

PROIECT DE CERCETARE POSTDOCTORALĂ – TIP PD

Titlul proiectului: IZOLAREA UNOR BACTERII LACTICE DIN PRODUSE VEGETALE FERMENTATE CU POTENȚIALE APLICAȚII ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ ȘI ÎN SĂNĂTATE

Director de proiect: Silvia Simona Grosu-Tudor

Durata proiectului: 2010 – 2012

Buget: 340.000 lei

Este cunoscut faptul că produsele vegetale sunt recomandate în dieta zilnică deoarece conțin cantități însemnate de antioxidanți, vitamine, fibre alimentare și minerale. Deși o cantitate mare de legume sunt consumate proaspete, acestea prezintă dezavantajul alterării rapide, iar în cazul utilizării acestora în diverse preparate culinare, acestea își modifică considerabil caracteristicile fizice și compoziția chimică. Din acest motiv, fermentarea produselor vegetale cu ajutorul bacteriilor lactice poate fi considerată cea mai simplă dar semnificativă metodă de conservare și totodată menținere și/sau îmbunătățire a proprietăților nutriționale și senzoriale ale produselor vegetale. Pe de altă parte, ca și în cazul produselor lactate, conservarea produselor vegetale (legume și fructe) prin acest procedeu, al fermentației lactice are și o serie de avantaje, pe lângă simpla conservare. Proliferarea bacteriilor lactice face ca aceste produse să fie mai ușor digerabile de către consumatori, iar conținutul lor în vitamine să crească. În plus, bacteriile lactice produc o serie de enzime utile, cu efecte benefice, precum și substanțe antibiotice și anticarcinogene. Principalul lor produs de fermentație, acidul lactic, contribuie la conservare, dar are și un efect benefic asupra creșterii microbiotei utile în intestinul consumatorilor.

Principalele obiective urmărite:

- Realizarea unei colecții de bacterii lactice obținute din produse vegetale fermentate (murături) (gogonele, varză, conopidă, castraveți, gogoșari, etc.), obținute tradițional, în gospodării mici din diferite zone ale țării.
- Identificarea la nivel de specie a tulpinilor nou izolate
- Testarea bacteriilor lactice din punct de vedere al producerii de exopolizaharide și bacteriocine și caracterizarea acestor metaboliți
- Evaluarea caracteristicilor probiotice ale bacteriilor lactice studiate

REZULTATE OBTINUTE:

În prima parte a proiectului au fost colectate probe constând în produse vegetale fermentate diverse (conopidă, gogonele, morcovi, varză, castraveti, etc.), din care bacteriile lactice au fost izolate, folosind medii de cultură sintetice (MRS). Coloniile dezvoltate pe aceste medii, prezentând aspecte diferite (mărime, culoare, formă), au fost prelevate, purificate și apoi

supuse unei identificări preliminare (colorație Gram, testul catalazei, morfologie celulară), iar cele de interes (Gram pozitive, catalază-negative) au fost depozitate la -75°C .

În total, au fost izolate un număr de 139 de tulpini de bacterii lactice care au fost folosite în experimentele ulterioare. Tulpinile bacteriene nou izolate au fost identificate prin tehnica (GTG)₅-PCR fingerprinting, acestea fiind identificate ca aparținând genurilor: *Lactobacillus*, *Weisella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*.

Producerea de exopolizaharide a fost evidențiată prin diferite metode: evidențierea caracterului „ropy” sau „mucoid” al culturilor pe mediu solid, a capsulei polizaharidice prin colorare specifică și observare la microscopul optic. Manifestarea caracterului „ropy” și „mucoid” variază în funcție de tulpina bacteriană testată și de sursa de carbon din mediul de creștere. Treizeci și unu de tulpini au prezentat colonii cu aspect „mucoid”, două dintre ele au avut aspect vâscos și s-au alungit atunci când au fost atinse cu o scobitoare sterilă, acestea fiind considerate „ropy”.

Dintre cele 139 de tulpini testate, un număr de 7 au fost identificate producătoare de exopolizaharide (EPS⁺). Două dintre aceste tulpini producând cantități de aproximativ 20 g/l de exopolizaharide (*Leuconostoc citreum* 177 și *Leuconostoc citreum* 52).

Determinarea compoziției glucidice a fost făcută folosind exopolizaharidele purificate prin dializă, care au fost hidrolizate cu HCl 8N timp de 3 ore la 100°C . Probele hidrolizate au fost analizate cu ajutorul cromatografiei în strat subțire Thin Layer Chromatography (TLC). Potrivit acestei metode, toate polizaharidele testate conțin în exclusivitate monomeri de glucoză.

Pentru selectarea tulpinilor de bacterii lactice producătoare de bacteriocine a fost folosită metoda spoturilor. În acest sens, celulele bacteriene au fost în prealabil îndepărtate prin centrifugare iar supernatantul rezultat a fost testat pentru producerea de bacteriocine. Ca tulpini indicator, au fost folosite 9 tulpini Gram pozitive (*Lactobacillus helveticus* 102, *Lactobacillus delbrueckii* susp. *bulgaricus* 6901^T, *Lactobacillus sakei* 13558, *Lactobacillus brevis* 6906, *Leuconostoc mesenteroides* 13562, *Pediococcus pentasaceus* 13561, *Bacillus licheniformis* B40, *Bacillus licheniformis* 12195, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) și 4 tulpini Gram negative (*Listeria monocytogenes* ATCC 1911, *Salmonella enterica* ATCC 14024, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). În urma acestor testări, două tulpini au manifestat activitate antimicrobiană față de *Lactobacillus sakei* 13558, iar 19 tulpini față de una sau toate cele trei tulpini de *Bacillus* folosite ca indicator. *Leuconostoc citreum* 344, a avut un efect antibacterian față de *Listeria monocytogenes* ATCC 1911, probabil datorat producerii unei bacteriocine, efectul menținându-se și după neutralizarea valorii pH a probei testate.

În final, proiectul de față îți propune evaluarea caracteristicilor probiotice ale bacteriilor lactice nou izolate printr-o serie de teste biochimice ce implică testarea toleranței la săruri biliare, la diferite concentrații de NaCl cât și estimarea ratei de supraviețuire la valori scăzute de pH. Rezultatele obținute în urma acestor testări arată o stabilitate a bacteriilor lactice testate la valori scăzute de pH (pH 3.0 și 4.0) cât și în prezența a 0.3% și 0.5 % săruri biliare. Faptul că bacteriile testate au supraviețuit la condițiile acide din stomac și în prezența sărurilor biliare, ne permite să considerăm că acestea pot fi folosite ca tulpini probiotice în vederea îmbunătățirii balanței microbiotei intestinale.

Pentru îndeplinirea tuturor obiectivelor și activităților propuse în cadrul acestui proiect, experimentele s-au derulat atât în cadrul Centrului de Microbiologie al Institutului de Biologie, București cât și în cadrul Laboratorului de Microbiologie Industrială și Biotehnologii alimentare al Universității Libere din Bruxelles. Rezultatele științifice originale obținute au fost publicate în reviste de specialitate în țară și în străinătate (2 articole ISI, 1 articol într-o revistă CNCSIS B+, un articol este tehnoredactat și va fi trimis la o revistă cu cotație ISI) și au fost prezentate la conferințe naționale și internaționale sub formă de postere (4) și o prezentare orală.