

Probiotsko djelovanje *Bifidobacterium* vrsta

Mira Malija i Ljerka Kršev

Pregledni članak — Review

UDK: 579.873.13

Sažetak

Bifidobakterije su Gram (+), striktno anaerobni te nepokretni i nesporogeni štapići različitog morfološkog oblika. Poznate su 24 vrste bifidobakterija, a međusobno se razlikuju po DNA-hibridizaciji, imunokemijskim faktorima i transketolaznim izoenzimima.

Važnost bifidobakterija se posebno ističe u povoljnom djelovanju na zdravlje čovjeka. Ove bakterije se mogu razvijati i opstati u probavnom sustavu čovjeka te proizvoditi neke važne faktore koji sprečavaju rast patogenih bakterija. Također, ističe se njihova važnost i pri obnavljanju zdravstveno povoljne crijevne flore u pacijenata koji su liječeni antibioticima.

Navodi se da bifidobakterije razlažu kancerogene N-nitrozamine. Također, pacijentima s bolesnom jetrom, narušene zdravstveno povoljne crijevne flore, smanjuju količinu amonijaka u krvi, količinu fenola i aminodušikovih spojeva, a što pospješuje obnavljanje već narušene zastupljenosti zdravstveno povoljnih crijevnih mikroorganizama.

*Od 24 vrste, koliko ih je do danas poznato, npr. vrsta *Bifidobacterium bifidum* se koristi u terapiji nekrotičnih tumora te portalne encefalopatije tako što smanjuje količinu amonijaka u gastrointestinalnom traktu.*

*Razne studije su pokazale da vrsta *Bifidobacterium infantis* utječe na smanjenje broja malignih stanica. Pretpostavlja se i važna uloga bifidobakterija u poticanju imunološkog sustava čovjeka. U novije vrijeme posebnu pozornost privlače pozitivni rezultati pokusa na životinjama, čiji imunološki sustav bolje funkcionira nakon trošenja laktobakterija. Navodi se da su ovi rezultati posebno važni za osobe oboljele od AIDS-a.*

Ipak, potrebno je još mnogo istraživanja da bi se potvrdili ovi prvi pozitivni nagovještaji.

*Riječi natuknice: *Bifidobacterium* vrste, djelovanje na zdravlje čovjeka, terapija nekrotičnih tumora*

Uvod

Rod *Bifidobacterium* pripada porodici *Actinomycetaceae*. Prema »Bergey's Manual of Systematic Bacteriology« (1986) rod *Bifidobacterium* obuhvaća 24 do danas poznate vrste: *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium boum*, *Bifidobacterium globosum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium suis*, *Bifidobacterium galinarum*, *Bifidobacterium pullorum*, *Bifidobacterium minimum*, *Bifidobacte-*

rium animalis, *Bifidobacterium subtile*, *Bifidobacterium indicum*, *Bifidobacterium asteroides*, (Bezkorovainy, 1989).

Neke od navedenih vrsta nalaze se u stolici dojenčadi i odraslih. Njihov značaj i povoljno djelovanje na zdravlje u humanoj prehrani, ističe se već nekoliko godina. Naime, ove bakterije se mogu razvijati i opstati u probavnom sustavu čovjeka te na taj način ometati rast patogenih bakterija. Također, ističe se i njihova važnost pri obnavljanju za zdravlje povoljne crijevne populacije mikroorganizama u pacijenata koji su liječeni antibioticima. Zbog navedenih razloga, bifidobakterije se sve češće upotrebljavaju i u mljekarskoj industriji za proizvodnju fermentiranih mliječnih napitaka. Trošenje fermentiranih mliječnih napitaka koji sadržavaju bifidobakterije, djeluje povoljno na zdravstveno stanje organizma, jača njegovu zdravstvenu otpornost i značajno sudjeluje u liječenju mnogih zdravstvenih poremećaja. Međutim, vrlo je važno zbog djelotvornosti, svakodnevno u organizam unijeti, s mliječim proizvodom, žive stanice bifidobakterija. Samo na taj način osigurava se dovoljan broj stanica bifidobakterija u probavnom traktu što povoljno djeluje na zdravstveno stanje organizma.

Osnovne karakteristike bifidobakterija

Bifidobakterije su Gram (+), nepokretne i nesporogene bakterije, vrlo promjenjivog štapičastog oblika. Svježe izolirane stanice oblika od jednostavnog do razgranatog Y ili V te spatulastog ili čunjastog oblika. U nepovoljnoj uzgojnoj podlozi bifidobakterije mijenjaju se morfološki. Stanice se granaju, što se ocjenjuje degenerativnim promjenama jer su u svojoj prirodnoj hranjivoj podlozi u obliku štapića. Na promjenu morfologije bifidobakterija, prema Glicku i sur. (1960), utječe nedostatak N-acetil-amino šećera u hranjivoj podlozi, a prema Kojimu i sur. (1968—1970 a, b) i uloga Ca-iona također je važna jer sprečavaju degeneraciju i reguliraju diobu stanice (Rašić i Kurmann, 1978). Bifidobakterije, iako striktni anaerobi, mogu rasti u prisutnosti kisika. Zahtjevi svih vrsta bifidobakterija za anerobne uvjete rasta nisu isti. Neke vrste, manje osjetljive na prisutnost kisika, mogu imati slabu katalaznu aktivnost koja uklanja tragove H_2O_2 , te takve vrste rastu samo ispod određene vrijednosti oksido-redukcijskog potencijala. Neke vrste, većinom osjetljive na prisutnost kisika, nakupljanje H_2O_2 inaktivira fruktoza — 6 — fosfat — fosfatketolazu, najvažniji enzim fermentacijskog puta u bifidobakterijama. Neke bifidobakterije, osjetljive na prisutnost kisika, ne nakupljaju H_2O_2 jer zahtijevaju nisku vrijednost oksido-redukcijskog potencijala za rast i fermentaciju. Kisik može spriječiti rast zbog toga što stvara previsok oksido-redukcijski potencijal (Rašić i Kurmann, 1978). Bifidobakterije ne reduciraju nitrate, ne proizvode katalazu, a fermentiraju: laktazu, glukozu, galaktozu i fruktozu preko fruktoza — 6 — fosfat fermentacijskog puta. Proizvode octenu i L (+) mliječnu kiselinu u omjeru 1,5:1 i ne proizvode plin, što je najvažnija razlika u odnosu na vrste roda *Lactobacillus* koji proizvode octenu i mliječnu kiselinu i CO_2 . Sve vrste bifidobakterija sadrže enzim fruktoza — 6 — fosfat — fosfoketolazu, a međusobno se razlikuju po DNA — hibridizaciji, i imunokemijskim faktorima i transketolaznim enzimima (Bezkorovainy i Miller — Catchpole, 1989).

Faktori koji utječu na rast bifidobakterija

Rast bifidobakterija pomažu tvari koje snižavaju redoks — potencijal u hranjivoj podlozi, kao askorbinska kiselina i cistein. Također, rast bifidobakterija pomažu: organske tvari (ekstrakt pankreasa), ekstrakt nekih biljaka (rajčice, kukuruza, crvene mrkve), ekstrakt i autolizat kvasca, ugljikohidrati (laktoza, hidrolizirana laktoza, glukoza) i organske N-tvari (hidrolizat kazeina, peptidi) (Kurmann, 1988). Neki sojevi bifidobakterija koriste amonijak kao izvor dušika, dok drugi trebaju organski dušik, a sojevi vrste *Bifidobacterium* za svoj rast zahtijevaju peptide od kojih su najvažniji saharidi koji sadrže N-glukozamin (Rašić i Kurmann, 1983). Za najveći broj vrsta bifidobakterija, optimalna temperatura rasta je od 36—38°C i niže (Rašić i Kurmann, 1978).

Zastupljenost bifidobakterija u djece

Tisler je 1900-te godine prvi otkrio u stolici dojenčadi hranjene majčinim mlijekom, bakteriju *Bifidobacterium bifidum*, za koju je ustvrdio da nije prisutna u stolici dojenčadi koja nisu bila hranjena majčinim mlijekom (već modificiranim mlijekom za dojenčad). Nakon dugotrajnijeg istraživanja, zaključio je da majčino mlijeko sadrži tvari koju je nazvao »bifidus faktor«. »Bifidus faktor« potiče razmnožavanje bifidobakterija u probavnom traktu dojenčadi. Vrsta *B. bifidum subspec. pennsylvanicus* koristi za svoj rast saharide koji sadrže N-acetil-glukozamin, a koji je prisutan samo u majčinom mlijeku (Rašić, 1983). Dojenčad hranjena majčinim mlijekom rjeđe oboljeva od zaraznih bolesti crijeva od dojenčadi koja nisu hranjena majčinim mlijekom (Bezkorovainy i Miller-Catchpole, 1989).

Rezultati mnogih istraživanja potvrdili su također prisustvo velikog broja bifidobakterija u probavnom sustavu djece hranjene majčinim mlijekom gdje ih ima oko 99% od ukupne populacije mikroorganizama, dok laktobacila, enterokoka i koliformnih bakterija ima oko 1% (Rašić, 1983).

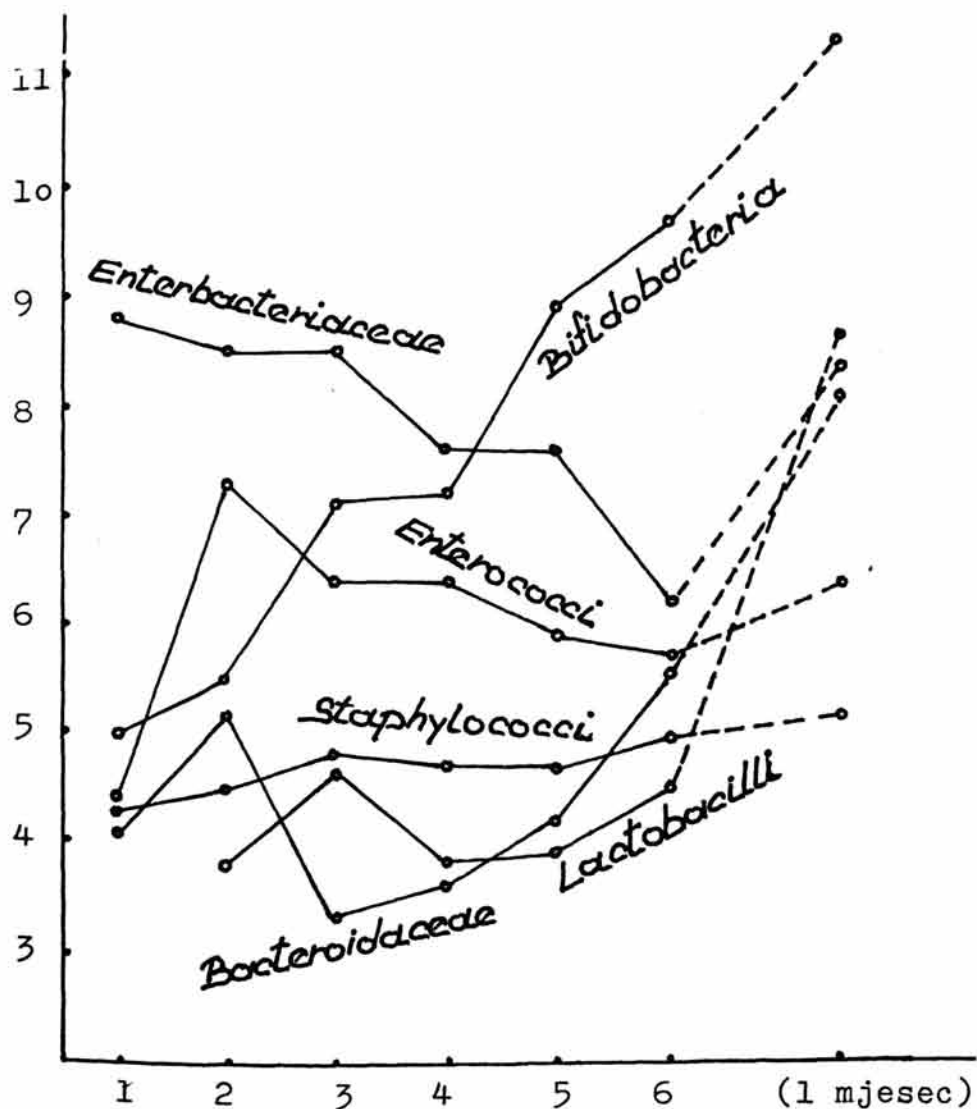
Podaci prikazani u dijagramima 1. i 2. prikazuju promjene u sastavu populacije mikroorganizama (u stolici) dojenčadi hranjene majčinim mlijekom i dojenčadi koja nisu bila hranjena majčinim mlijekom u prvim danima života.

Podaci prikazani u dijagramu 1 potvrđuju da su u populaciji mikroorganizama stolice dojenčadi hranjene majčinim mlijekom, već nakon pet dana života najbrojnije bifidobakterije ($10^9/g$), a nakon mjesec dana života broj bifidobakterija je $10^{11}/g$. To potvrđuje, da ishrana majčinim mlijekom osigurava zaštitu dojenčadi od crijevnih infekcija.

U dijagramu 2, uočava se da je u mikrobnjoj populaciji stolice dojenčadi, koja nisu bila hranjena majčinim mlijekom, nakon pet dana života prisutno $10^7/g$ bifidobakterija, a nakon mjesec dana života broj je $10^{10}/g$. Bezkorovainy i Miller-Catchpole (1989) navode da je $10^7/g$ bifidobakterija u probavnom traktu dovoljan da zaustavi rast stafilokoka, ali za inhibiranje rasta npr. patogenih enterokoka, potreban je veći broj bifidobakterija.

Dijagram 1. Populacija mikroorganizama u stolici dojenčadi hranjene majčinim mlijekom (Bezkorovainy i Miller-Catchpole, 1989)

Diagram 1 Changes in faeces bacterial population of breastfed infants as a function of age during the first week of life

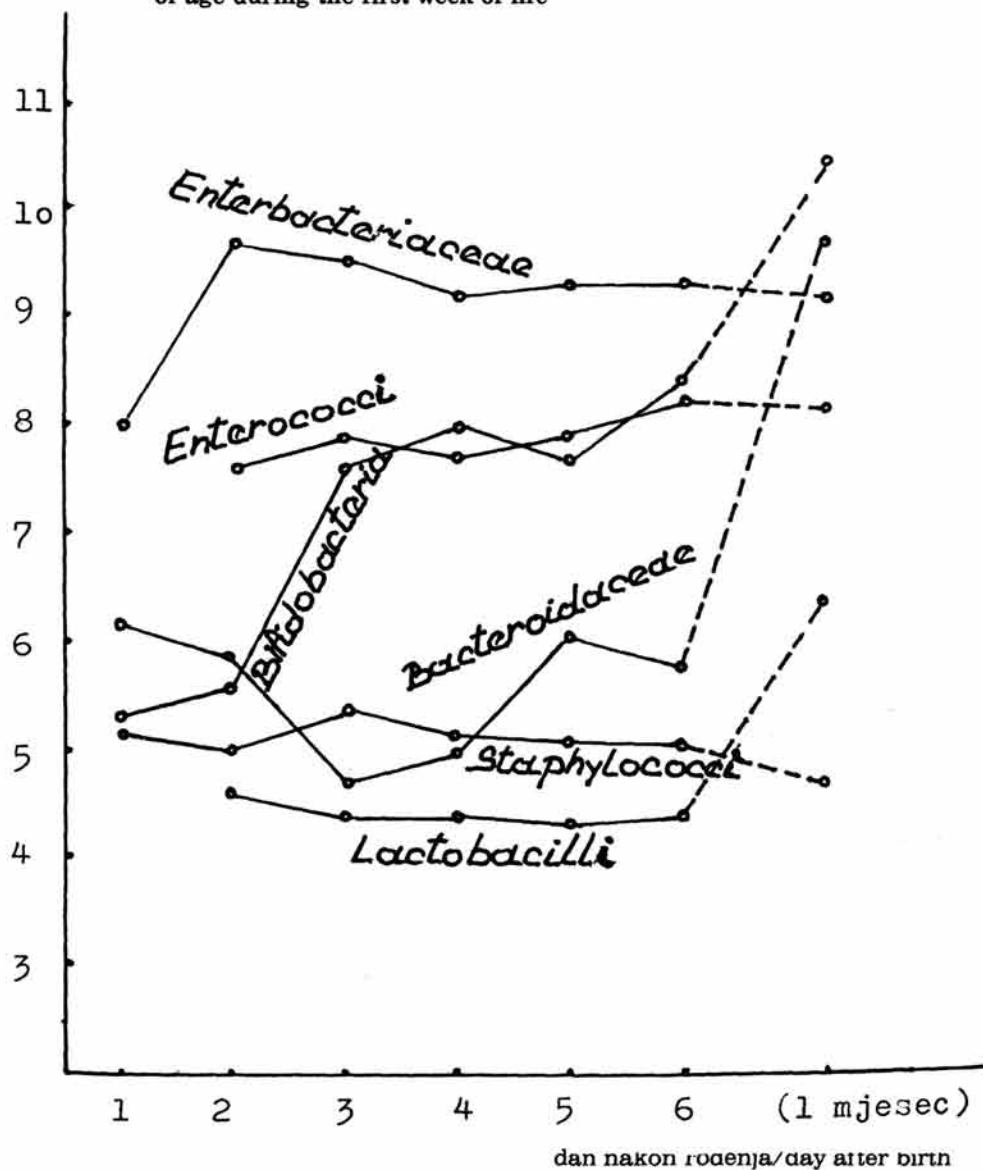


Log broja bakterija po gramu stolice
Log no. of Bacteria per gram faeces

dan nakon rođenja/day after birth

Dijagram 2. Populacija mikroorganizama u stolici dojenčadi koja nisu hranjena majčini mlijekom (Bezkorovainy i Miller-Catchpole, 1989)

Dijagram 2. Changes in faeces bacterial population of bottle-fed infants as a function of age during the first week of life



Log broja bakterija po gramu stolice
Log no. of Bacteria per gram faeces

Bifidobakterije u kliničkoj mikrobiologiji i medicini

Bifidobakterije su uobičajena populacija mikroorganizama u ustima, vagini, cerviksu, tankom crijevu i debelom crijevu čovjeka. Najbrojnije i najčešće prisutne vrste su: *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. dentium* (Kršev, 1989). Ove bakterije mogu se razvijati i opstati u probavnom sustavu čovjeka i tijekom rasta proizvoditi neke važne tvari koje sprečavaju rast patogenih bakterija. Drugim riječima, bifidobakterije brane organizam od crijevnih infekcija koje uzrokuju npr. *Salmonella* i *Shigella* vrste te enteropatogena *Escherichia coli* (Brawn i Townsley, 1970). U literaturi (Rašić, 1983) se navodi da bifidobakterije proizvode L (+) mliječnu kiselinu i octenu kiselinu, koje osiguravaju niži pH probavnog trakta, a što zaustavlja rast nepoželjnih truležnih pa i patogenih bakterija. Octena kiselina snažnije ometa rast Gram (–) bakterija od mliječne kiseline, a bifidobakterije proizvode je u većoj količini nego neke druge bakterije mliječne kiseline.

Ističe se važnost bifidobakterija pri obnavljanju zdravstveno povoljnih mikroorganizama u crijevima pacijenata liječenih antibioticima ili u pacijenata nepovoljnog sastava mikroorganizama u crijevima.

Bifidobakterije ne reduciraju nitrata, što znači da za svoj rast i razvoj ne koriste nitrata čijom bi se redukcijom povećala količina nitrita, a koji, ako su u većoj količini, mogu biti toksični za organizam. Smatra se da nitritni ioni oksidiraju željezo u hemoglobinu i stvaraju methemoglobin koji ne prenosi kisik na slobodnoj valenciji željeza, a što uvjetuje komatozno stanje (Rašić, 1983). Važan podatak, koji navode Rowland i Gross (1975), je da bifidobakterije razlažu kancerogene nitrozamine (kancerogene tvari koje nastaju spajanjem nitrita i aminokiselina). Također, uočeno je njihovo povoljno djelovanje u pacijenata s bolesnom jetrom. Utvrđeno je smanjenje količine amonijaka u krvi, kao i količine fenola i aminodušikovih spojeva u pacijenata koji su redovito trošili fermentirane mliječne proizvode, a koji su sadržavali aktivne stanice bifidobakterija (Poupard i sur., 1973).

Od 24 vrste, koliko je do danas poznato bifidobakterija, *Bifidobacterium bifidum* se koristi u terapiji nekrotičnih tumora i portalne encefalopatije. Uočeno je da se trošenjem proizvoda koji sadržavaju *B. bifidum*, smanjuje količina amonijaka u gastrointestinalnom traktu, što je zdravstveno vrlo povoljno. Dovoljna količina amonijaka može izazvati neuralgične simptome pa i stanja kome (Bezkorovainy i Miller-Catchpole, 1989). Proces smanjenja količine amonijaka teče tako da pri pomaku kiselo-lužnate ravnoteže na kiselu stranu (koju mogu svojim djelovanjem u probavnom traktu osigurati bifidobakterije) amonijak prelazi u NH_4^+ – kation, koji mnogo teže ulazi u stanice. Suprotno ako se ravnoteža pomakne na lužnatu stranu, ostaje veća količina amonijaka, koji lako ulazi u stanicu. Povoljno djelovanje bifidobakterija u procesu proizvodnje i ometanju zasićenja amonijakom, istraženo je »in vivo«, tj. pacijenti su trošili mlijeko koje je sadržavalo stanice *B. bifidum*. Istraživanje je trajalo od 2–26 mjeseci, a rezultati su pokazali: smanjenje amonijaka u krvi, smanjenje slobodnog L-aminonitrogena, smanjenje fenola (Bezkorovainy i Miller-Catchpole, 1989).

Mnogobrojne studije utjecaja bifidokaterija na zdravstveno stanje ljudi su pokazale da *B. infantis* djeluje tako da u bolesnom organizmu smanjuje broj malignih stanica, a da vrsta *B. longum* proizvodi izvanstanični polisaharid koji pokazuje antitumorsko djelovanje (Bezkorovainy i Miller-Catchpole, 1989). Neka novija istraživanja (Tihole, 1988) ističu i svojstvo bifidobakterija na jačanje imunološkog sustava čovjeka. Iako još istraživanja nisu primjenjena na ljudima, neki pozitivni rezultati nakon pokusa provedenih s istim ciljem na životinjama potiču da se ista istraživanja provedu u osoba kojima je oslabljen ili oštećen imunološki sustav tj. u oboljelih od AIDS-a.

Bifidobakterije i njihova upotreba u mljekarskoj industriji

U novije vrijeme sve češće se neke vrste bifidobakterija upotrebljavaju u proizvodnji fermentiranih mliječnih napitaka. Trošenjem fermentiranih mliječnih napitaka koji sadrže bifidobakterije, u organizam se unose aktivne stanice bifidobakterija koje pomažu pri uspostavljanju ili pri obnavljanju povoljne crijevne populacije mikroorganizama. Za proizvodnju fermentiranih mliječnih napitaka, koriste se čiste kulture bifidobakterija ili mješovite kulture, tj. kulture bifidobakterija u smjesi s odabranim bakterijama mliječne kiseline (Kršev, 1989). Prednosti mješovitih starter kultura su: upotreba kultura sa širokim rasponom djelovanja, mogućnost uzgoja striktnih anaeroba u mlijeku te često bolji rast bakterija iz sastava čiste kulture i što je vrlo važno bolji okus i bolja konzistencija gotovih proizvoda (Kurmanna, 1988).

Mlijeko inače sadrži sve bitne tvari za uzgoj i rast bifidobakterija, no ipak bifidobakterije su spori proizvođači kiseline u takvoj uzgojnoj podlozi (Kršev, 1989). Najčešći uzrok tome je što neke hranjive tvari u mlijeku nisu u najpovoljnijem obliku za upotrebu te je ponekad potrebna duža adaptacija pa i dodatak aktivatora rasta za uzgoj sojeva bifidobakterija u mlijeku. Za proizvodnju fermentiranih mliječnih napitaka uglavnom se koriste vrste bifidobakterija koje hidroliziraju laktozu i fermentiraju produkte njene hidrolize, a to su: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve* i *B. infantis* (Kršev, 1989).

U tablici 1 navedeni su neki od fermentiranih napitaka, za čiju se pripremu upotrebljavaju odabrane vrste bifidobakterija.

Prednost fermentiranih mliječnih proizvoda za čiju pripremu se koriste bifidobakterije, osim velike važnosti za zdravlje, je i u tome što je naknadno kiseljenje gotovih proizvoda tijekom čuvanja slabo izraženo (Klupsch, 1983). Da bi proizvod sadržavao dovoljan broj stanica bifidobakterija, potrebno je u proizvodnji dodati veći postotak inokuluma (5—10%) (Schuler-Malyoth i dr. 1968). Međutim, prema Hansen u (1985), veći broj bifidobakterija može doprijeti octenom kvarenju proizvoda, što znači da je potrebno istražiti koji postotak inokuluma je najpogodniji za proizvodnju.

Prednosti fermentiranih mliječnih proizvoda u prehrani koji sadrže aktivne stanice bifidobakterija u odnosu na nefermentirane proizvode je u boljoj probavljivosti jer parcijalna hidroliza mliječnih proteina u fermentiranom proizvodu povećava količinu slobodnih aminokiselina i peptida i olakšava djelovanje probavnih enzima (Rašić, 1983).

Tablica 1. Kiselo mliječni napici pripremljeni čistom kulturom bifidobakterija ili u zajednici s drugim bakterijama mliječne kiseline (Kršev, 1989)

Table 1. Sour milk drinks made using combined starter culture containing Bifidobacteria and others lactic acid Bacteria (Kršev, 1989)

Kiselo mliječni napitak Sour milk drink	Mikroorganizmi — Microorganisms
BIFIDO-MLIJEKO Bifido milk	— <i>Bifidobacterium bifidum</i> ili — <i>B. longum</i>
BIFIGURT	— <i>B. bifidum</i> — <i>Streptococcus thermophilus</i>
BIOGARDE	— <i>B. bifidum</i> — <i>Lactobacillus acidophilus</i> — <i>S. thermophilus</i>
SPECIJALNI JOGURT Special jogurt	— <i>B. bifidum</i> — <i>S. thermophilus</i> — <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
KULTURA — CULTURE	— <i>B. bifidum</i> — <i>L. acidophilus</i>
MIL-MIL	— <i>B. bifidum</i> — <i>B. breve</i> — <i>L. acidophilus</i>

Stanice bifidobakterija unijete hranom preživljavaju i ostaju u probavnom traktu jer im odgovara pH želučane sredine. Konačno, a što je veoma važno, bolja je apsorpcija kalcija iz fermentiranih mliječnih napitaka nego iz nefermentiranih proizvoda (Rašić, 1983).

PROBIOTY EFFECT OF BIFIDOBACTERIA SPECIES

Summary

Bifidobacteria are Gram-positive, strictly anaerobic rods, motionless and nonspore-forming microorganisms of different forms. At least 24 distinct **Bifidobacteria** species are known, and can be distinguished from each other by DNA — hybridization techniques and by the immunochemical properties of their transketolase isoenzymes.

Bifidobacteria have a very beneficial effect on the health of man. They can exist and develop in human digestive system and they can produce important factors which prevent the growth of pathogenic microorganisms.

They can also rehabilitate intestinal gut flora in patients on antibiotic therapy, or in patients whose intestinal flora has been disturbed for some other reason.

Bifidobacteria dissolve carcinogenic N-nitrosamines. They reduce quantity of ammonia, free phenols and free α -amino nitrogen in the blood of patients with chronic liver disease.

Among 24 species, known by now, **Bifidobacterium bifidum** is used in therapy of necrotic tumors, portal systemic encephalopathy as it reduces quantity of ammonia in the gastrointestinal tract.

Bifidobacterium infantis reduces the number of malignant cells.

Bifidobacteria play an important role in strengthening of the immune system of man. This finding can be used in medical treatment of people infected by AIDS.

It is necessary to continue investigations of **Bifidobacteria** in the future, to confirm present results.

Additional index words: *Bifidobacterium species, characteristics, growth conditions, presence in children, application in clinical medicine, use in dairy industry.*

Literatura

- BEZKOROVAINY, A., MILLER-CATCHPOLE, R. (1989): Biochemistry and Physiology of *Bifidobacteria*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- BERGEY'S manual of systematic bacteriology (1986): Vol. 2, The Williams and Wilkins Co., Baltimore — London.
- BROWN, L. D., TOWNSLEY, P. M. (1970): Fermentation of milk by *Lactobacillus bifidus* — bf. I. *Inst. Can. Technol. Aliment.*, 3, 121.
- HANSEN, R. (1985): *Nort European Dairy Journal* 51, 79—83.
- KLUPSCH, H. I. (1983): *Nort European Dairy Journal* 49, 29—32; cit: Tamime, A. Y. i Robinson, R. K., Fermented milks and their future trends. Part II. Technological aspects, *Journal of Dairy Research*, 55, 281—307, (1988).
- KRŠEV, LJ. (1989): Mikrobne kulture u proizvodnji mliječnih proizvoda, Udruženje mljekarskih radnika SR Hrvatske, Zagreb
- KURMANN, J. A. (1988): IDF, B — Doc, 139
- POUPARD, J. A., HASAIN, I., NORRIS, R. F. (1973): Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol. Rev.* 37, 136.
- RAŠIĆ, J. LJ. (1983): *North Eur. Dairy J.* 49, 80.
- RAŠIĆ, J. LJ., KURMAN, J. A. (1978): *Bifidobacteria* and their Role, Birkhauser Verlag, Basel, Boston.
- RAŠIĆ, J. LJ., KURMANN, J. A. (1983): *Bifidobacteria* and their Role. Basel, Birkhauser Verlag. (Experimentia 39 Supplement).
- ROWLAND, J. R., GROSSO, P. (1975): Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* 29, 7.

SCHULER-MALYOTH, R., RUPPERT, A., MULLER, F. (1968): *Milchwissenschaft* 23, 554—558; cit: Tamime, A. Y., Robinson, R. K. Fermented milks and their future trends. Part II. Technological aspects, *Journal of Dairy Research*, 55, 281—307, (1988).

TIHOLE, F. (1988): Possible treatment of AIDS patients with live Lactobacteria, Medical Hypotheses, Paris, France.

Adrese autora — Authors' addresses:

Mira Malija, dipl. ing.
Prof. dr. Ljerka Kršev
Mljekara »Dukat« d.d., Zagreb

Primljeno — Received

10. 5. 1993