

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПРЕЖИВЯЕМОСТ ПРИ МОДЕЛНИ УСЛОВИЯ НА СТОМАШНОЧРЕВНИЯ ТРАКТ НА ПРОБИОТИЧЕН ЩАМ *LACTOBACILLUS PARACASEI* RN5

Р. Денкова¹, В. Янакиева², З. Денкова², Е. Галенова²

¹Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Биологически Факултет, Катедра „Биотехнология“,

бул. „Драган Цанков“ 8, София, rositsa_denkova@mail.bg

²Университет по Хранителни Технологии, Катедра „Микробиология“, бул. „Марица“ 26, Пловдив, zdenkova@abv.bg

АБСТРАКТ

Introduction. FAO/WHO defines probiotics as live microorganisms that confer beneficial effects on the host when administered in adequate amounts. Strains from the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are usually included in the composition of probiotic preparations. One of the requirements for a strain to be probiotic is to be able to survive in the conditions of the gastrointestinal tract.

Materials and methods. In order to identify the strain *Lactobacillus* RN5 (isolated from naturally fermented sourdough) 16S rDNA PCR amplification and sequencing of the gene for the 16S rRNA was performed. The sensitivity of the strain to the conditions in the gastrointestinal tract was tested *in vitro* in model conditions of the gastrointestinal tract - pH = 2 + pepsin; pH = 4,5 + pancreatin and pH = 7 + pancreatin as well as at different concentrations of bile salts – 0%; 0,15%; 0,3%; 0,6%; 1%.

Results and discussion. *Lactobacillus* RN5 was identified as representative of the species *Lactobacillus paracasei*. The strain is resistant to the model conditions of the gastrointestinal tract – it retains high concentrations of viable cells at the end of each of the experiments.

Conclusion. *Lactobacillus paracasei* RN5 is a potentially probiotic strain and after further studies can be included in the composition of probiotic preparations for prophylaxis and treatment.

Key words: probiotic, sequencing, *Lactobacillus*, pepsin, pancreatin

Въведение

Поддържането на равновесието на флората в стомаха и червата е необходимо условие за добро здраве. Възстановяването на баланс на чревната микрофлора се осъществява чрез приема на храни и концентрати, съдържащи полезни бактерии – лактобацили и бифидобактерии, известни като функционални храни и пробиотици. FAO определя пробиотиците като живи организми, които внесени в съответните количества оказват здравословен ефект върху организма [FAO, 2002].

Основните компоненти на пробиотиците са млечнокиселите бактерии (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*) и бифидобактериите, които се прилагат и при производството на пробиотични храни [Salminen et al., 1998a; Salminen & von Wright, 1998b; Gibson, 2004], като най-голям е делът на лактобацилите.

Не всички лактобацили могат да бъдат включени в състава на пробиотиците и пробиотичните храни, а само онези, които притежават определени свойства [Salminen et al., 1998a; Salminen & von Wright, 1998b]: да са част от естествената микрофлора при човека и животните; да притежават способност да адхезират към епителните клетки или клетъчни линии; да преживяват в условията на стомаха и червата, т.е. да преживяват в условията на киселинното рН в стомаха и да са устойчиви на действието на жлъчния сок [Segal et al., 1995]; да се репродуцират в стомашно-чревния тракт, усвоявайки преимуществено субстрата да потискат и изтласкват от биологичната ниша патогенните и токсигенни микроорганизми; да позволяват промишлено култивиране; да притежават антимикробна активност спрямо

условнопатогенните, карциногенни и патогенни микроби; да продуцират антимикробни вещества; да модулират имунния отговор; да са безопасни за клинично и хранително приложение.

Изследванията на Saxelin et al., 1996 a, b; Donohue & Salminen, 1996; Salminen et al., 1998a; Salminen & von Wright, 1998b показват, че безопасността на млечнокиселите бактерии и бифидобактериите е доказана и щамовете, отнасящи се към родовете *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Bifidobacterium* са най-често с GRAS статус.

Целта на настоящата статия е да се идентифицира щам *Lactobacillus* RN5 (изолиран от естествено ферментирало кисело тесто), както и да се определи устойчивостта му към моделните условия на стомашно-чревния тракт – различни стойности на рН и ензими (рН=2 + пепсин, рН=4,5 + панкреатин и рН=7 + панкреатин), както и към различни концентрации жлъчни соли.

Материали и методи

Хранителни среди:

Физиологичен разтвор. Състав (g/dm³): NaCl – 5 g. Стерилизация - 20 минути при 121°C.

LAPTg10-бульон. Състав (g/dm³): пептон – 15; дрождев екстракт – 10; триптон – 10; глюкоза – 10. рН се довежда до 6.6 – 6.8 и се добавя Tween 80 - 1cm³/dm³. Стерилизация - 20 минути при 121°C.

LAPTg10-агар. Състав (g/dm³): Среда LAPTg10-бульон + 2% агар. Стерилизация - 20 минути при 121°C.

Определяне на преживяемост при ниско рН в присъствие на пепсин и при слабо алкално рН в присъствие на панкреатин (Charteris W.P. et al., 1998)

Свежа 24-часова култура на изследвания щам се центрофугира 15 min при 5000 x g. Получената утайка от биомаса се промива двукратно с PBS-буфер и се ресуспендира до изходния обем в PBS-буфер. По 0.2 cm³ от клетъчната суспензия се инкубират с по 5 cm³ от буферен разтвор с рН=2, съдържащ 0,5% NaCl и пепсин (с концентрация 3.2 g/dm³) (Sigma, 2,500-3,500 U/mg protein) и буферен разтвор с рН=8, съдържащ 0,5% NaCl и панкреатин (с концентрация 1 g/dm³) (Sigma, 2,500-3,500 U/mg protein) при подходяща за изследваните щамове температура в продължение на 24h. На 0, 2, 4 и 24-ти час се вземат аликвоти за определяне на общия брой жизнеспособни клетки (cfu/cm³).

Определяне толерантност към жлъчни соли (по метода, модифициран от Денкова З., 2005)

Среда MRS-бульон с концентрация на жлъчни соли 0%, 0.15%, 0.3%, 0.6% и 1% се инокулира с 4% инокулум от 24 часова култура на изследвания щам. Следва култивиране в продължение на 24h при оптимална температура за съответния щам, като аликвоти за определяне на общ брой жизнеспособни клетки (cfu/cm³) се вземат на 0, 2, 4, 6, 8 и 24 h.

Генетични методи

1. Изолиране на тотална ДНК

Изолирането на ДНК се осъществява по метода на Delley et al., 1990.

2. PCR реакции и визуализация

Всички PCR реакции са осъществени с помощта на PCR кит - Ready To Go™ PCR beads (Amersham Biosciences), в обем 25 µl в Progene cycler (Techne, UK). Получените продукти са визуализирани в 2% агарозен гел, оцветени с разтвор на етидиев бромид (0.5 µg/ml), на UVP Documentation System (U.K.).

3. 16S rDNA амплификация

ДНК от изследвания щам се амплифицира при използването на универсални праймери за 16S рДНК гена - 27f (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') [Lane, 1991] и 1492r (5'ACCTTGTTACGACTT3') [Lane, 1991]. Амплификационната програма включва:

денатурация - 95°C за 3 min, 40 цикъла - 93°C за 30 s, 48°C за 60 s, 72°C за 60 s, крайна елонгация - 72°C за 5 min.

4. Пречистване на продукта от PCR- реакцията - 16S рДНК – от ТАЕ-агарозен гел

Пречистването на 16S рДНК се извършва с кит за пречистване на ДНК (GFX Microspin™) според инструкциите на производителя.

5. Секвениране на гена за 16S рРНК

Секвенирането на гена за 16S рРНК се извършва по метода на Sanger от „Macrogen Europe Laboratory”, Холандия.

Резултати и обсъждане

Lactobacillus RN5 е изолиран от естествено ферментирало кисело тесто.

За пълната видова идентификация на изследвания щам е използван молекулярно-генетичен метод за генотипиране - секвениране на гена за 16S рРНК.

```

> ref|NR\_025880.1| Lactobacillus paracasei subsp. paracasei strain R094 16S ribosomal
RNA, partial sequence
Length=1522

Score = 2671 bits (1446), Expect = 0.0
Identities = 1464/1472 (99%), Gaps = 4/1472 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 7      TTTGTCCACCCTTAGACGGCTCGCTCCCTAAAAGGGTTACGCCACCGGGTTCGGGTGTTA 66
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 1481    TTTGTCCACCCTTAGACGGCTCGCTCCCTAAAAGGGTTACGCCACCGGGTTCGGGTGTTA 1422

Query 67     CAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAACAAGCCCGGGAACGTATTCACCGGGCGG 126
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 1421    CAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAACAAGCCCGGGAACGTATTCACCGGGCGG 1362

Query 127    TCGTGTCCCGGATTAAGGATTCGGACTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCTACAGTCC 186
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 1361    TCGTGTCCCGGATTAAGGATTCGGACTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCTACAGTCC 1302

Query 187    GAAGTGAAGTGGCTTAAAGAGATTAGCTTGACCTCGGGTCTCGCAACTCGTTGTACCA 246
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 1301    GAAGTGAAGTGGCTTAAAGAGATTAGCTTGACCTCGGGTCTCGCAACTCGTTGTACCA 1242

Query 247    TCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGTCAATAGGGGATGATGATTGAGCTCATCCCC 306
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 1241    TCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGTCAATAGGGGATGATGATTGAGCTCATCCCC 1182

Query 307    ACCTTCCCTCCGGTTTGTACCGGCACTTACTAGATGCCAACTAAATGCTGGCACT 366
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 1181    ACCTTCCCTCCGGTTTGTACCGGCACTTACTAGATGCCAACTAAATGCTGGCACT 1122

Query 367    AGTCATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCACATCTCACGACAGAGTGACG 426
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 1121    AGTCATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCACATCTCACGACAGAGTGACG 1062

Query 427    ACACCATGCACACCTGTGATTTTCCCGCCGAAAGGGGAACCTGATCTCAGGTGATC 486
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 1061    ACACCATGCACACCTGTGATTTTCCCGCCGAAAGGGGAACCTGATCTCAGGTGATC 1002

Query 487    AAAAGATGTCAAGACCTGGTAAGTTCCTCGGGTTCCTCGAATTAACACATGCTCCA 546
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 1001    AAAAGATGTCAAGACCTGGTAAGTTCCTCGGGTTCCTCGAATTAACACATGCTCCA 942

Query 547    CGCTTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTCAACTTGGCGTCTACTCCCGC 606
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 941     CGCTTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTCAACTTGGCGTCTACTCCCGC 882

Query 607    GCGGAATGCTTAAATGCGTTAGCTGCGGCACTGAAGGCGGAAACCTTCCACACCTAGCA 666
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 881     GCGGAATGCTTAAATGCGTTAGCTGCGGCACTGAAGGCGGAAACCTTCCACACCTAGCA 822

Query 667    TTCATCGTTTACGGCATGGACTACAGGGTATCTAATCTGTTGCTACCCATGCTTTCG 726
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 821     TTCATCGTTTACGGCATGGACTACAGGGTATCTAATCTGTTGCTACCCATGCTTTCG 762

Query 727    AGCTCAGCGTCAAGTACAGACGAGACGCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATAT 786
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 761     AGCTCAGCGTCAAGTACAGACGAGACGCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATAT 702

Query 787    CTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCA 846
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 701     CTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCA 642

Query 847    GTTTCGGATGCGCTTCTCCGGTTAAGCCGAGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCC 906
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 641     GTTTCGGATGCGCTTCTCCGGTTAAGCCGAGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCC 582

Query 907    TCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGC 966
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 581     TCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGC 522

Query 967    TCTTGGCAGCTAGTTAGCCGTGGCTTCTTGGTTGGATACCCCTCAGCGCGGACAAAGTAC 1026
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 521     TCTTGGCAGCTAGTTAGCCGTGGCTTCTTGGTTGGATACCCCTCAGCGCGGACAAAGTAC 462

Query 1027   TCTGCCGACCATCTCTTCCCAACAAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCTCACTCAC 1086
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 461     TCTGCCGACCATCTCTTCCCAACAAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCTCACTCAC 402

Query 1087   GCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGGCTCATTGTGGAAGTTCCCTACTGCTGCCCTCCCGT 1146
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 401     GCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGGCTCATTGTGGAAGTTCCCTACTGCTGCCCTCCCGT 342

Query 1147   AGGAGTTTGGGCGGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGT 1206
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 341     AGGAGTTTGGGCGGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGT 282

Query 1207   ATCATCGCTTGGTGAAGCATTACCTCACCACCTAGCTAATACGCGCGGGGTCCATCCAA 1266
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 281     ATCATCGCTTGGTGAAGCATTACCTCACCACCTAGCTAATACGCGCGGGGTCCATCCAA 222
    
```

Фиг. 1. Сравнение между нуклеотидната последователност на 16S рДНК на *Lactobacillus*

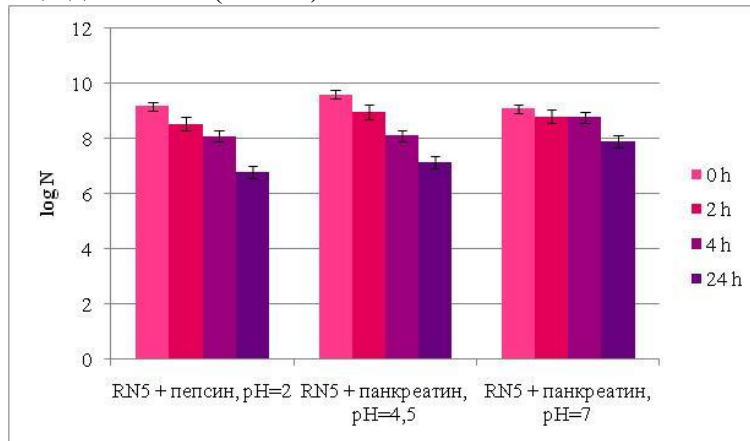
RN5 и частичната секвенция на 16S рДНК на *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* R094

След обработка на резултатите от секвенционния анализ на 16S рДНК с метода за on-line идентифициране на нуклеотидни последователности на неизвестни организми BLAST щам *Lactobacillus* RN5 се отнася към вида *Lactobacillus paracasei* с процент на съвпадаемост между нуклеотидната последователност на 16S рДНК на *Lactobacillus* RN5 и частичната секвенция на 16S рДНК *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* R094 – 99% (Фиг. 1).

В серия от опити е изследвана устойчивостта на клетките на *Lactobacillus paracasei* RN5 в изкуствено създадени условия на стомашно - чревния канал - рН=2 + пепсин, рН=4,5 + панкреатин и рН=7 + панкреатин. При паралелен експеримент е изследвана толерантността на този щам към високи концентрации на жлъчни соли. Получените резултати от експерименталните изследвания са представени на Фиг. 2 и Фиг. 3.

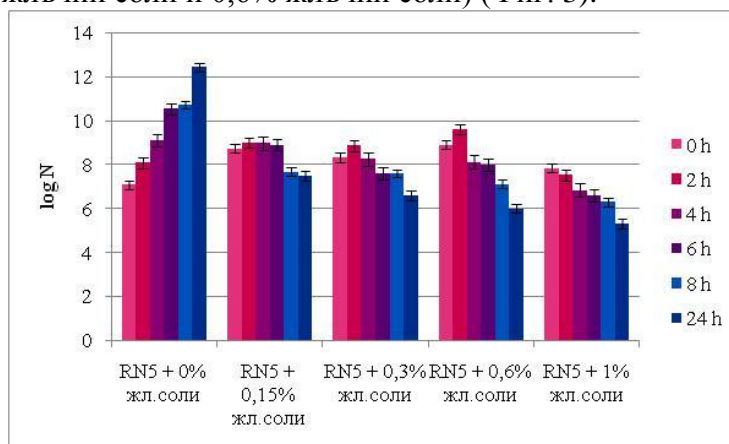
Lactobacillus paracasei RN5 е устойчив към различните комбинации на рН и ензими, както и към различни концентрации на жлъчни соли в средата – щамът запазва висока концентрация на жизнеспособни клетки до 24^а час.

При ниско рН (рН=2) и пепсин броят на живите клетки на *Lactobacillus paracasei* RN5 намалява с 1,2 logN за 4 часа и с 2,4 логаритмични единици до 24 часа, докато при рН=4,5 намаляването е с 2,5 логаритмични единици за 24 часа, а при рН=7 редукцията е само с 1,17 логаритмични единици до 24^а час (Фиг. 2).



Фиг. 2. Преживяемост на клетките на щам *Lactobacillus paracasei* RN5 в условията на кисело рН (рН=2) + пепсин, рН=4,5 + панкреатин и рН=7 + панкреатин.

При щам *Lactobacillus paracasei* RN5 нарастване на броя на жизнеспособните клетки (0.5 логаритмични единици) се наблюдава само при по-ниските концентрации (0,15% жлъчни соли; 0,3% жлъчни соли и 0,6% жлъчни соли) (Фиг. 3).



Фиг. 3. Преживяемост на клетките на *Lactobacillus paracasei* RN5 при различни концентрации на жлъчни соли в средата.

На 24 h при концентрация 1% жлъчни соли в хранителната среда е определена концентрация на жизнеспособни клетки 2×10^5 cfu/cm³.

Заклучение

Щам *Lactobacillus* RN5 (изолиран от естествено ферментирало кисело тесто) е идентифициран като предствител на вида *Lactobacillus paracasei*. Той е устойчив на различните стойности на рН и ензими (рН=2 + пепсин, рН=4,5 + панкреатин и рН=7 + панкреатин), както и на различните концентрации на жлъчни соли, което го прави подходящ за включване в състава за пробиотични препарати за профилактика и лечение.

Литература

1. Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., J. K. Collins, 1997. Selective detection, enumeration and identification of potential probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations, *International Journal of Food Microbiology*, 35, 1–27.
2. Denkova, Z., 2005, Production and application of probiotics, D. Sc. Thesis.
3. Delley, M., Mollet, B., H. Hottinger, 1990. DNA probe for *Lactobacillus delbrueckii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1967–1970.
4. Donohue, D.C., S. Salminen, 1996. Safety assessment of probiotic bacteria. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 5, 25 – 28.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
6. Gibson, G.R., 2004. From probiotics to prebiotics and a healthy digestive system. *J. of Food Science*, 69 (5), 141 - 143.
7. Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
8. Salminen, S., Ouwehand, A.C., E. Isolauri, 1998a. Clinical applications of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, 8, 563-572.
9. Salminen, S., A. von Wright, 1998b. *Current Probiotics – Safety Assured*, Scandinavian University Press, ISSN 0891-060X.
10. Saxelin, M., Rautelin, H., Chassy, B., Gorbach, S. L., Salminen, S., H. Makela, 1996a. Lactobacilli and septic infections in Southern Finland. *Clinical Infectious Diseases*, 22, 564 – 566.
11. Saxelin, M., S. Salminen, 1996b. The safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. *Infectious Diseases Clinical Practice*, 5, 331 – 335.
12. Segal, I. et al., 1995. Faecal short chain fatty acids in South African urban Africans and whites. *Dis. Colon Rectum*, 38 (7), 732 – 734.