

Biodiversity and prebiotic effects of heteropolysaccharides produced by thermophilic lactic acid bacteria - 2003-2006 – program de cooperare bilaterală România – Flandra – finanțat de MECT, respectiv de Ministerul Comunității Flamande din Belgia – 74.285,47 EURO + 119 milioane lei (coordonator din partea română Dr. Medana Zamfir), participanți: Institutul de Biologie București, Vrije Universiteit Brussels

Utilizarea intenționată și controlată a exopolizaharidelor produse de bacteriile lactice ca aditivi alimentari naturali sau a culturilor starter funcționale (de exemplu tulpini producătoare de exopolizaharide interesante, poate avea drept rezultat un produs sigur, natural și poate avea un impact deosebit în obținerea de produse alimentare noi, în special a produselor alimentare cu proprietăți reologice, textură și stabilitate îmbunătățite și/sau capacitate de reținere a apei. Având în vedere că bacteriile lactice nu sunt dăunătoare, producerea “in situ” a exopolizaharidelor funcționale nu necesită teste de toxicitate, iar produsele obținute astfel pot fi scoase pe piață mult mai repede. Pe de altă parte, EPS stabile în condiții de pH acid și în prezența enzimelor pancreatice și a sărurilor biliare ar putea fi folosite ca prebiotice, în condițiile în care pot fi metabolizate selectiv de bacteriile utile din intestin, de tipul bifidobacteriilor sau lactobacililor. În acest sens, testarea prin experimente *in vitro* a stabilității în condiții similare celor din tractul gastro-intestinal este un prim pas, esențial pentru definirea EPS testate ca prebiotice.

Proiectul de față și-a propus, în primul rând, selectarea de tulpini bacteriene producătoare de EPS (atât homo-, cât și heteropolizaharide). EPS produse de aceste tulpini au fost izolate, purificate și caracterizate din punct de vedere biochimic (compoziție glucidică, masă moleculară, tipul de legătură glucidică). În ultima etapă a fost studiată posibilitatea utilizării EPS izolate ca prebiotice.

În scopul selectării de bacterii lactice producătoare de EPS au fost testate tulpini din colecția laboratorului, dar și tulpini noi izolate din lapte și produse lactate fermentate în mod tradițional (smântână, iaurt), colectate în diferite zone ale României. Izolarea tulpinilor s-a făcut în mod selectiv, pe medii specifice și au fost selectate doar coloniile cu aspect mucoïd sau vâscos. Tulpinile izolate au fost identificate folosind tehnici clasice, morfologice, fenotipice, dar și metode biochimice și moleculare moderne (analiza spectrului proteic total prin SDS-PAGE, rep-PCR, secvențializarea ARNr 16S, hibridizare ADN-ADN), care au permis identificarea la nivel de specie.

Selecția de tulpini producătoare de EPS s-a făcut pe baza unui set de metode, incluzând metode clasice, cum ar fi evidențierea prin microscopie optică a capsulei polizaharidice, aspectul coloniilor, izolarea efectivă a EPS prin precipitarea din mediul de cultură cu acetonă, combinate cu metode noi, moderne, cum ar fi screeningul genetic și metodele bazate pe gel-filtrare. Polizaharidele izolate au fost purificate și caracterizate biochimic. Masa moleculară a fost

determinată prin gel filtrare, iar compoziția glucidică prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu detecția amperometrică (HPAEC-PAD). Pentru una dintre tulpinile producătoare, *Streptococcus thermophilus* ST111, au fost realizate și studii de cinetică a producerii de EPS, a fost testat efectul condițiilor de cultivare (compoziția mediului, temperatura, pH) asupra producerii de EPS și s-au stabilit condițiile optime de creștere și producere a EPS. O observație importantă a fost că suplimentarea mediului de cultură (laptele) cu anumite surse de azot (hidrolizat de lactalbumină), care nu conțin polizaharide ce pot interfera cu EPS bacteriene, determină o creștere remarcabilă a cantității de EPS produs.

În fine, în ultima etapă a proiectului a fost demarat studiul efectului prebiotic al unora dintre EPS selectate. A fost testată digestibilitatea EPS în condiții de simulare *in vitro* a trecerii prin stomac și intestin (în condiții de aciditate ridicată, în prezența enzimelor pancreatice și a sărurilor biliare). Rezultatele au fost promițătoare, nici unul dintre EPS testate nu a fost digerat în aceste condiții, iar aceasta este una dintre condițiile esențiale pentru un prebiotic, aceea de a ajunge nedigerat în colon.

Diseminarea rezultatelor:

1. Vanningelgem, F., M. Zamfir, T. Adriany, A.P. Laws, L. De Vuyst, 2004, *Streptococcus thermophilus* ST111 produces a stable, high-molecular-mass exopolysaccharide in milk, *International Dairy Journal* (IF 1,620), 14(10), 857-864.
2. Vanningelgem, F., M. Zamfir, T. Adriany, L. De Vuyst, 2004, Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST111 in milk-based medium, *Journal of Applied Microbiology* (IF 1,743), 97(6), 1257-1273.
3. M. Zamfir, F. Vanningelgem, S. Tudor, A. Laudoniu, L. De Vuyst, 2004, Isolation and characterization of some exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* and their importance in obtaining yoghurt with improved rheological properties, *Proceedings of the Institute of Biology*, vol. VI, 435-444.
4. M. Zamfir, S. Grosu-Tudor, F. Vanningelgem, L. De Vuyst, 2005, Influence of the growth conditions on exopolisaccharides production by selected *Streptococcus thermophilus* strains, *Proceedings of the Institute of Biology*, vol. VII, 337-345.
5. Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S.S., Mozzi, F., Vanningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, G., De Vuyst, L., 2007, Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved, *International Journal of Food Microbiology* 118, 250-258.
6. Zamfir M., Tudor S., Van der Meulen R, Vanningelgem F., De Vuyst L. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, Flemish-Romanian Workshop on

Lactic acid bacteria: Biodiversity and functional properties, 23 noiembrie, Bruxelles, Belgia.