

Sinbiotička svojstva *Lactobacillus acidophilus* M92

Jagoda Šušković, Blaženka Kos, Jadranka Frece, Sunčica Beluhan, Srećko Matošić

Izvorni znanstveni rad – Original scientific paper

UDK:579.864.1

Sažetak

Znanstveni temelj za razvoj probiotika, prebiotika ili njihove kombinirane primjene (sinbiotika) proizlazi iz spoznaje da gastrointestinalna mikroflora štiti domaćina (ljude ili životinje) od naseljavanja neautohtonih mikroorganizama u crijevni sustav. Primjena probiotika (živih, korisnih mikroorganizama) i prebiotika (neprobavljivih oligosaharida), kao dodataka ljudskoj ili animalnoj hrani, korisno djeluje na domaćina poboljšavajući ravnotežu njegove crijevne mikroflore. U ovom radu je predstavljen bakterijski soj *Lactobacillus acidophilus* M92, a izabran je za probiotičku aktivnost prema složenim, znanstvenim *in vitro* selekcijskim kriterijima. Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) načinjena je točna taksonomska identifikacija *L. acidophilus* M92. Određena je prisutnost površinskih proteina, hidrofobnost, autoagregacija, koagregacija i adhezija *L. acidophilus* M92 na epitelne stanice tankog crijeva svinje. Budući da je sinbiotički koncept u zadnjih nekoliko godina postao dio probiotičkog koncepta, istražena je također sposobnost asimilacije različitih vrsta prebiotičkih supstrata (sorbitol, manitol, laktuloza, rafinoza, oligofruktoza i inulin) pomoću bakterije *L. acidophilus* M92. Kombinacija probiotika i neprobavljivih ugljikohidrata (prebiotika) može stabilizirati i/ili poboljšati probiotički učinak. Tako su sinbiotici koristan biološki pripravak u prevenciji gastrointestinalnih bolesti ljudi ili životinja.

Ključne riječi: probiotici, prebiotici, sinbiotici, *Lactobacillus acidophilus*, adhezijska sposobnost

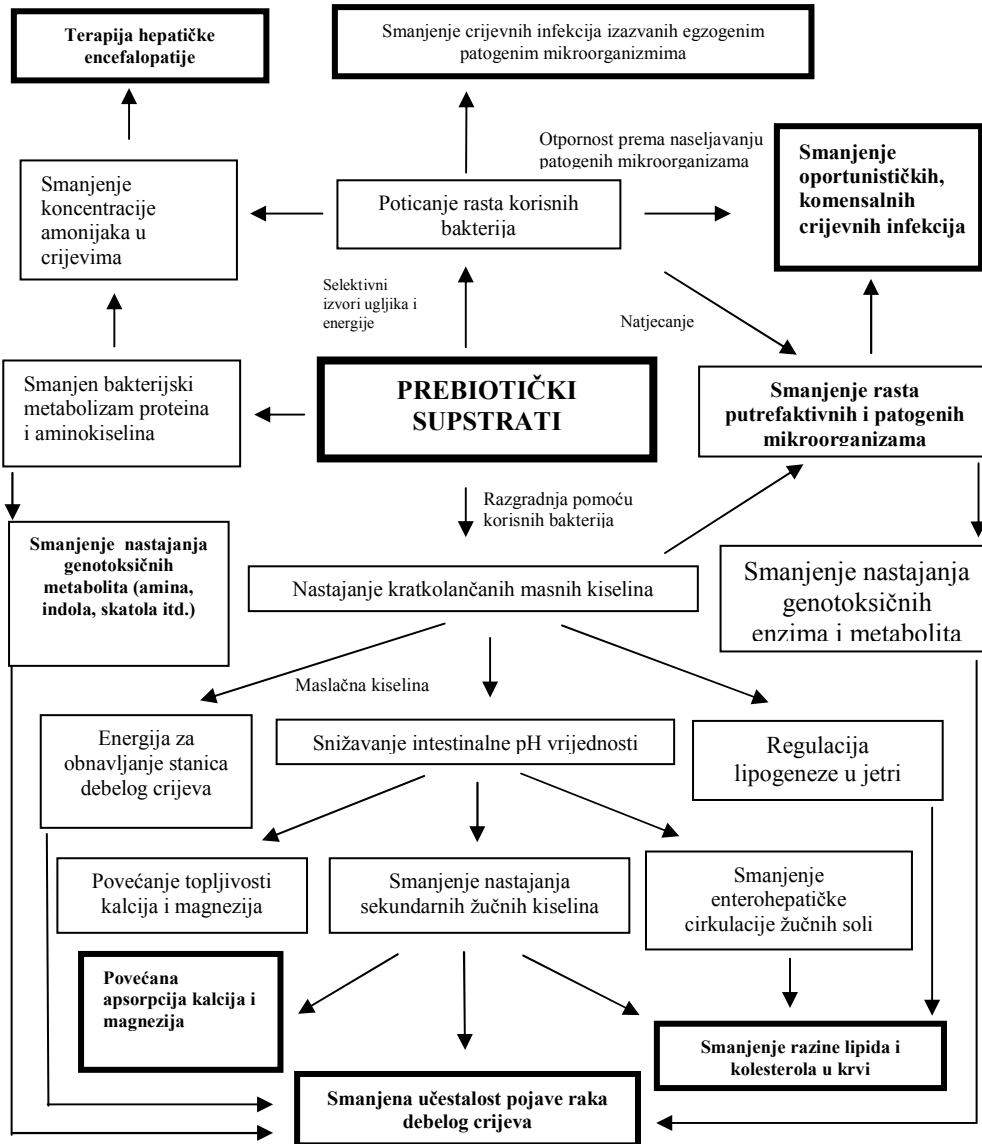
Uvod

Ljudski gastrointestinalni sustav sastoji se od kompleksnog mikrobnog ekosustava kojega čini nekoliko stotina različitih bakterijskih vrsta. Debelo crijevo je, posebice, vrlo gusto naseljeno mikroorganizmima čija koncentracija prelazi 10^{11} stanica po gramu sadržaja. Ovi mikroorganizmi i njihove metabolizamske aktivnosti mogu pozitivno i negativno utjecati na ljudsko

zdravlje. Izraz "intestinalna mikroflora" (različite bakterijske vrste u crijevima) podrazumijeva njeno korisno djelovanje na zdravlje čovjeka, a samo su neke bakterijske vrste patogene. Ravnoteža ovog ekosustava je dinamična pa se može poremetiti utjecajem starenja, liječenja, stresa, prehrane i drugih čimbenika iz okoliša. Održavanje ove bakterijske zajednice, koja sadržava pretežno korisne bakterijske vrste i vrlo malo putrefaktivnih (koje sudjeluju u razgradnji proteina), čine procesi za koje se vjeruje da su važni za održavanje zdravlja intestinalnog sustava (MacFarlane i MacFarlane, 1997.; Šušković i sur. 1997a; Šušković i sur. 1998.).

Postoje dva odvojena pristupa za povećanje broja korisnih mikroorganizama u gastrointestinalnom sustavu (Crittenden, 1999.). **Prvi pristup** je: oralno uzimanje živih, korisnih mikroorganizama. Ovi mikroorganizmi, nazvani PROBIOTICI, definirani su 1992. kao "jedna ili više kultura živih mikroorganizama koje, primjenjene u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflora" (Havenaar i Huis in't Veld, 1992.) i novijom definicijom: "Živi mikroorganizmi konzumirani u visokom broju (najmanje 10^9 CFU po danu) iskazuju zdravstveni učinak iznad njihove uobičajene opće poznate nutritivne vrijednosti" (Guarner i Schaafsma, 1998.). Probiotici potječu uglavnom iz grupa bakterija koje se zovu bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije koje inače čine normalnu, uobičajenu intestinalnu mikrofloru ljudi. Bifidobakterije su osobito dominantan bakterijski rod prisutan u debelom crijevu zdravih ljudi. Osim ovih autohtonih mikroorganizama (samородni, izvorno prisutni) u debelom crijevu postoji i **drugi pristup** u svrhu povećanja njihova broja kako ne bi došlo do sniženja njihova udjela u ukupnoj intestinalnoj mikroflori, a to je pokušaj uvođenja selektivnih izvora ugljika i energije koji im osiguravaju kompetitivnu prednost pred drugim bakterijama u ovom ekosustavu. To znači modifikaciju sastava crijevnog mikroflora korištenjem nekih dodataka hrani. Budući da ljudsko crijevo sadrži visoku koncentraciju bakterija, pretpostavlja se, da se izvor ugljika - i energija potrebna za održavanje tako velike bakterijske biomase - može dobiti iz ugljikohidrata u izlučevinama «domaćina» ili iz ugljikohidrata koji nisu probavljivi u tankom crijevu. Ove selektivne, hranjive tvari su 1995. godine Gibson i Roberfroid nazvali PREBIOTICIMA i definirali ih kao: "neprobavljive sastojke hrane koji korisno djeluju na domaćina pomoću selektivne stimulacije rasta i/ili aktivnosti jedne bakterijske vrste ili ograničenog broja bakterijskih vrsta u debelom crijevu, i tako poboljšavaju zdravlje ljudi". Za korištenje probiotika i

prebiotika u kombinaciji, a koje izlazi iz definicije prebiotika, predložen je izraz SINBIOTIK jer sadrži oba ova dodatka (probiotik + prebiotik).



Slika 1: Predloženi mehanizmi korisnog djelovanja prebiotika na zdravlje (Crittenden, 1999.).

Fig. 1: Proposed mechanisms of prebiotic action to improve human health (Crittenden, 1999).

Prikladno formulirani sinbiotički pripravci su prehrambeni proizvodi visokog potencijala koji na različite načine pozitivno utječu na zdravlje čovjeka, i temelj su funkcionalne hrane (Šušković i sur. 2001.).

Osiguranje fermentabilnih (iskoristivih) supstrata za bakterije u debelom crijevu je prvi zahtjev za prebiotike tj. da budu zanemarivo malo razgrađeni (ili nerazgrađeni) tijekom prolaska kroz tanko crijevo. Kada prebiotički supstrat dospije u debelo crijevo, može selektivno poticati rast, odnosno stimulirati metabolizamsku aktivnost korisnih bakterija, pa tako uništavati sve bakterije koje negativno utječu na zdravlje. Kroz ovu izmjenu sastava gastrointestinalne mikroflore i njezinog metabolizma, prebiotici zapravo mogu inducirati sustavne učinke korisne za zdravlje (slika 1). Bifidobakterije i laktobacili se uglavnom smatraju poželjnim bakterijskim rodovima i glavni su ciljani organizmi prebiotika. Također se smatra, da prebiotik može smanjiti broj putrefaktivnih i potencijalno patogenih organizama kao što su bakterije iz roda *Clostridium* i iz porodice *Enterobacteriaceae* (rodovi *Escherichia*, *Enterobacter*, *Shigella* i *Salmonella*) (Priebe i sur. 2002.).

U ovom radu želimo prikazati samo značajnija istraživanja u sklopu sinbiotičkog koncepta (probiotičkog i prebiotičkog), u svrhu definiranja bakterije *Lactobacillus acidophilus* M92 kao probiotičkog soja za humanu primjenu. Naime, vrsta *Lactobacillus acidophilus* ima najviše šanse za primjenu u ljudskoj populaciji, jer je humanog podrijetla, a u tijeku su izrade genomskih mapa različitih sojeva *L. acidophilus* koje će osigurati pouzdane informacije o utjecaju kolonizacije toga soja u gastrointestinalnom sustavu čovjeka – učinak na ljudsko zdravlje (Klaenhammer i sur. 2002.).

Materijal i metode rada

Mikroorganizmi i uvjeti uzgoja

U ovom su radu ispitana probiotička svojstva bakterije *Lactobacillus acidophilus* M92. U pokusima koagregacije *L. acidophilus* M92 upotrijebljeni su *Enterococcus faecium* L3 i *Escherichia coli* 3014. Radi identifikacije bakterijskog soja M92, PCR-metodom, upotrijebljeni su standardni bakterijski sojevi *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. crispatus* ATCC 33820, *L. gasseri* ATCC 33323 i *L. johnsonii* ATCC 11506. Svi su mikroorganizmi, izuzevši standardne sojeve laktobacila, pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Bakterije mliječne kiseline čuvane su na kosom MRS-agaru (Difco, Detroit, MI, USA), a *E. coli* je održavana precjepljivanjem na kosi hranjivi agar (Difco), uz inkubaciju na 37 °C / 24 h. Sojevi su čuvani na 4 °C, u hladnjaku. Prije izvođenja pokusa bakterije su dva puta precijepljene na MRS-bujon, odnosno na hranjivi bujon (Difco).

Priprava suspenzija bakterijskih stanica

Nakon uzgoja u MRS-bujonu, odnosno hranjivom bujonu, bakterijske stanice isprane su dva puta i suspendirane u fosfatnom puferu (pH = 7,2) pa je ukupni broj stanica iznosio oko 10⁸/mL. Na isti način priređene su stanice *L. acidophilus* M92 i *L. acidophilus* ATCC 4356 koje su prethodno bile obrađene litijevim kloridom (30 min na 37 °C) radi uklanjanja površinskog sloja proteina.

Metoda za ispitivanje autoagregacije i koagregacije

Autoagregacijska svojstva bakterijskih stanica *L. acidophilus* M92 ispitana su u fosfatnom puferu (pH = 7,2) nakon uzgoja u MRS-bujonu prema metodi Del Re i sur. (2000.). Suspenzija bakterijskih stanica (4 mL) izmiješana je u vibromješaču, a zatim je određivana bakterijska autoagregacija i koagregacija tijekom 5 h na sobnoj temperaturi (22 °C). Apsorbancija na 600 nm očitavana je uzorcima dobivenim prenošenjem 0,1 mL s vrha suspenzije bakterijskih stanica u 3,9 mL fosfatnog pufera (pH = 7,2). Postotak autoagregacije izračunat je iz formule: $(1 - A_t / A_0) \times 100$; A_t je apsorbancija u vremenu t (1, 2, 3, 4 ili 5 h), a A_0 apsorbancija u vremenu $t = 0$.

Ispitana je također koagregacija *L. acidophilus* M92 s probiotičkim sojem *Enterococcus faecium* L3 i s potencijalnim patogenim mikroorganizmom *Escherichia coli* prema metodi Buswell i sur. (1997.).

Mikrobna adhezija u otapalima

Mikrobna adhezija u otapalima (Microbial Adhesion to Solvents - MATS) provedena je prema Rosenberg i sur. (1980.), uz neke modifikacije (Crow i Gopal, 1995.; Bellon-Fontaiene i sur. 1996.). Bakterijske kulture uzgojene su u MRS-bujonu na 37 °C tijekom 18 h, centrifugirane na 5000 o/min tijekom 15 min, isprane sterilnom destiliranom vodom i suspendirane u 0,1 M KNO₃ (pH = 6,2). Priređenim suspenzijama stanica ($V = 3$ mL) izmjerena je apsorbancija na 600 nm (A_0), a zatim im je dodano otapalo ($V = 1$ mL) pa je sve zajedno izmiješano u vibromješaču tijekom 2 minute. Apsorbancija vodene faze (A_1) izmjerena je nakon 20 minuta inkubacije na

sobnoj temperaturi, a postotak mikrobne adhezije na otapalo izračunat je prema formuli: $(1 - A_1 / A_0) \times 100$. Upotrijebljena su tri otapala: ksilen (nepolarano otapalo), kloroform (monopolarano otapalo, elektron-akceptor) i etil-acetat (monopolarano otapalo, elektron-donor). Mikrobna adhezija u ksilenu odraz je hidrofobnosti ili hidrofilnosti stanične površine, dok rezultati dobiveni s kloroformom i etilacetatom upućuju na elektron-donorska (lužnata) ili elektron-akceptorska (kisela) svojstva površine bakterijskih stanica.

***In vitro* test na adheziju bakterijskih stanica na epitelne stanice tankoga crijeva svinje**

Test na adheziju proveden je prema Mäyrä-Mäkinen i sur. (1983.), uz određene modifikacije. U istraživanju je upotrijebljeno svježe tkivo ileuma svinja, pasmine Landras, dobiveno u klaonici "Sljeme", Sesvete. Životinje su bile ženskog spola u dobi od 6 mjeseci, prosječne težine 95 – 100 kg. Prethodno su držane na svinjogojskoj farmi i hranjene komercijalnim smjesama za tov.

Nakon otvaranja crijeva i odstranjivanja njihova sadržaja, uzeti su uzorci tkiva veličine 1 cm² potom držani 30 min u fosfatnom puferu (pH = 7,2) na 4 °C. Nakon trokратnog ispiranja u fosfatnom puferu uzorci tkiva dodani su u priređene suspenzije bakterijskih stanica i inkubirani u termostatu 30 min na 37 °C.

U daljnjem postupku tkivo je fiksirano u 10 %-tnom formalinu, dehidrirano rastućim koncentracijama alkohola, uklopljeno u parafin i mikrotomom narezano na odsječke debljine 5 µm. U bojenju tkivnih rezova upotrijebljena je metoda po Brown i Brenn (Švob, 1974.). Primijenjenom metodom Gram-pozitivne bakterije boje se plavo, Gram-negativne crveno ili ružičasto, jezgre epitelnih stanica su crvene, a ostali su tkivni elementi žuti.

Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Izolacija površinskih proteina s bakterijskih stanica

Bakterijske stanice, koncentrirane centrifugiranjem 5000 o/min tijekom 10 min i dva puta isprane sterilnom destiliranom vodom, resuspendirane su u 50 µL 1%-tne otopine SDS-a. Nakon 10 min kuhanja suspenzije stanica i centrifugiranja 9000 o/min tijekom 5 min, supernatant je podvrgnut SDS-poliakrilamidnoj-gel-elektroforezi (SDS-PAGE).

SDS-PAGE

U 15 µL uzorka dodano je 5 µL reducirajućeg reagensa i prokuhano 2-3 min. Nakon kuhanja ukupni volumen uzorka je nanesen na 10 %-tni poliakrilamidni gel. SDS-PAGE proveden je postupkom prema Laemmliju (1970.) u komori za elektroforezu (Sigma), na konstantnom naponu od 200 V tijekom 45 min. Bojanje gela na proteine provedeno je u 0,1 %-tnom metilenskom modrilu R-250 s 50 % metanola i 7 % octene kiseline najmanje 3 sata. Nakon bojenja gel je inkubiran u 7 %-tnoj octenoj kiselini do obezbojenja pozadine.

Amplifikacija DNA laktobacila PCR-metodom sa specifičnim početnicama za bakterijske vrste

Primjenom metoda DNA-DNA hibridizacije ponovno su klasificirane nekadašnje vrste *Lactobacillus acidophilus* u čak 6 novih vrsta, razvrstanih u dvije DNA-homologne skupine A i B: *L. acidophilus* (A1), *L. crispatus* (A2), *L. amylovorus* (A3), *L. gallinarum* (A4), *L. gasseri* (B1) i *L. johnsonii* (B2). Početnice (species specific primers) za identifikaciju *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri* i *L. johnsonii*, kao i uvjete reakcije opisali su Walter et al. (2000.). Par početnica za identifikaciju *L. gasseri* (Gas I i Gas II) dobiven je iz 16S-23S intergenske regije, dok su preostala tri para početnica iz 16S rRNA gena. Izolacija DNA iz ispitivanog soja *L. acidophilus* M92 te iz 4 referentna bakterijska soja provedena je kako su opisali Lewington i sur. (1987.), uz jednu modifikaciju: stanice su lizirane 1 h na 37 °C u puferu koji je sadržavao 25 U/mL mutanolizina i 5 mg/mL lizozima. DNA, pročišćena iz 2 mL kulture, resuspendirana je u 100 µL sterilne vode. PCR-metoda (Polimerase Chain Reaction) provedena je prema Walteru i sur. (2000.). Produkt je amplifikacije detektiran elektroforezom na 2,5 %-tnom agaroznom gelu bojenjem s etidij-bromidom.

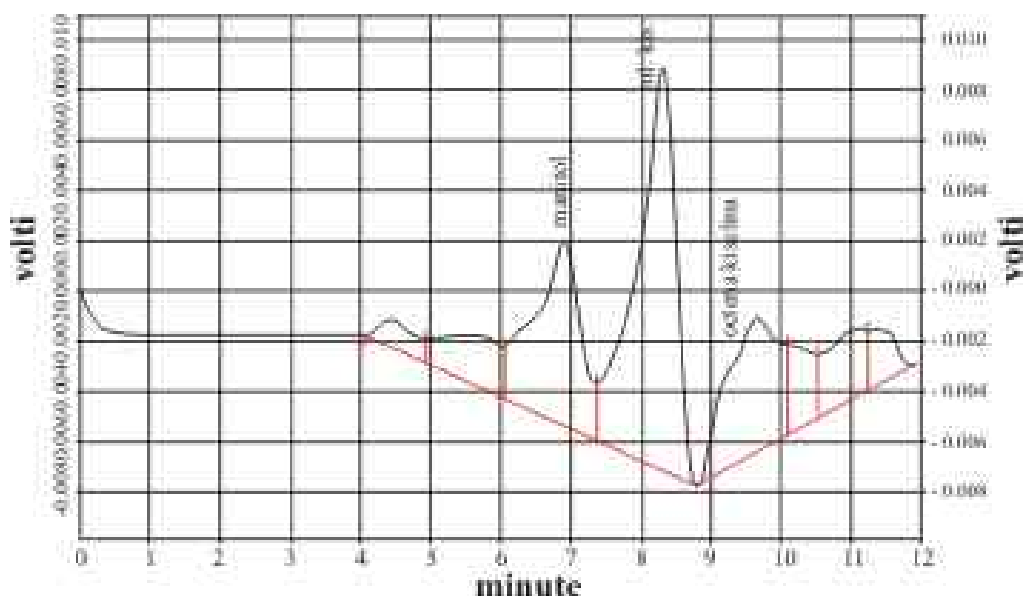
Hibridizacija DNA metodom po Southern-u

U svrhu provjere prisutnosti *slpA* gena (odgovornog za ekspresiju S-layer proteina) u ispitivanom soju *L. acidophilus* M92, provedena je hibridizacija DNA metodom po Southern-u (Gjuračić i Zgaga, 1996.). Plazmid pBK1, koji sadrži *slpA* gen iz soja *L. acidophilus* ATCC 4356, korišten je kao proba za hibridizaciju (Boot i sur. 1993.). Izolacija genomske DNA ispitivanog soja i standardnog soja provedena je prema Banina i sur. (1998.). Prije izvođenja

hibridizacije metodom po Southern-u, genomska DNA i proba tretirane su s restrikcijskim enzimom *Hind*III.

Asimilacija prebiotičkih supstrata

Koncentracija glukoze u MRS podlozi, odnosno prebiotičkih supstrata dodanih hranjivoj podlozi umjesto glukoze, određivana je nakon 24 sata uzgoja *L. acidophilus* M92 na 37 °C. Koncentracija glukoze, rafinoze, oligofruktoze i inulina određivana je RS metodom (vrijeme trajanja hidrolize za oligofruktozu iznosilo je 1 sat, a za inulin 2 sata). Koncentracije sorbitola, manitola i laktuloze određivane su visokoučinkovitim tekućinskom kromatografijom (HPLC - High Performance Liquid Chromatography).



Slika 2: Kromatogram supernatanta kulture *L. acidophilus* M92 nakon 24 sata uzgoja u hranjivoj podlozi s manitolom kao izvorom ugljika.

Fig. 2: Chromatogram of *L. acidophilus* M92 culture supernatant after 24 h of cultivation in growth medium with mannitol as carbon source

HPLC – sustav Shimadzu, Japan sastoji se od pumpe, vakuum-otplinjivača, ručnog injektora, grijača kolone, pretvornika signala i RI detektora. Sorbitol, manitol i laktuloza određivani su propuštanjem uzorka kroz gelfiltracijsku kolonu za šećere (Supelco, C-610H, 300x7.8 mm) na 60°C korištenjem RI detektora (primjer kromatograma prikazan je na slici 2). Mobilna faza bila

je 0,1 % H_3PO_4 , volumen uzorka 20 μL , a brzina protoka 1 mL/min. Koncentracije sorbitola, manitola i laktuloze očitavane su iz baždarnih krivulja.

*Određivanje suhe tvari bakterijske biomase gravimetrijski
(centrifugiranjem)*

U prethodno osušene i izvagane kivete za centrifugiranje otpipetirano je 10 mL dobro homogeniziranog uzorka, a zatim se uzorak centrifugira 15 minuta u laboratorijskoj centrifugi na 4000 okretaja u minuti. Kivete s talogom biomase suše se na 60°C 1 sat, te na 105°C do konstantne težine. Koncentracija biomase (X) se računa prema izrazu:

$$X = (\text{odvaga kivete s biomasom} - \text{odvaga prazne kivete}) / \text{volumen uzorka [g/L]}$$

Određivanje stupnja kiselosti i postotka proizvedene mliječne kiseline

1 mL uzorka razrijedi se s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak titrira se s 0,1 M NaOH uz fenolftalein kao indikator.

$$^{\circ}SH = a \cdot 20 \cdot f_{NaOH} \cdot 2$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = ^{\circ}SH \cdot 0,0225$$

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}$$

$$(1^{\circ}SH \sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline } (\%))$$

Određivanje octene kiseline po polumikro postupku

Za određivanje octene kiseline uzima se 5 mL uzorka, stavi se u tikvicu kruškastog oblika i doda 1 mL 25%-tne otopine H_3PO_4 . Treba paziti da površina vode u Erlenmeyerovoj tikvici za proizvodnju pare bude uvijek iznad nivoa tekućine u kruškastoj tikvici. Za vrenje vode u Erlenmeyerovu tikvicu treba ubaciti nekoliko komadića porozne gline ili staklene kuglice. Od probe treba predestilirati 60 ml. Dobiveni destilat se zagrijava do početka vrenja i titrira uz fenolftalein s 0,1 M NaOH.

Račun:

$$\text{količina octene kiseline} = 1,2 \cdot (a_2 - a_1) \text{ [g/L]}$$

a_1 – mL 0,1 M NaOH utrošeni za slijepu probu (*)

a_2 – mL 0,1 M NaOH utrošeni za uzorak

Napomena: * - slijepa proba je podloga za uzgoj bez dodatka ugljikohidrata kao izvora ugljika

Rezultati i rasprava

U našem laboratoriju su provedena *in vitro* istraživanja u sklopu probiotičkog koncepta i selekcionirana su tri soja bakterija mliječne kiseline za probiotičku primjenu: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3. U ovom radu osvrnut ćemo se samo na soj *L. acidophilus* M92, jer je vjerojatno najzanimljiviji s aspekta mljekarske industrije. *L. acidophilus* M92 je iskazao antimikrobnu aktivnost prema enteropatogenim, sporotvornim i fungalnim test mikroorganizmima (Blažeka i sur. 1991.; Šušković i sur. 1993.; Brkić i sur. 1995.). Ovaj soj ima visok stupanj preživljavanja u uvjetima niske pH vrijednosti hranjivog medija i uz supstancije, kao što su lizozim, fenol i žučne soli (konjugirane i dekonjugirane). Kako je rezistencija prema antibioticima koji se koriste u terapijske svrhe važan kriterij u izboru sojeva za probiotičku namjenu, testiran je velik broj antibiotika, te su određene minimalne inhibicijske koncentracije tih antibiotika za soj *L. acidophilus* M92. Rezultati su pokazali visok stupanj rezistencije ovog soja prema testiranim antibioticima koji se najčešće primjenjuju u liječenju različitih infektivnih bolesti (Brkić, 1995.; Šušković, 1996.).

Nakon što su zadovoljeni temeljni kriteriji pri izboru bakterijskih sojeva za probiotičku primjenu, istraživano je preživljavanje ovoga soja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava. Detaljno je istražen tranzit od želuca do krajnjeg dijela tankog crijeva (ileuma), tj. eksperimenti su provedeni u prisutnosti pepsina, mucina i pankreatina uz dodatak protektora (kazeina, koncentriranih proteina sirutke i obranog mlijeka) i uz odgovarajuće pH vrijednosti pojedinog dijela probavnog sustava kroz kojega probiotičke bakterije trebaju proći da bi kolonizirale prijelaz iz tankog u debelo crijevo gdje je poželjna njihova probiotička aktivnost. Definirane su kritične točke ključnih parametara (pH vrijednost želuca i koncentracija žučnih soli u tankom crijevu) u kojima ispitivana bakterija mliječne kiseline može preživjeti (Šušković i sur. 1997b; Kos i sur. 2000.). Ova istraživanja su pokazala da je visoka koncentracija žučne soli u gornjem dijelu tankog crijeva (duodenumu) najteže premostiva barijera u gastrointestinalnom sustavu, pa su daljnja istraživanja vođena s namjerom ustanovljavanja mehanizma njihove detoksifikacije. Određene su fiziološke značajke (makroskopske i mikroskopske) *L. acidophilus* M92 kao vrijedan pokazatelj u izboru morfološki rezistentnijih

oblika sa stajališta preživljavanja u prisutnosti žučnih soli (Šušković i sur. 2000.). Istražena je također enzimska aktivnost ove bakterije prema žučnim solima pa je ustanovljeno da *L. acidophilus* M92 posjeduje enzim hidrolazu žučnih soli (tj. dekonjugacijsku aktivnost) (Kos, 2001.). Ova enzimska aktivnost je važna u razjašnjavanju biokemijskog mehanizma detoksifikacije žučnih soli, budući da *L. acidophilus* M92 pokazuje visok stupanj rezistencije prema ovim metabolitima toksičnim za većinu bakterijskih vrsta koje dospiju u probavni sustav. Osim toga, sa stajališta specifične probiotičke aktivnosti asimilacije kolesterola pomoću bakterija mliječne kiseline, dekonjugacijska aktivnost ovog soja indirektno utječe na smanjenje razine kolesterola u krvi, zbog potrebe za sintezom novih konjugiranih žučnih soli koje se sintetiziraju iz kolesterola. Ustanovljeno je da do smanjenja koncentracije kolesterola dolazi i zbog spontanog taloženja kolesterola zajedno s taloženjem dekonjugiranih žučnih soli (kao posljedica dekonjugacijske aktivnosti ove bakterije), no utvrđena je i stvarna koncentracija asimiliranog kolesterola s *L. acidophilus* M92 (Kos, 2001.; Kos i sur. 2002.).

Uporaba probiotika i prebiotika brzo raste širom svijeta i zbog komercijalnog interesa, a korisni su dodatci ljudskoj i životinjskoj hrani. Upravo zbog prevelike komercijalizacije znanstvena zajednica (zaključci sa 6. i 7. Simpozija o bakterijama mliječne kiseline održanih u Nizozemskoj 1999. i 2002.) je najavila rektifikaciju biokemijskih, fizioloških i genetičkih karakteristika svih potencijalnih probiotičkih sojeva zbog njihove bezopasne primjene u prehrani i terapiji (Šušković i sur. 2002.). Provjeru svih ovih navedenih svojstava probiotičkih sojeva omogućavaju nova znanstvena dostignuća u molekularnoj genetici na temelju kojih je došlo do značajnih promjena u taksonomiji ove važne grupe bakterija što svakako utječe na njihovu genetičku stabilnost koja je neophodna u definiranju i zadržavanju probiotičkih svojstava. Stoga je bilo potrebno napraviti eksperimente provjere taksonomskih, fizioloških i genetičkih karakteristika ovih sojeva. Primjenom metoda DNA-DNA hibridizacije ustanovljeno je da se pod nekadašnjim nazivom *Lactobacillus acidophilus* krije čak 6 različitih bakterijskih vrsta (genomospecies) koje se nisu mogle razlikovati do sada primjenjivanim fenotipskim (biokemijskim i fiziološkim) metodama. Na temelju tih rezultata, ove su vrste podijeljene u podgrupe A i B: *L. acidophilus* (A1), *L. crispatus* (A2), *L. amylovorus* (A3), *L. gallinarum* (A4), te *L. gasseri* (B1) i *L. johnsonii* (B2) (Lauer i sur. 1980.; Fujisawa i sur. 1992.). Primjenom specifičnih primer-a (16S rRNA sekvencije) za gore navedene vrste, ispitivani soj *L. acidophilus* M92 identificiran je i potvrđen kao vrsta *Lactobacillus acidophilus* (tablica 1). Reidentifikaciju je potvrdila

međunarodno priznata institucija za identifikaciju mikroorganizama BCCMTM/LMG - BACTERIA COLLECTION (www.belspo.be). Ti su eksperimenti ukazali na moguću prisutnost površin-skih proteina (surface layers protein = S-layer) kod *L. acidophilus* M92.

Tablica 1: Detekcija amplificiranih DNA fragmenata PCR metodom s početnicama za četiri *Lactobacillus* vrste: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri* i *L. johnsonii*.

Table 1: Detection of amplified fragments in PCR with the species specific primers for four *Lactobacillus* species: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri* i *L. johnsonii*

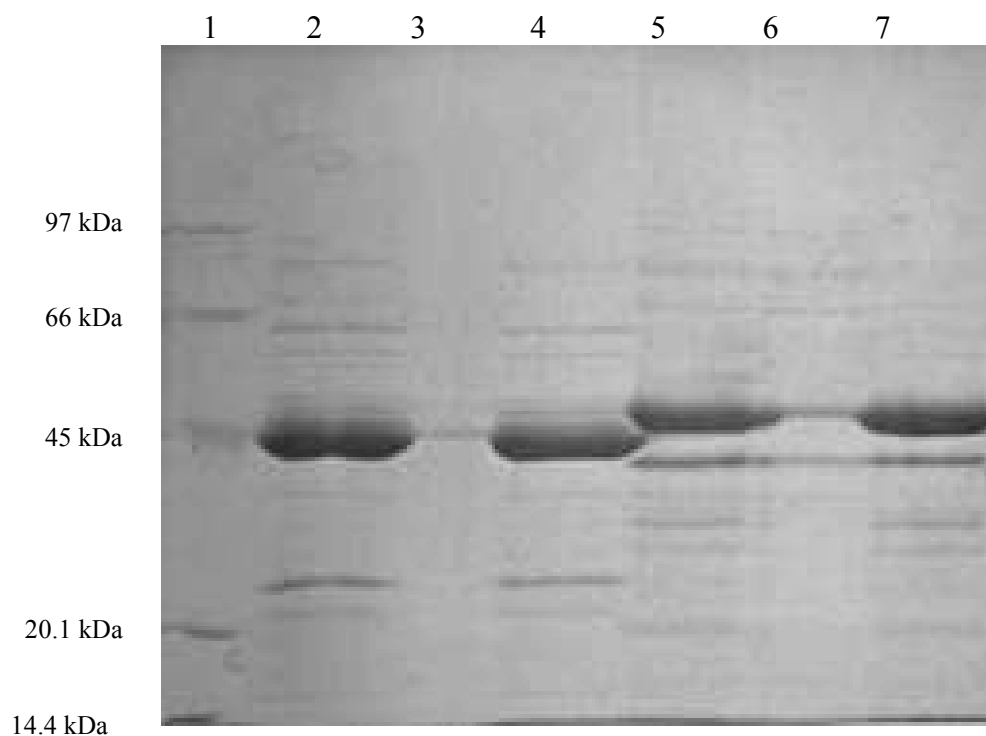
<i>Lactobacillus</i> vrste <i>Lactobacillus</i> species	PCR sa specifičnim parom početnica za <i>Lactobacillus</i> vrste ** PCR reaction with species specific primer pairs for <i>Lactobacillus</i> species**			
	Aci 16SI/16SII	Cri 16SI/16SII	Gas I/II	Joh 16SI/16SII
<i>L. acidophilus</i> M92	+	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356*	+	-	-	-
<i>L. crispatus</i> ATCC 33820*	-	+	-	-
<i>L. gasseri</i> ATCC 33323*	-	-	+	-
<i>L. johnsonii</i> ATCC 11506*	-	-	-	+

* standardni sojevi/standard strains

** Aci - *L. acidophilus*, Cri - *L. crispatus*, Gas - *L. gasseri*, Joh - *L. johnsonii*

S-layer je pronađen samo u vrstama podgrupe A, dok vrste podgrupe B ne posjeduje ni *slp* (*surface layer protein*) gen. Rezultati dobiveni primjenom SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) površinskih proteina ispitivanog soja *L. acidophilus* M92 ukazuju na prisutnost S-layera (slika 3). Na toj se slici mogu uočiti dominantne proteinske vrpce. Jedna je veličine 43 kDa (slika 3, stupci 2 i 4), a radi se o proteinskom parakristalnom sloju (S-layer) bakterije *L. acidophilus* ATCC 4356 koja je poslužila kao standardni soj. Dominantna proteinska vrpca, veličine 45 kDa (slika 3, stupci 5 i 7) također upućuje na prisutnost površinskih S-layer proteina bakterije *L. acidophilus* M92, budući da se radi o parakristalnom sloju koji čini oko 15 % ukupnih staničnih proteina, a relativna molekularna masa može biti 40 – 200 kDa (Sara i Sleytr, 2000.). Nakon ekstrakcije s 5 M litijevim

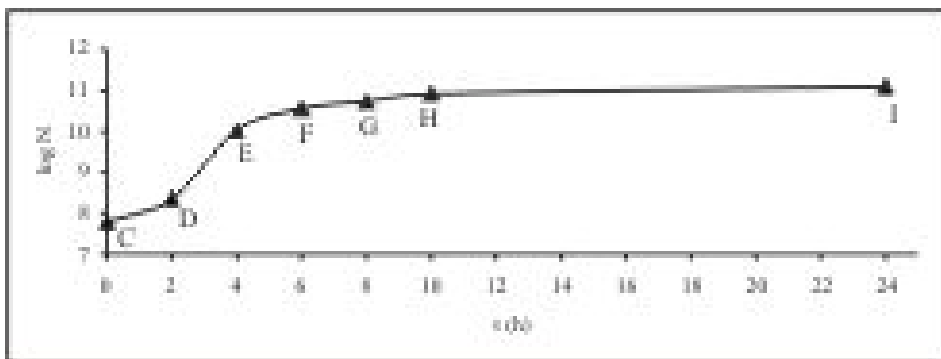
kloridom uklonjeno je više od 90 % površinskog sloja proteina (slika 3, stupci 3 i 6).



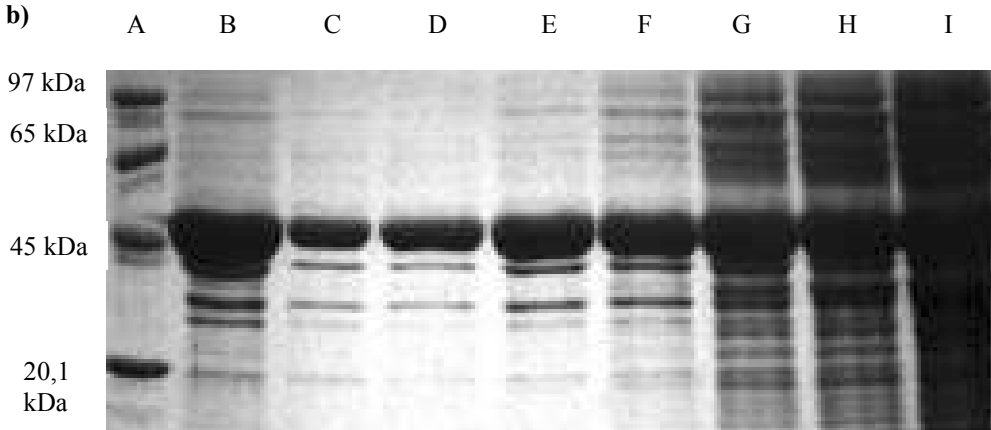
*Slika 3: SDS-PAGE površinskih proteina stanica standardnog soja **L. acidophilus** ATCC 4356 i **L. acidophilus** M92 prije i nakon ekstrakcije s 5M LiCl; 2, 3, 4 - površinski proteini **L. acidophilus** ATCC 4356 netretiranih stanica (2 i 4) i stanica ekstrahiranih s 5M LiCl (3); 5, 6, 7 - površinski proteini **L. acidophilus** M92 netretiranih stanica (5 i 7) i stanica ekstrahiranih s 5M LiCl (6); 1 – standardni proteini male molekularne mase (14 – 94 kDa).*

*Fig. 3: SDS-PAGE of cell surface proteins from standard strain **L. acidophilus** ATCC 4356 and **L. acidophilus** M92 before and after extraction with 5 M LiCl; 2, 3, 4 - **L. acidophilus** ATCC 4356 cell surface proteins from untreated cells (2 and 4) and from cells extracted with 5M LiCl (3); 5, 6, 7 - **L. acidophilus** M92 cell surface proteins from untreated cells (5 and 7) and from cells extracted with 5M LiCl (6).*

a)



b)



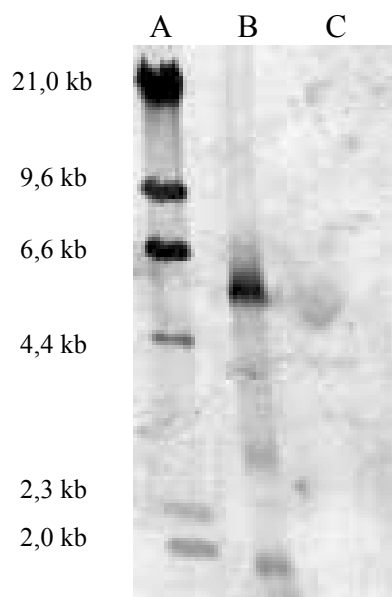
Slika 4: a) Rast stanica *L. acidophilus* M92 nakon ekstrakcije površinskih proteina s litijevim kloridom, u MRS podlozi.

b) Ponovno nastajanje S-layer proteina praćeno SDS-PAGE metodom tijekom rasta *L. acidophilus* M92 kao što je označeno na krivulji rasta (C – I); A – standardni proteini male molekularne mase; B – S-layer netretiranih stanica *L. acidophilus* M92.

Fig. 4. a) Growth of *L. acidophilus* M92 after extraction of cell surface proteins with 5M LiCl, in MRS broth.

b) Reappearance of the S-layer proteins as it is indicated on the growth curve (C – I). A – low molecular weight protein standards; B – S-layer of untreated cells *L. acidophilus* M92.

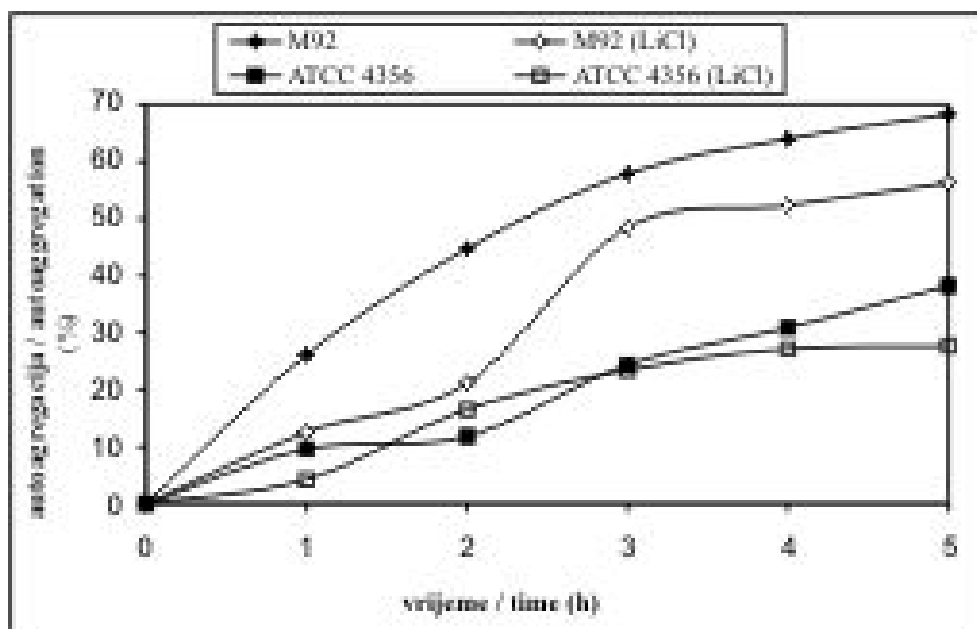
Uočeno je također da se površinski S-layer proteini, uklonjeni litijevim kloridom, obnove već nakon 2 sata uzgoja u MRS hranjivoj podlozi i prisutni su na površini stanica u svim fazama rasta *L. acidophilus* M92 (slika 4). Rezultatima hibridizacije DNA pomoću "Southern blot" metode dokazano je da ispitivani soj *L. acidophilus* M92 ima gen *slpA* koji je odgovoran za sintezu površinskih proteina (S-layera). Pozitivna kontrola na *slpA* gen bio je standardni soj *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (slika 5).



Slika 5: Southern blot hibridizacija fragmenata kromosomske DNA standardnog soja *L. acidophilus* ATCC 4356 i *L. acidophilus* M92 s pBK1 plazmidom koji sadrži *slpA* gen. DNA bakterije *L. acidophilus* M92 dala je pozitivan signal na *slpA* gen (C). *L. acidophilus* ATCC 4356 je pozitivna kontrola (B); A – λ DNA pocijepana enzimom Hind III.

Fig. 5: Southern blot hybridization of chromosomal DNA fragments of standard strain *L. acidophilus* ATCC4356 and *L. acidophilus* M92 with plasmid pBK1 which contains *slpA* gene (C). DNA of *L. acidophilus* M92 gave a positive signal on *slpA* gene. *L. acidophilus* ATCC 4356 was positive control (B); A – λ DNA digested with Hind III.

Prema Delcouru et al. (1999.) i Kullenu i Klaenhammeru (1999.), S-layer prekriva staničnu stijenu bakterija i sastoji se od proteinskih podjedinica (koje mogu biti glikozilirane), organiziranih u kristalni heksagonalni ili tetragonalni sloj. Autori iznose da S-layer djeluje kao adheziv, tj. služi pri adheziji stanica na crijevnu sluznicu, što je vrlo važno svojstvo probiotičkih sojeva. Adhezija na površinu epitelnih stanica bitan je preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu jer omogućava dugotrajnije djelovanje probiotičkih bakterija na crijevnu mikrofloru i imunološki sustav domaćina.

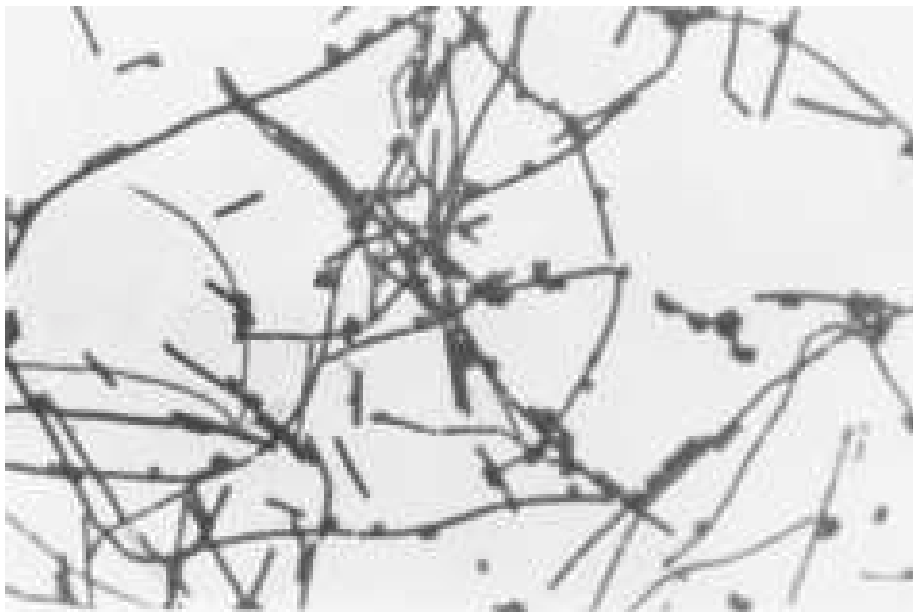


Slika 6: Usporedba autoagregacije stanica *L. acidophilus* M92 i standardnog soja *L. acidophilus* ATCC 4356 prije i nakon uklanjanja površinskih proteina s 5 M LiCl.

Fig. 6: Comparison of the autoaggregation ability of *L. acidophilus* M92 and standard strain *L. acidophilus* ATCC 4356 before and after removal of their surface layer proteins with 5 M LiCl.

Iako mehanizmi adhezije nisu još u potpunosti razjašnjeni, neki su autori zaključili da je agregacija česta značajka bakterijskih sojeva sa sposobnošću adhezije na crijevni epitel (Vandevoorde i sur., 1992.; Boris i sur., 1997.;

Del Re i sur., 2000.). Zbog toga su ispitana autoagregacijska i koagregacijska svojstva bakterije *L. acidophilus* M92. Oba ispitivana soja, *L. acidophilus* M92 i *L. acidophilus* ATCC 4356, postigla su visok postotak autoagregacije, a uklanjanje površinskog sloja proteina s litijevim kloridom negativno je utjecalo na autoagregaciju stanica (u oba slučaja oko 30 %) (slika 6). Ustanovljena je i koagregacija *L. acidophilus* M92 i *Enterococcus faecium* L3, soja iz našeg laboratorija, koji se također istražuje u probiotičke svrhe (slika 7).

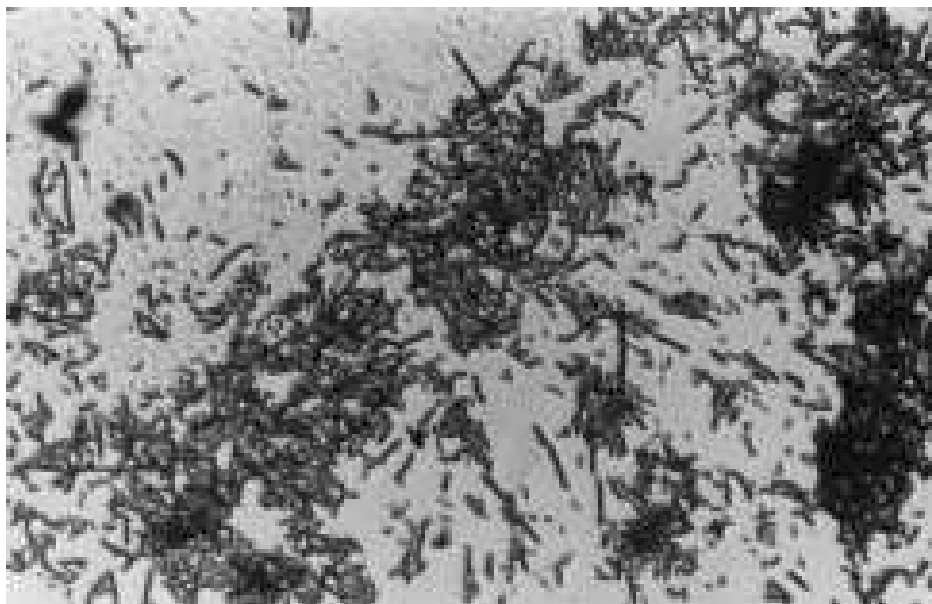


Slika 7: Koagregacija stanica *L. acidophilus* M92 i *E. faecium* L3 u fosfatnom puferu (pH = 7,2). Povećanje, x 1000.

Fig. 7: Coaggregation between *L. acidophilus* M92 and *E. faecium* L3 in phosphate buffer (pH = 7,2). Magnification, x 1000.

To bi moglo povećati njihov kolonizacijski potencijal ako se primijene u združenoj kulturi kao probiotici. Nadalje, neki autori navode da koagregacija probiotika s patogenim mikroorganizmima upućuje na mogućnost sprječavanja kolonizacije patogenih mikroorganizama u gastrointestinalnom traktu njihovim fizičkim uklanjanjem (competitive exclusion). Reid i sur. (1988.) ustanovili su da je koagregacija važan obrambeni mehanizam protiv infekcija u urinarom traktu jer laktobacili, koji proizvode inhibirajuće supstancije,

koagregiraju s patogenim mikroorganizmima i tako sprječavaju njihovu kolonizaciju. Sličan bi obrambeni mehanizam mogao vrijediti u intestinalnom sustavu. Budući da je u prijašnjim istraživanjima ustanovljeno da *L. acidophilus* M92 proizvodi antimikrobne supstancije koje inhibiraju rast potencijalno-patogenih mikroorganizama (Brkić, 1995.; Brkić i sur. 1995.; Šušković, 1996., Šušković i sur. 1997b), koagregacija *L. acidophilus* M92 s bakterijom *Escherichia coli* mogla bi pojačati probiotički učinak ispitivanog soja (slika 8).



Slika 8: Koagregacija stanica *L. acidophilus* M92 i *E. coli* u fosfatnom puferu (pH = 7,2). Povećanje, x 1000.

Fig. 8: Coaggregation between *L. acidophilus* M92 and *E. coli* in phosphate buffer (pH = 7,2). Magnification, x 1000.

Bakterijska adhezija započinje nespecifičnim fizikalno-kemijskim interakcijama koje onda omogućavaju specifične interakcije adhezina s površine bakterijske stanice i komplementarnog receptora na epitelnoj stanici u gastrointestinalnom traktu (Jonsson i Conway, 1992.). Stoga se pristupilo ispitivanju fizikalno-kemijskih svojstava površine bakterijskih stanica *L. acidophilus* M92. Rezultati hidrofobnosti/hidrofilnosti stanica dobiveni primjenom klasične mikrobne adhezije na ksilen prikazani su u tablici 2.

Tablica 2: Usporedba adhezije stanica *L. acidophilus* M92 i standardnog soja *L. acidophilus* ATCC 4356 u organska otapala, nakon tretmana s 5 M LiCl

Table 2: Comparison of the adhesion of *L. acidophilus* M92 and standard strain *L. acidophilus* ATCC 4356 in organic solvent after treatment with 5M LiCl

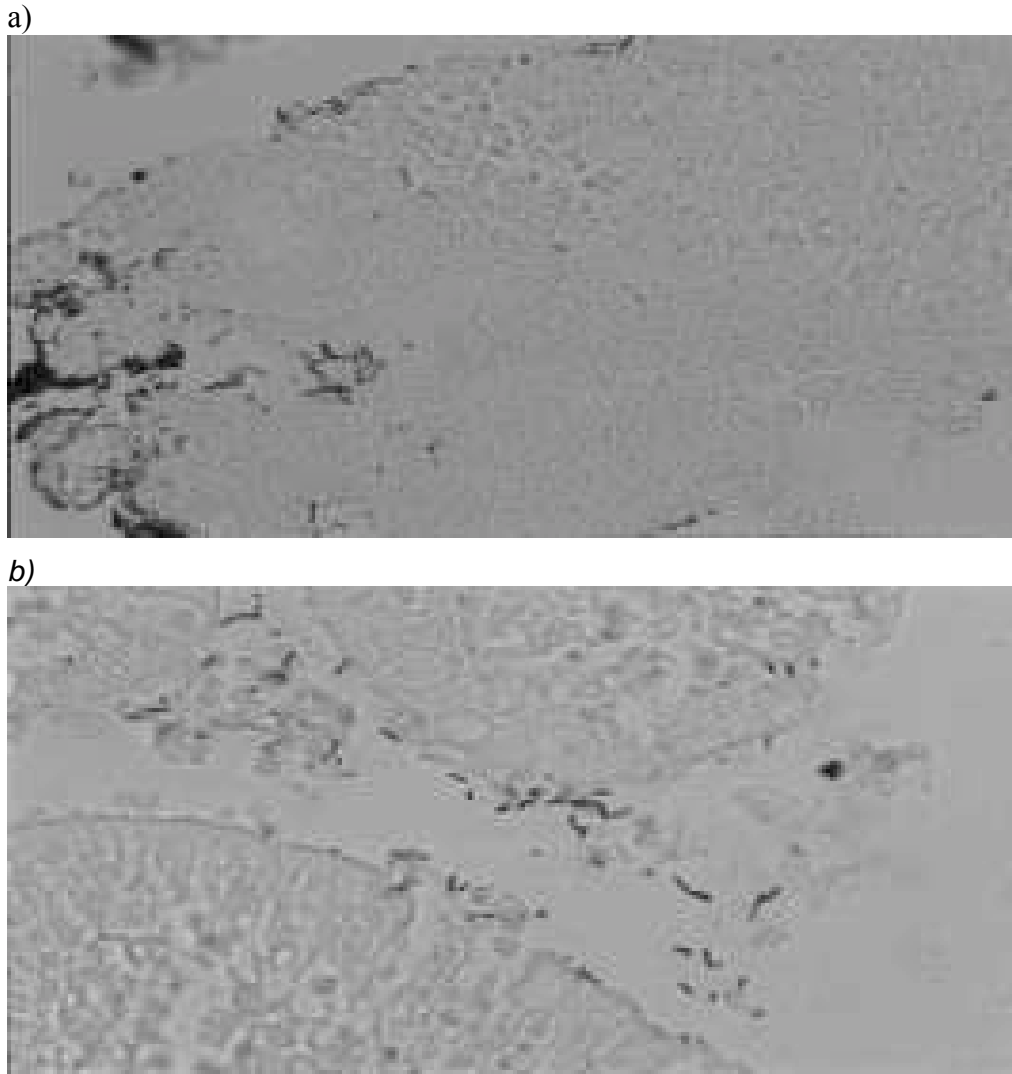
Mikroorganizmi Microorganisms	ADHEZIJA/ADHESION (%)		
	Ksilen Xylene	Kloroform Chloroform	Etil acetat Ethyl acetate
<i>L. acidophilus</i> M92			
Kontrola/Control	70,96	36,06	0
LiCl	50,92	66,00	0
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356			
Kontrola/Control	59,05	52,80	0
LiCl	28,40	54,57	0

Visok postotak adhezije stanica *L. acidophilus* M92 na to apolarno otapalo upućuje na njihovu hidrofobnost. Nadalje, rezultati ispitivanja mikrobne adhezije na kloroform pokazuju afinitet ispitivanog soja za to kiselo otapalo i elektron-akceptor, za razliku od vrlo slabe mikrobne adhezije na etil-acetat koji je lužnato otapalo i elektron-donor (tablica 2). Dobiveni rezultati upućuju na elektron-donorska svojstva površine bakterijskih stanica *L. acidophilus* M92. Slični rezultati dobiveni su za mnoge bakterije mliječne kiseline, a objašnjeni su brojnijom zastupljenošću COO⁻ i HSO₃⁻ skupina na površini bakterijskih stanica. Hidrofobna svojstva stanica *L. acidophilus* M92 mogla bi se pripisati (gliko-)proteinskim molekulama na njihovoj površini, dok hidrofilnost stanica obično potječe od prisutnih polisaharida (Pelletier i sur. 1997.). Pokušalo se ustanoviti jesu li površinski proteini (S-layer proteini) odgovorni za hidrofobnost stanica *L. acidophilus* M92, a dobiveni su rezultati uspoređeni s onima za bakteriju *L. acidophilus* ATCC 4356. Površinski parakristalni sloj proteina uklonjen je djelovanjem 5 M litijevog klorida, a zatim je ispitana adhezija stanica *L. acidophilus* M92 i *L. acidophilus* ATCC 4356 na ksilen, kloroform i etil-acetat (tablica 2). U oba je slučaja smanjena hidrofobnost stanica, a istodobno su povećana elektron-donorska svojstva površine bakterijskih stanica.

Konačno, pokušalo se utvrditi hoće li do sada iznesene spoznaje o agregacijskim svojstvima i svojstvima površine stanica bakterije *L. acidophilus* M92 utjecati na njihova adhezijska svojstva. Stoga je izveden *in vitro* test na adheziju potencijalnog probiotičkog soja *L. acidophilus* M92 na epitelne stanice ileuma svinje čiji je probavni sustav najbliži čovjekovom. Ileum je dio intestinalnog sustava u kojem je najpoželjnija kolonizacija i aktivnost probiotičkih bakterija (Fuller i sur. 1978.; Rojas i Conway, 1996.). Na slikama 9a i 9b uspoređena je adhezija stanica *L. acidophilus* M92 prije i nakon obradbe litijevim kloridom u svrhu uklanjanja površinskih proteina. Ustanovljeno je da su bolja adhezijska svojstva neobrađenih stanica, a vidi se također da je zbog autoagregacije bitno veći ukupni broj stanica *L. acidophilus* M92 na površini crijevnih resica ileuma svinje. Iako naši rezultati upućuju na značaj površinskih proteina u procesu adhezije stanica na crijevni epitel, uloga S-layer proteina u adheziji nije još potpuno razjašnjena. Dok su Green i Klaenhammer (1994.) ustanovili da u adheziji na crijevni epitel sudjeluju i ugljikohidratne i proteinske molekule s površine bakterijske stanice, ali ne i S-layer proteini, Schneitz i sur. (1993.) tvrde suprotno.

Mukai i Arihara (1994.) ustanovili su da se glikoproteini koji tvore S-layer na površini stanice *L. acidophilus* JCM1132 vežu na lektine prisutne na površini intestinalnih epitelne stanice. U tijeku su istraživanja adhezijskih i kolonizacijskih svojstava bakterije *L. acidophilus* M92 u *in vivo* uvjetima, na pokusnim miševima.

Budući da sinbiotički učinak podrazumijeva asimilaciju prebiotičkih supstrata pomoću probiotičkih bakterija u debelom crijevu u svrhu uspostavljanja i održavanja ravnoteže intestinalne mikroflore, ispitana je mogućnost asimilacije različitih prebiotičkih supstrata s bakterijom *L. acidophilus* M92. Ispitana je asimilacija različitih prebiotičkih supstrata, od jednostavnih šećernih alkohola (sorbitola i manitola) i disaharida laktuloze do složenijih oligosaharida (rafinoze i oligofruktoze) i polisaharida (inulina). U pokušajima procjene sposobnosti niza potencijalnih prebiotičkih supstrata da selektivno stimuliraju umnožavanje korisnih mikroorganizama u debelom crijevu, istražen je velik broj *in vitro* modela u jednostavnoj statičnoj kulturi, te niz sofisticiranih multistupnjevitih intestinalnih modela (Crittenden, 1999.). U ovom je radu praćen rast bakterije *L. acidophilus* M92, proizvodnja mliječne i octene kiseline i promjena pH vrijednosti tijekom 24 sata uzgoja u prisutnosti pojedinih prebiotičkih supstrata. Prethodno je soj *L. acidophilus* M92 kultiviran (24 sata) na istim prebiotičkim supstratima radi prilagodbe na nove izvore ugljika, bu-



Slika 9: Adhezija stanica **L. acidophilus** M92 na epitelne stanice ileuma svinje prije (a) i nakon tretiranja bakterijskih stanica s 5M LiCl (b). Povećanje, x 600.

Fig. 9: Adhesion of **L. acidophilus** M92 to the ileal epithelial cells of the pig before (a) and after treatment of bacterial cells with 5M LiCl (b). Magnification, x 600.

dući da se održavanje i čuvanje toga soja provodi na MRS podlozi (De Man i sur. 1960.) koja kao izvor ugljika sadrži glukozu. Rezultat predkultivacije je bolja asimilacija istih prebiotika tijekom kultivacije. To znači, da bi bilo poželjno probiotički soj prethodno uzgojiti na prebiotičkom supstratu s kojim će biti u sinbiotičkom pripravku. Rezultati asimilacije prebiotičkih supstrata s bakterijom *L. acidophilus* M92 i proizvodnja metabolita prikazani su u tablici 3. Zanimljivo je, da bakterija *L. acidophilus* M92 raste bolje na ispitivanim prebioticima nego na glukozu (tablica 3). Ta bi činjenica ovoj bakteriji mogla osigurati kompetitivnu prednost koja rezultira njenim bržim umnožavanjem u odnosu na druge sudionike crijevne mikroflore kada je prebiotik konzumiran, odnosno prisutan u debelom crijevu. Tolerantnost *L. acidophilus* M92 prema kiseloj mikrosredini, koja je rezultat fermentacije prebiotika i nastajanja kratkolančanih masnih kiselina *in situ*, može također biti značajna u njihovom selektivnom razmnožavanju. Na temelju rezultata asimilacije prebiotika, prikazanih u tablici 3, može se zaključiti da su potrošnja supstrata i pad pH

Tablica 3: Metabolizamska aktivnost bakterije *L. acidophilus* M92 nakon 24 sata uzgoja u hranjivim podlogama s dodatkom različitih prebiotičkih supstrata kao izvora ugljika

Table 3: Metabolic activity of *L. acidophilus* M92 after 24 h of cultivation in growth media with addition of different kinds of prebiotic substrates as carbon sources

Supstrati Substrates	Utrošak supstrata Substrate used (%)	Octena kiselina Acetic acid (g/L)	Mliječna kiselina Lactic acid (g/L)	Δ pH	μ_{\max}^* (h ⁻¹)
Gukoza Glucose	39,5	0,70	11,70	2,27	0,38
Sorbitol Sorbitol	74,0	0,12	17,64	2,64	0,35
Manitol Mannitol	77,0	0,00	18,45	2,60	0,77
Laktuloza Lactulose	67,2	1,08	19,71	1,78	0,45
Rafinoza Raffinose	11,1	1,68	4,14	0,12	0,37
Oligofruktoza Oligofructose	33,0	0,72	6,57	1,03	0,48
Inulin Inulin	35,9	1,56	6,21	0,88	0,42

* μ_{\max} - maksimalna specifična brzina rasta

vrijednosti bili najveći kada je *L. acidophilus* M92 uzgajan u podlogama s poliolima (sorbitol i manitol) uz značajan prinos mliječne kiseline. Prinos octene kiseline bio je nešto bolji u prisutnosti složenijih šećera: laktuloze, rafinoze i inulina. Međutim, bakterija *L. acidophilus* M92 kao homofermentativna bakterija mliječne kiseline proizvodi vrlo male količine octene kiseline (nakon 24 sata uzgoja na glukozu proizvede 0,7 g/L), dok je glavni proizvod metabolizma šećera mliječna kiselina. Octena kiselina je kratkolančana masna kiselina i ima važnu ulogu u mehanizmu korisnog djelovanja probiotika i prebiotika jer inhibira rast nepoželjnih patogenih mikroorganizama snižavanjem pH vrijednosti u intestinalnom sustavu (Šušković i sur. 1997b; Campbell i sur. 1997.). Sličnu ulogu ima i mliječna kiselina. Ove organske, lipofilne kiseline mogu interferirati s osnovnim staničnim metabolizmom te sniziti intracelularni pH i na taj način uzrokovati lizu stanica (Baird-Parker, 1980.; Kashket, 1987.). Octena kiselina ima jače inhibicijsko djelovanje od mliječne, osobito prema kvascima i plijesnima. Ovo se može objasniti time, što je sadržaj disocirane octene kiseline 2- 4 puta veći od nedisocirane u usporedbi s mliječnom kiselinom. Neki autori navode da octena i mliječna kiselina sinergistički djeluju u inhibiciji rasta *Salmonella* vrsta (Rubin, 1987.; Adams i Hall, 1988.) i kvasaca (Moon, 1983.).

U dosadašnjim istraživanjima asimilacije prebiotika uglavnom su proučavane stimulacije rasta vrsta iz roda *Bifidobacterium* (Gibson i Wang, 1994.; Perrin i sur. 2000.; Perrin i sur. 2001.; Gopal i sur. 2001.). Stoga su ovi rezultati vrijedan doprinos istraživanjima mogućnosti bakterije koja pripada rodu *Lactobacillus* da asimilira neprobavljive ugljikohidrate u cilju postizanja sinbiotičkog učinka u *in vivo* uvjetima. Naime, asimilacija prebiotičkih supstrata s probiotičkim bakterijama je glavni preduvjet za sinbiotički učinak u debelom crijevu, pa će buduća ispitivanja biti provedena *in vivo* na pokusnim životinjama.

Zahvala

Autori zahvaljuju Ministarstvu znanosti i tehnologije Republike Hrvatske na financijskoj potpori kroz znanstveno-istraživačke projekte, te Prehrambenoj industriji LURA d.d. (Razvoj proizvoda i tehnologije).

SYNBIOTIC PROPERTIES OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS M92

Summary

The scientific basis for the development of probiotics, prebiotics or their combination (synbiotics) stems from the knowledge that the gastrointestinal microflora is involved in protecting the host (man or animals) against colonization of the intestinal tract by non-indigenous microorganisms. The use of probiotics (live beneficial microorganisms) and prebiotics (non-digestible oligosaccharides) as food/feed supplements beneficially affect the host by improving its intestinal microbial balance. Bacterial strain **Lactobacillus acidophilus M92**, which was selected for probiotic activity according to complex scientific in vitro selection criteria, is presented in this work. Accurate taxonomic identification of **L. acidophilus M92** has been done by PCR method. The presence of S-layer proteins, hydrophobicity, autoaggregation, coaggregation and adhesion of **L. acidophilus M92** to porcine ileal epithelial cells were determined. Because the concept of synbiotic became a part of probiotic concept in last few years, it was also investigated the ability of **L. acidophilus M92** to assimilate the various kinds of prebiotic substrates (sorbitol, mannitol, lactulose, raffinose, oligofructose and inulin). The combination of probiotics and non-digestible carbohydrates (prebiotics) may be a way of stabilisation and/or improvement of the probiotic effect. Such synbiotics indicate a realistic way of using biological preparations in the prevention of gastrointestinal diseases in humans and animals.

Key words: probiotics, prebiotics, synbiotics, **Lactobacillus acidophilus**, adhesion ability

Literatura

- ADAMS, M. R., HALL, C. J. (1988.): Growth inhibition of food-born pathogens by lactic and acetic acid and their mixtures. *International Journal of Food Science and Technology* **23**, 287-292.
- BANINA, A., VUKAŠINOVIĆ, M., BRANKOVIĆ, S., FIRA, D., KOJIĆ, M., TOPISIROVIĆ, LJ. (1998.): Characterisation of natural isolate *L. acidophilus* BGRA43 useful for acidophilus milk production. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 593-599.
- BAIRD-PARKER, A. C. (1980.): Organic acids. U: *Microbial Ecology of Foods* (Silliker, J. H. ured.) Academic Press, New York, str. 126-135.
- BCCMTM/LMG – BACTERIA COLLECTION: www.belspo.be

- BELLON-FONTAINE, M.N., RAULT, J., VAN OSS, C. J. (1996.): Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial-cells. *Colloids and Surfaces* **7**, 47-53.
- BLAŽEKA, B., ŠUŠKOVIĆ, J., MATOŠIĆ, S. (1991.): Antimicrobial activity of lactobacilli and streptococci. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **7**, 533-536.
- BOOT, H. J., KOLEN, C. P. A. M., VAN NOORT, J. M., POUWELS, P. H. (1993.): S-Layer Protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Journal of Bacteriology* **175**, 6089-6096.
- BORIS, S., SUÁREZ, J.E., BARBÉS, C. (1997.): Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 413-420.
- BRKIĆ, B. (1995.): Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline, *Magistarski rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- BRKIĆ, B., ŠUŠKOVIĆ, J., MATOŠIĆ, S., GJURAČIĆ, K. (1995.): Ability of chosen lactic acid bacteria to produce antibacterial substances, *Prehrambeno-tehnološka i biotehnološka revija* **33**, 145-150.
- BUSWELL, C. M., HERLIHY, Y. M., MARSH, P. D., KEEVIL, C. W., LEACH S. A. (1997.): Coaggregation amongst aquatic biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 477-484.
- CAMPBELL, J. M., FAHEY, G. C., WOLF, B. W. (1997.): Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short chain fatty acids, pH and microflora in rats. *Journal of Nutrition* **127**, 130-136.
- CRITTENDEN, R.G. (1999.): Prebiotics. U: *Probiotics: A Critical Review*, (Tannock, G.W., ured.), Horizon Scientific Press, Wymondham, str. 141-156.
- CROW, V. L., GOPAL, P. K. (1995.): Cell surface differences of lactococcal strains. *International Dairy Journal* **5**, 45-68.
- DELCOUR, J., FERAIN, T., DEGHORAIN, M., PALUMBO, E., HOLLS P. (1999.): The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. U: *Proceedings of the 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, Veldhoven, The Netherlands, *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, Kluwer Academic Publishers, str. 159-184.
- DEL RE, B., SGORBATI, B., MIGLIOLI, M., PALENZONA, D. (2000.): Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* **31**, 438-442.
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M., SHARPE, E. (1960.): A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* **23**, 130-135.
- FUJISAWA, T., BENNO, Y., YAESHIMA, T., MITSOUKA, T. (1992.): Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al., 1980.) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura, 1981.) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 487-491.
- FULLER, R., BARROW, A., BROOKER B. E. (1978.): Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Applied and Environmental Microbiology* **35**, 582-591.

- GIBSON, G. R., ROBERFROID, M. B. (1995.): Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* **125**, 1401-1412.
- GIBSON, G.R., WANG, X. (1994.): Regulatory effects of bifidobacteria on growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 667-674.
- GJURAČIĆ, K., ZGAGA, Z. (1996.): Illegitimate integration of single-stranded DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* **253**, 173-181.
- GOPAL, P. K., SULLIVAN, P. A., SMART, J. B. (2001.): Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *International Dairy Journal* **11**, 19-25.
- GREEN, J.D., KLAENHAMMER, T.R. (1994.): Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 4487-4494.
- GUARNER, F., SCHAAFSMA, G.J. (1998.): Probiotics. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 237-238.
- HAVENAAR, R., HUIS in't VELD, J. H. J. (1992.): Probiotics. A General View. U: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, B. J. W. Wood (ured.), Elsevier Applied Science, London, str. 151-170.
- JONSSON, E., CONWAY P. L. (1992.): Probiotics for pigs. U: *Probiotics. The Scientific Basis*, R. Fuller (ured.), Chapman and Hall, London, str. 260-314.
- KASHKET, E. R. (1987.): Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Review* **46**, 233-244.
- KLAENHAMMER, T., ALTERMANN, E., ARIGONI, F., BOLOTIN, A., BREIDT, F., BROADBENT, J. CANO, R., CHAILLOU, S., DEUTSCHER, J. i sur. (2002.): Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Proceedings of the Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 29-58.
- KOS, B. (2001.): Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline, *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- KOS, B., ŠUŠKOVIĆ, J. GORETA, J., MATOŠIĆ, S. (2000.): Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology* **38**, 121-128.
- KOS, B., ŠUŠKOVIĆ, J., GORETA, J., MATOŠIĆ, S. (2002.): The influence of bile salt deconjugation on cholesterol removal from growth medium by *Lactobacillus acidophilus* M92, Proceedings of the 4th Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Central European Meeting, V. Lelas, P. Bogoni, J. Hribar, V. Mrša, G. Procida (ured.), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb str. 332-337.
- KULLEN, M. J., KLAENHAMMER T. R. (1999.): Genetic modification of intestinal lactobacilli and bifidobacteria. U: *Probiotics. A Critical Review*, G. W. Tannock (ured.), Horizon Scientific Press, Wymondham, str. 65-84.
- LAEMMLI, U. K. (1970.): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.

- LAUER, E., HELMING, C., KANDLER, O. (1980.): Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I. Abt. Orig.* **C1**, 150-168.
- MACFARLANE, G. T., MACFARLANE, S. (1997.): Human colonic microbiota: Ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **32**, 3-9.
- MÄYRÄ-MÄKINEN, A., MANNINEN, M., GYLLENBERG, H. (1983.): The adherence of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pigs and calves. *Journal of Applied Microbiology* **55**, 241-245.
- MOON, N. J. (1983.): Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology* **43**, 215-230.
- MUKAI, T., ARIHARA, K. (1994.): Presence of intestinal lectin-binding glycoproteins on the cell surface of *Lactobacillus acidophilus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **58**, 1851-1854.
- PELLETIER, C., BOULEY, C., CAYUELA, C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P., BELLON-FONTAINE, M.N. (1997.): Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1725-1731.
- PERRIN, S., GRILL, J.P., SCHNEIDER, F. (2000.): Effects of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in three species of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 968-974.
- PERRIN, S., WARCHOL, M., GRILL, J.P., SCHNEIDER, F. (2001.): Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 859-865.
- PRIEBE, M. G., VONK, R. J., SUN, X., HE, T., HARMSSEN, H. J. M., WELLING, G. W. (2002.): The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre- and probiotics. *European Journal of Nutrition* **41**, 1/2-1/10.
- REID, G., MCGROARTY, J.A., ANGOTTI, R., COOK, R.L. (1988.): *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology* **34**, 344-351.
- ROJAS, M., CONWAY, P.L. (1996.): Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 474-480.
- ROSENBERG, M., GUTNICK, D., ROSENBERG, E. (1980.): Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* **9**, 29-33.
- RUBIN, H. E. (1987.): Toxicological model for a two-acid system. *Applied and Environmental Microbiology* **36**, 623-624.
- SARA, M., SLEYTR, U. B. (2000.): S-layer proteins. *Journal of Bacteriology* **182**, 859-868.
- SCHNEITZ, C., NUOTIO, L., LOUNATMA, K. (1993.): Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *Journal of Applied Bacteriology* **74**, 290-294.

- ŠUŠKOVIĆ, J. (1996.): Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline, *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- ŠUŠKOVIĆ, J., KROBOT, M., MEHAK, M., MATOŠIĆ S. (1993.): Antimikrobna aktivnost *Lactobacillus acidophilus*. *Mljekarstvo* **43**, 95-106.
- ŠUŠKOVIĆ, J., BRKIĆ, B., MATOŠIĆ, S. (1997a): Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**, 57-73.
- ŠUŠKOVIĆ, J., BRKIĆ, B., MATOŠIĆ, S., MARIĆ, V. (1997b): *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft* **52**, 430-435.
- ŠUŠKOVIĆ, J., KOS, B., MATOŠIĆ, S. (1998.): Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend? *Mljekarstvo* **48**, 165-176.
- ŠUŠKOVIĆ, J., KOS, B., MATOŠIĆ, S., BESENDORFER, V. (2000.): The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**, 673-678.
- ŠUŠKOVIĆ, J., KOS, B., GORETA, J., MATOŠIĆ, S. (2001.): Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technology and Biotechnology* **39**, 227-235.
- ŠUŠKOVIĆ, J., KOS, B., FRECE, J., MATOŠIĆ, S. (2002.): Sinbiotički učinak bakterija mliječne kiseline: kritički pristup, *Plenarno predavanje*, 35. *Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka*, Lovran.
- ŠVOB, M. (1974.): *Histološke i histokemijske metode* str. 297-298. Sarajevo: Svjetlost.
- VANDEVOORDE, L., CHRISTIAENS, H., VERSTRAETE, W. (1992.): Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* **72**, 214-219.
- WALTER, J., TANNOCK, G. W., TILSALA-TIMISJARVI, A., RODTONG, S., LOACH, D. M., MUNRO, K., ALATOSSAVA T. (2000.): Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 297-303.

Adresa autora – Author's addresses:

Dr. sc. Jagoda Šušković, izv. prof.

Dr. sc. Blaženka Kos, viši asistent

Jadranka Frece, dipl. ing.

Dr. sc. Sunčica Beluhan, viši asistent

Dr. sc. Srećko Matošić, red. prof.

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zagreb, Pierottijeva 6

Prispjelo – Recieved: 08. 04. 2003.

Prihvaćeno – Accepted: 20. 06. 2003.