

EFFECT OF PARAPROBIOTICS ON THE MULTIPLICATION OF PROBIOTICS IN UNCONVENTIONAL MEDIA

EFFECTUL PARAPROBIOTICELOR ASUPRA MULTIPLICĂRII PROBIOTICELOR ÎN MEDII NECONVENȚIONALE

VASILE Mihaela-Aida, <https://orcid.org/0000-0002-7697-6638>

COTĂRLEȚ Mihaela, <https://orcid.org/0000-0002-1378-1542>

BAHRIM Gabriela-Elena, <https://orcid.org/0000-0001-8210-1793>

Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor,
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, România

Rezumat. Cercetările au urmărit influența suplimentării cu paraprobiotice, obținute prin tratamentul combinat încălzire ohmică și tratament termic al suspensiei de celule a culturii probiotice *Lactiplantibacillus plantarum* MIUG BL21, înainte și după fermentarea unor medii neconvenționale (colostru bovin și izolat proteic din zer) cu cultura starter probiotică *Lactiplantibacillus paraplantarum* MIUG BL74.

S-a urmărit multiplicarea probioticelor prin cultivarea în condiții aerobe și anaerobe. Astfel, au fost obținute și testate 6 produse fermentate, 3 produse fermentate pe bază de colostru bovin (P1-P3) și 3 probe fermentate pe bază de izolat proteic din zer (P4-P6), prin suplimentare cu paraprobiotice înainte și la sfârșitul fermentării. Produsele fermentate au fost caracterizate din punct de vedere al dinamicii de acidifiere și al viabilității culturii *Lactiplantibacillus paraplantarum* MIUG BL74. În proba P2 (proba în care paraprobioticele s-au adăugat înainte de fermentarea mediului neconvențional, colostru bovin), s-a evidențiat cea mai bună viabilitate a culturii probiotice, prin cultivare în condiții aerobe și anaerobe, respectiv $10,49 \pm 0,20 \log$ și $9,50 \pm 0,19 \log$. De asemenea, pentru proba P2 aciditatea titrabilă a înregistrat cea mai ridicată valoare, respectiv $138,75^\circ\text{Th}$. Mediul de fermentare neconvențional pe bază de colostru bovin s-a dovedit a fi benefic pentru multiplicarea culturii starter de probiotice, comparativ cu cel pe bază de izolat proteic din zer.

Cuvinte-cheie: *Lactiplantibacillus plantarum* MIUG BL21, *Lactiplantibacillus paraplantarum* MIUG BL74, colostru bovin, izolat proteic din zer, probiotice, paraprobiotice

Introducere

Probioticele sunt definite ca „microorganisme vii care, atunci când sunt administrate în cantități adecvate, conferă un beneficiu pentru sănătatea

gazdei” și cuprind bacterii (în principal genurile *Lactobacillus*, *Bacillus* și *Bifidobacterium*) și drojdii (*Saccharomyces*). Conform grupului de consens al Asociației Științifice Internaționale pentru Probiotice și Prebiotice (ISAPP), mecanismele de acțiune ale probioticelor depind de specificitatea tulpinilor și intraspeciei [6]. Rezultatele benefice asupra sănătății, susținute de rezultatele studiilor clinice, includ prevenirea și tratamentul bolilor intestinale, cum ar fi diareea infecțioasă și cea asociată cu antibiotice, boala inflamatorie a intestinului, sindromul colonului iritabil, infecția cu *Helicobacter pylori*, intoleranța la lactoză, alergii și boli atopice la copii [11]. Colostru bovin conține compuși nutritivi și substanțe bioactive cu impact benefic asupra organismului. Produsele pe bază de colostru sunt folosite în prevenirea și tratamentul multor boli datorită funcționalității lor. În zilele noastre, consumatorii sunt mai conștienți de efectele benefice asupra sănătății ale alimentelor funcționale, încât cererea pentru astfel de produse este în creștere. Deoarece produsele pe bază de colostru sunt folosite pentru a trata boli gastrointestinale, tulburări autoimune și diferite tipuri de cancer, acesta materie primă joacă un rol major în diversificarea gamei de nutraceutice [2, 8, 9]. Totodată zerul, un produs secundar rezultat din industria brânzeturilor, recunoscut ca fiind un produs valoros cu proprietăți nutriționale și funcționale importante, este folosit în diversificarea gamei de alimente și ingrediente cu proprietăți funcționale. Proteinele din zer au valoare biologică ridicată și sunt superioare altor proteine din alte surse (ou, soia și lapte), în principal datorită conținutului lor ridicat de aminoacizi esențiali cu lanț ramificat [5]. Rezultate recente au demonstrat că nu este nevoie ca celulele probiotice să fie vii pentru exercitarea beneficiilor pentru sănătate, fiind elaborat conceptul de metabiotice (pre-, pro-, post- și paraprobiotice) [10]. Postbioticele sunt metaboliți obținuți prin activitatea metabolică a celulelor în procesele fermentative sau eliberați din celulele lizate. Paraprobioticele denumite generic „probiotice fantomă” sunt celule moarte (intacte sau rupte), obținute prin diferite tratamente aplicate suspensiilor de celule (tratament termic, încălzire ohmică, ultrasonare etc.) [3].

În acest context, în acest studiu s-a urmărit influența adaosului de paraprobiotice obținute prin tratamentul combinat, încălzire ohmică și tratament termic, al suspensiei de celule ale tulpinii probiotice *Lactiplantibacillus plantarum* MIUG BL21, în diferite etape ale procesului de

fermentare (la început și la sfârșitul fermentației) asupra multiplicării culturii starter probiotice *Lactiplantibacillus paraplantarum* MIUG BL74. Fermentațiile au fost conduse în medii pe bază de 8% colostru bovin sau izolat proteic din zer.

Materiale și metode

Mediile neconvenționale utilizate ca medii de fermentare au fost colostrul bovin sub formă de pulbere (Axyar, Belgia) și izolatul proteic din zer (Alinda-Velco S.A., Grecia).

Culturile stoc de bacterii probiotice utilizate au fost: *Lactiplantibacillus paraplantarum* MIUG BL74 și *Lactiplantibacillus plantarum* MIUG BL21, păstrate prin congelare în soluție 40% (g/v) glicerol, la temperatura de -80°C, în Colecția de microorganisme cu indicativul MIUG din cadrul Platformei de cercetare Bioaliment (Facultatea Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, România).

Mediile de cultură utilizate în reactivarea culturilor probiotice și determinarea viabilității acestora au fost mediul MRS (de Man Rogosa, and Sharpe, Sigma-Aldrich Suedia) lichid (pH 6,2) și cu agar (pH 6,5).

Obținerea paraprobiopticelor s-a realizat prin inactivarea în totalitate a celulelor de *Lactiplantibacillus plantarum* MIUG BL21 prin încălzire ohmică (20 V/cm, 15 minute) și tratament termic (75°C, 15 minute) [1].

Realizarea produselor fermentate

În prima etapă, s-a obținut inoculul, prin reactivarea culturii stoc *Lactiplantibacillus paraplantarum* MIUG BL74, prin cultivare în mediul selectiv MRS lichid, timp de 48 h, la temperatura de 37°C. Ulterior, acesta a fost dimensionat, prin măsurarea densității optice la lungimea de undă $\lambda = 600$ nm, până la valoarea de 2,0. Mediile fermentative constituite din 8% (g/v) colostru bovin și câte 8% (g/v) izolat proteic din zer au fost sterilizate la temperatura de 105°C, timp de 15 min. După răcire, s-au inoculat cu 5% (v/v) cultură starter și probele s-au termostatat timp de 72 h, la temperatura de 37°C. Apoi, mediile au fost suplimentate cu 10% (v/v) paraprobioptice, înainte și după fermentare.

Au fost obținute 6 produse fermentate codificate astfel: P1 – colostru fermentat fără paraprobioptice, P2 – colostru fermentat cu adăugare de paraprobioptice

înainte de fermentare, P3 – colostru fermentat cu adăugare de paraprobiotice după fermentare, P4 - izolat proteic din zer fermentat fără paraprobiotice, P5- izolat proteic din zer fermentat cu adăugare de paraprobiotice înainte de fermentare, P6 - izolat proteic din zer fermentat cu adăugare de paraprobiotice după fermentare.

Măsurarea acidității titrabile

Aciditatea probelor fermentate s-a determinat prin titrare cu soluție 0,1N NaOH, în prezența indicatorului fenolftaleină. Astfel, într-un balon cotat de 50 mL s-au prelevat 4 g de probă fermentată. S-a completat volumul până la semn cu apă distilată. După omogenizare, s-au prelevat 10 mL și s-au titrat cu soluție 0,1N NaOH, în prezența fenolftaleinei, până la virajul culorii în slab roz, persistentă un minut. Aciditatea s-a determinat folosind formula de mai jos:

$$\text{Aciditatea, } ^\circ\text{Th} = V_{\text{NaOH } 0,1\text{N}} \times c_d$$

în care, $V_{\text{NaOH } 0,1\text{N}}$ – reprezintă volumul de NaOH 0,1N folosit la tirarea probei;
 c_d – coeficient de diluție (125).

Determinarea viabilității celulelor prin metoda de numărare indirectă

Din probele fermentate proaspete s-a recoltat câte 1g probă care a fost omogenizat cu 9 mL ser fiziologic steril (0,9% NaCl, g/v), realizându-se diluții decimale. Din ultimele două diluții succesive, s-au repartizat aseptice câte 1 mL suspensie, în câte două plăci Petri sterile în paralel și apoi s-au omogenizat cu 20 mL MRS cu agar, suplimentat cu 10 g/L carbonat de calciu, fluidificat și temperat [7]. Plăcile s-au termostatat apoi la temperatura de 37°C, timp de 72 h în condiții de aerobioză și anaerobioză, după care s-au numărat coloniile prin metoda indirectă de numărare [4]. Rezultatele s-au exprimat în log din unități formatoare de colonii/gram substanță uscată produs fermentat (log ufc/g substanță uscată produs fermentat).

Rezultate și discuții

Dinamica de acidifiere

Cele 6 produse fermentate obținute au fost analizate în ceea ce privește aciditatea la sfârșitul procesului fermentativ. Rezultatele sunt prezentate în Figura 1.

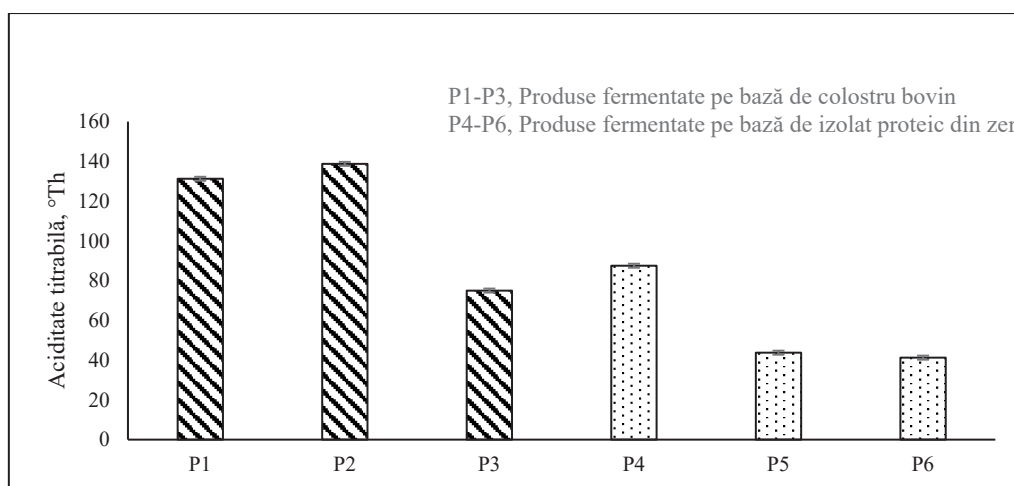


Fig. 1. Aciditatea produselor fermentate obținute prin variația condițiilor

Funcționalitatea culturii starter probiotice a fost superioară în mediul pe bază de colostru bovin, comparativ cu mediul pe bază de izolat proteic din zer, în concentrație similară (8%). Proba cu cea mai mare valoare a acidității titrabile, respectiv de 138,75°Th, a fost proba P2, în care paraprobioticele s-au adăugat înainte de fermentare. Adăosul de paraprobiotice la finalul procesului fermentativ conduce la scădere substanțială a acidității ca urmare a compușilor din suspensie cu conținut bazic.

Efectul paraprobioticelelor asupra viabilității culturii starter probiotice

Viabilitatea celulelor de *Lactiplantibacillus paraplantarum* MIUG BL74 în cele 6 produse fermentate a fost determinată la sfârșitul procesului fermentativ, prin cultivare în condiții de aerobioză și anaerobioză (Tabelul 1).

Tabelul 1. Efectul paraprobioticelelor asupra multiplicării probioticelelor

Probă	Viabilitate, log (ufc)/g s.u.	
	aerobioză	anaerobioză
P1	10,35±0,15	9,08±0,12
P2	10,49±0,20	9,50±0,19
P3	10,02±0,10	9,03±0,05
P4	9,15±0,12	7,42±0,30
P5	9,34±0,17	8,54±0,25
P6	9,31±0,25	8,43±0,20

Rezultatele obținute demonstrează calitatea superioară de substrat fermentativ pentru bacterii lactice probiotice a colostrului bovin, comparativ cu izolatul proteic din zer. Suplimentarea mediului fermentativ cu 10% paraprobiotice la începutul procesului fermentativ este benefică pentru multiplicarea celulelor și viabilitatea acestora în produsele fermentate obținute. Cultura probiotică utilizată crește în condiții aerobe, iar în anerobioză creșterea este ușor inhibată. Aceste rezultate sunt comparabile cu date din literatura de specialitate referitoare la fermentarea colostrului bovin sau a izolatului proteic din zer cu bacterii lactice [5, 12].

Concluzii

- Colostrul bovin (8%) poate constitui un substrat fermentativ benefic pentru cultivarea tulpinii probiotice *Lactiplantibacillus paraplantarum* MIUG BL74.
- Paraprobioticele obținute prin tratamentul combinat încălzire ohmică și tratament termic, în condiții particulare specifice pentru distrugerea celulelor culturii probiotice *Lactiplantibacillus plantarum* MIUG BL21, stimulează funcționalitatea metabolică a culturii probiotice *Lactiplantibacillus paraplantarum* MIUG BL74, dacă mediul fermentativ este suplimentat cu 10% paraprobiotice la începutul fermentației.
- Adăosul de 10% paraprobiotice la sfârșitul procesului fermentativ reduce la jumătate aciditatea produsului fermentat obținut prin fermentarea mediului pe bază de 8% colostru bovin.
- Obținerea și utilizarea paraprobioticelelor în formularea produselor și a ingredientelor funcționale deschide noi perspective pentru beneficii tehnologice și pentru sănătate.

Acknowledgments: This work was supported by a grant of the Ministry of Research, Innovation and Digitization, CNCS/CCCDI – UEFISCDI, project number PCE 159/2021, within PNCDI III.

Bibliografie:

1. ALMADA C. N., ALMADA-ERIX C. N., BONATTO M. S., PRADELLA F., PHILIPPE dos SANTOS, ABUD Y. K. D., FARIAS A. S., MARTÍNEZ J., SANT'ANNA F. C. B., LOLLO P. C., COSTA W. K. A., MAGNANI

- M., SANT'ANA. A. S. Obtaining paraprobiotics from *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* using six inactivation methods: Impacts on the cultivability, integrity, physiology, and morphology. *Journal of Functional Foods*, 2021, nr. 87, pp. 104826.
2. BARTKIENE E., BARTKEVICS V., IKKERE L. E., PUGAJEVA I., ZAVISTANAVICIUTE P., LELE V., RUZAUSKAS M., BERNATONIENE J., JAKSTAS V., KLUPSAITE D., ZADEIKE D., VISKELIS P., JUODEIKIENE G. The effects of ultrasonication, fermentation with *Lactobacillus* sp., and dehydration on the chemical composition and microbial contamination of bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 2018, nr. 101, pp. 6787-6798.
 3. BISWAS I., DAS MOHAPATRA P.K. Recent advancement in metabiotics: A consortium with bioactive molecules after fermentation by probiotic bacteria with multidisciplinary application potential and future solution in health sector, *Bioresource Technology Reports*, 2023, Volume nr. 23, 101583, <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101583>
 4. COMAN M. M., VERDENELLI M. C., CECCHINI C., SILVI S., VASILE A., BHRIM G. E., ORPIANESI C., CRESCI A.. Effect of buckwheat flour and oat bran on growth and cell viability of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and their combination SYN BIO®, in synbiotic fermented milk,, *International journal of food microbiology*, 2013, nr. 2 (167), pp. 261-268.
 5. CORDEIRO B. F., OLIVEIRA E. R., da SILVA S. H., SAVASSI B. M., ACURCIO L. B., LEMOS L., ALVES J. de L., ASSIS H. C., VIEIRA A. T., FARIA A. M. C., FERREIRA E. LOIR Y. Le, GWÉNAËL J., GOULART L. R. AZEVEDO V., CARVALHO R. D. de O., do CARMO F. L. R., Whey Protein Isolate-Supplemented Beverage, Fermented by *Lactobacillus casei* BL23 and *Propionibacterium freudenreichii* 138, in the Prevention of Mucositis in Mice. *Front. Microbiol.*, 2018, Sec. Infectious Agents and Disease, nr. 9, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02035>
 6. HILL C., GUARNER F., REID G., GIBSON G. R., MERENSTEIN D. J., POT B., MORELLI L., CANANI R.B., FLINT H. J., SALMINEN S.,

- CALDER P. C., SANDERS M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2014, nr. 11, pp. 506–514 10.1038/nrgastro.2014.66
7. KANG W., PAN L., PENG C., DONG L., CAO S., CHENG H., WANG Y., ZHANG C., GU R., WANG J., ZHOU H. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from human milk, *Journal Dairy Science*, 2020, nr. 103, pp. 9980–9991 <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18704>
 8. MEHRA R., SINGH R., NAYAN V., BUTTAR H. S., KUMAR N., KUMAR S., BHARDWAJ A., KAUSHIK R., KUMAR H. Nutritional attributes of bovine colostrum components in human health and disease: A comprehensive review, 2021, *Food Bioscience*, nr. 40, pp. 1-15.
 9. MIZELMAN E., DUFF W., KONTULAINEN S., CHILIBECK P. D. 2018. Chapter 4 - The Health Benefits of Bovine Colostrum, 51-60. In: *Nutrients in Dairy and their implications on Health and Disease*, Watson R. R., Preedy V. R., Collier R. J., Academic Press, ISBN 978-0-12-809762-5.
 10. RAMAN A. S., WHITE K. I., RANGANATHAN R., Origins of Allosteric and Evolvability in Proteins: A Case Study, *Cell* 166, pp. 468–480, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.047>
 11. SÁNCHEZ B., DELGADO S., BLANCO-MÍGUEZ A., LOURENÇO A., GUEIMONDE M., MARGOLLES A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease, *Molecular Nutrition Food Research*, 2016, 10.1002/mnfr.201600240.
 12. YOU L.X., CAI D., REN L.L., LIU J.S. Studies on the fermentation characteristics of *B. bifidum* in colostrums. *Chin. Dairy Ind.* 2006, nr. 10, pp. 27–28.