха отчетени зони на активност в нито един от случаите.

Видът *L. plantarum* е факултативен хетероферментативен вид, а другите два вида *L. casei* и *L. helveticus* са факултативни хомоферментативни видове. Логично е при ферментацията на хетероферментативните видове да се получат, като крайни продукти смеси от киселини. Факултативните МКБ могат вероятно по изключение да ферментират необичайни въглехидратни източници, като ФОЗ и ГОЗ и освен млечна киселина, като крайни продукти да се получат например ацетат и етилов алкохол. Тези наши резултати са потвърдени и при предишни наши изследвания [8], където е показано, че дори и облигатните хомоферментативни МКБ при ферментация на необичайни източници на въглерод могат да променят ферментационния си профил до крайни продукти типични за смесени ферментации.

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



Фиг. 2. *Инхибиторна активност на щамовете при неутрализиране на супернатантите L. helveticus и L. casei. Легенда: 1L.plantarumK на ФОЗ; 2l.plantarumO на ФОЗ;3. L.plantarumK на ГОЗ; 4L.plantarum O на ГОЗ; 5 L. casei на ФОЗ; 6 L. casei наГОЗ ; 7L. helveticus на ФОЗ; 8L. helveticusO на ГОЗ.*

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 синтезата 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 недисоцирани 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 й и намаляването на ензимната активност на редица ензими [3,12].

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. [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От получените от нас резултати можем да кажем, че и четирите щама проявяват антибактериална активност спрямо различни патогени, както при киселата така и при неутрализираната супренатанта. В първият случай това се дължи вероятно на образуваните се като крайни продукти киселини, а

във вторият случай може да се касае за синтезата на вещества с белтъчна природа.

Способността на щамовете 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.

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] 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;

[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] 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.

[5] FAO/European Commission Cooperative Programme. Review of FAO/EC. Agricultural development projects. 2001 – 2002.

[6] 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.

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

[8] Ignatova-Ivanova, Ts., I. Iliev, N. Kirilov, T. Vassileva, M. Dalgalarrondo, T. Haertle, J-M, Chobert & I. Ivanova, (2009) Journal Agric. Food Chem., 57, 9496–9502, DOI:10.1021/jf901684z.

[9] 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.

[10] Marteau, P., Vesa, T., and Rambaud, J.C. 1997. In R. Fuller (ed) Probiotics 2:application and practical aspects. p.65- 88. Chapman and Hall, London, U.K.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 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.

[14] Salminen, S., Roberfroid, M., Ramos, P., and Fonden, R. 1998. Prebiotic substrates and lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd edition. eds. Salminen, S. and von Wright, A. pp. 211-253. Marcel Dekker, Inc., New York.

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

[16] Tannock, G. W., ed. 1997. A fresh lokk at the intestinal microflora. In:*Probiotics: a critical review*. Horizon Scientific Press, New York, Wymondham, pp.5-14.