

OCENA WPŁYWU PREPARATU NIGEROOLIGOSACHARYDÓW NA WZROST I AKTYWNOŚĆ KWASOTWÓRCZĄ BAKTERII MLEKOWYCH ZWIĄZANYCH ZE ŚRODOWISKIEM ŻYCIA PSZCZOŁY MIODNEJ (*APIS MELLIFERA* L.)



Kamila Wlizło¹, Aneta A. Ptaszyńska², Adam Waško³, Ewa Sajnaga⁴, Marcin Grąż⁵, Klaudia Gustaw³, Adrian Wiater¹

¹ Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

² Katedra Immunobiologii UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

³ Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywności Człowieka UP, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

⁴ Katedra Biomedycyny i Badań Środowiskowych KUL, ul. Konstytucyjna 1J, 20-708 Lublin

⁵ Katedra Biochemii i Biotechnologii UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin



Cel badań

Celem badań było określenie wpływu nigerooligosacharydów na selektywną stymulację wzrostu bakterii mlekowych związanych ze środowiskiem życia pszczoły miodnej oraz wytwarzanie kwasów karboksylowych podczas hodowli tych mikroorganizmów.

Wstęp

Zgodnie z raportem Instytutu Ogródnictwa, Zakładu Pszczelnictwa w Puławach, straty rodzin pszczelich po zimowaniu, odnotowane wiosną 2020 roku, wyniosły średnio 20,2% (Semkiw, 2020). Za ten stan rzeczy odpowiedzialnych jest kilka przyczyn, a jedną z nich są choroby pszczoł, takie jak: warroza związana z rozwojem roztoczy *Varroa destructor*, czy też nosemoza powodowana przez grzyby *Nosema apis* i *N. cerenae*. W przypadku pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) wszelkie zmiany chorobowe, czy też te związane z antropopresją prowadzą do natychmiastowych zmian jej mikrobiomu. Dlatego niezwykle ważne jest poszukiwanie nowych substancji, w tym substancji o aktywnościach prebiotycznych, które zabezpieczyłyby przewód pokarmowy pszczoł przed niekorzystnym działaniem patogenów.

Korzyści płynące ze stosowania prebiotyków nie są bezpośrednie. Pozytywny wpływ na zdrowie gospodarza przypisuje się głównie obecności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, których wzrost i aktywność zostały pobudzone w wyniku działania prebiotyków. Poza tym, jak wykazały liczne badania, bakterie bytujące w świetle jelita, stymulowane obecnością prebiotyków, wytwarzają metabolity określane jako postbiotyki, do których zaliczane są m. in. kwas mlekowy oraz krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe SCFA. Wśród produkowanych SCFA najczęściej wymienia się kwas octowy, propionowy, masłowy, walerianowy i kapronowy. Kwasy te obniżają pH redukując ilość niekorzystnej mikroflory, odgrywają istotną rolę w regulacji metabolizmu lipidów, wspomagają absorpcję związków mineralnych w jelitach poprzez zwiększenie ich rozpuszczalności, a także korzystnie oddziałują na metabolizm glukozy i białek w wątrobie.

Wiele oligosacharydów jest już obecnych na rynku dodatków do żywności, jednak ciągle poszukuje się nowych związków o potencjale prebiotycznym. Do takich substancji należą, m. in. słabo poznane nigerooligosacharydy czyli (1→3)-α-D-glukooligosacharydy, otrzymywane na drodze hydrolizy (1→3)-α-D-glukanów.

Wyniki



Otrzymanie i charakterystyka nigerooligosacharydów

Nigerooligosacharydy otrzymano poprzez kwaśną hydrolizę (1→3)-α-D-glukanów, wg metody opisanej przez Wiater i wsp. (*Molecules*, 2020; 25(23): 5542). Identyfikację produktów końcowych hydrolizy przeprowadzono w sposób jakościowy i ilościowy w oparciu o analizę HPLC (Rys. 1). W hydrolizacie stwierdzono obecność glukozy (18,3%) oraz oligomerów glukozy, połączonych wiązaniem α-(1→3)-glikozydowym, o stopniu polimeryzacji (SP) od 2 do 10 (81,7%).



Określenie wpływu nigerooligosacharydów na selektywną stymulację wzrostu bakterii mlekowych związanych ze środowiskiem życia pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.)

W celu zbadania wpływu nigerooligosacharydów na selektywną stymulację wzrostu bakterii mlekowych związanych ze środowiskiem życia pszczoły miodnej, wykorzystano szczepy referencyjne należące do gatunków: *Fructobacillus fructosus*, *F. ficulneus*, *F. tropaeoli*, *Apilactobacillus kunkeei*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Apilactobacillus kunkeei* pochodzących od pszczoł od materiałów pszczelarskich.

Hodowle prowadzono w podłożu MRS pozbawionym źródeł węgla, z dodatkiem 0,05% (w/v) chlorowodoru L-cysteiny i uzupełnionym dodatkiem 1% (w/v) preparatu nigerooligosacharydów. Jako kontroli pozytywnej użyto podłoża MRS suplementowane referencyjnymi prebiotykami – fruktooligosacharydami lub glukozą w stężeniu 1% (w/v) oraz 0,18% (ilość glukozy (18,3%) w preparacie nigerooligosacharydów). Hodowle bakterii prowadzono w automatycznym czytniku wzrostu mikroorganizmów (Bioscreen C, Finlandia) i co dwie godziny monitorowano ich gęstość optyczną (OD₆₀₀). Analiza uzyskanych wyników wykazała, że wzrost wszystkich badanych szczepów był stymulowany obecnością nigerooligosacharydów w podłożu hodowlanym. Krzywe wzrostu badanych bakterii, wskazują wyraźnie, że zdolność do utylizacji poszczególnych cukrów obecnych w hydrolizacie (1→3)-α-D-glukanów jest szczepozależna (Rys. 2).



Badanie zawartości kwasu mlekowego oraz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) podczas hodowli bakterii mlekowych w podłożu zawierającym nigerooligosacharydy jako źródło węgla

Badanie zawartości kwasu mlekowego oraz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) wykonano w płynach hodowlanych, które otrzymano w trakcie 3-dniowych hodowli mikroorganizmów w podłożu MRS suplementowanym 1% dodatkiem hydrolizatu (1→3)-α-glukanów. Analiza jakościowa i ilościowa metabolitów, wykonano techniką HPLC w oparciu o kolumnę REZEX 8u 8% H Organic Acid.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że profil produkowanych kwasów w przypadku badanych szczepów był bardzo zróżnicowany (Rys. 3). Sumarycznie, największą ogólną ilość kwasów w trakcie 3-dniowej hodowli wydzielał do podłoża szczep *Leuconostoc mesenteroides* KBMiŻC-7K_4. Natomiast, największym zróżnicowaniem profilu metabolicznego charakteryzował się szczep *Apilactobacillus kunkeei* KBMiŻC-7K_11, który już od pierwszego dnia hodowli produkował znaczne ilości kwasu mlekowego, octowego oraz masłowego.

Materiały i metody



Otrzymanie i charakterystyka nigerooligosacharydów

Preparat nigerooligosacharydów otrzymano poprzez kwaśną hydrolizę (1→3)-α-D-glukanów wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego (*Laetiporus sulphureus*). Weryfikację jakościową i ilościową preparatu wykonano w oparciu o analizę HPLC z użyciem kolumny Rezex RSO-Oligosaccharide Ag+.



Określenie wpływu nigerooligosacharydów na selektywną stymulację wzrostu bakterii mlekowych związanych ze środowiskiem życia pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.)

Hodowla wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej:

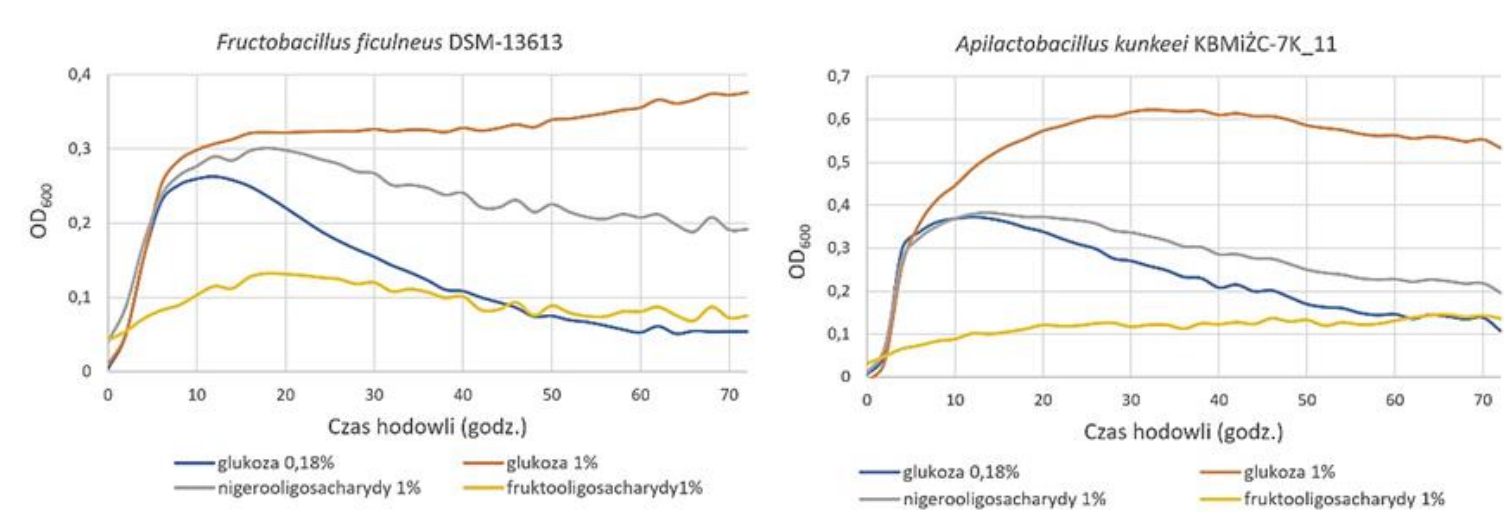
1. *Fructobacillus fructosus* DSM-20349
2. *Fructobacillus ficulneus* DSM-13613
3. *Fructobacillus tropaeoli* DSM-23246
4. *Apilactobacillus kunkeei* DSM-12361
5. *Leuconostoc mesenteroides* KBMiŻC-7K_4
6. *Apilactobacillus kunkeei* KBMiŻC-7K_11,

proszono na płytkach 100-dółkowych Honeycomb microplate (Fisher Scientific, Wielka Brytania) w automatycznym czytniku wzrostu mikroorganizmów Bioscreen C Microbiology Reader (LabSystem, Finlandia) w selektywnym podłożu hodowlanym MRS (ang. *De Man, Rogosa, and Sharpe*) z dodatkiem nigerooligosacharydów lub referencyjnego prebiotyku, tj. inuliny lub FOS (kontrola pozytywna).

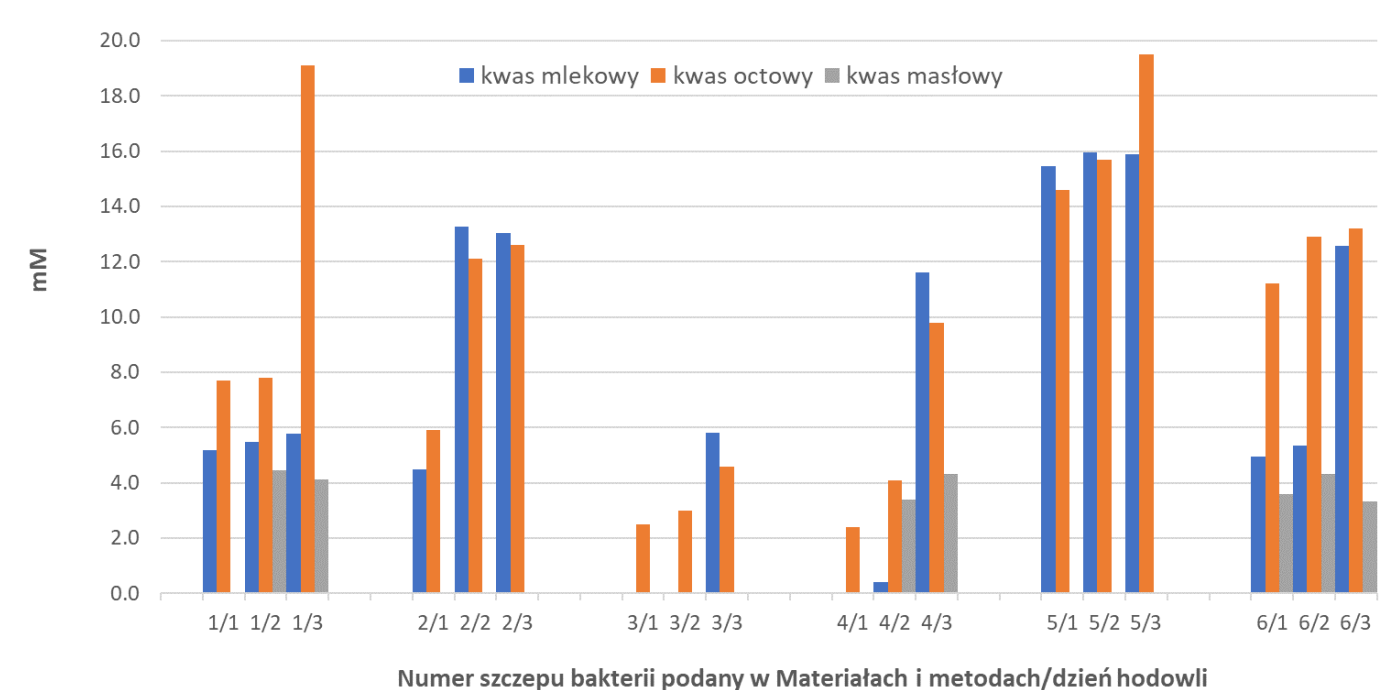


Badanie zawartości kwasu mlekowego oraz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) podczas hodowli bakterii mlekowych w podłożu zawierającym nigerooligosacharydy jako źródło węgla

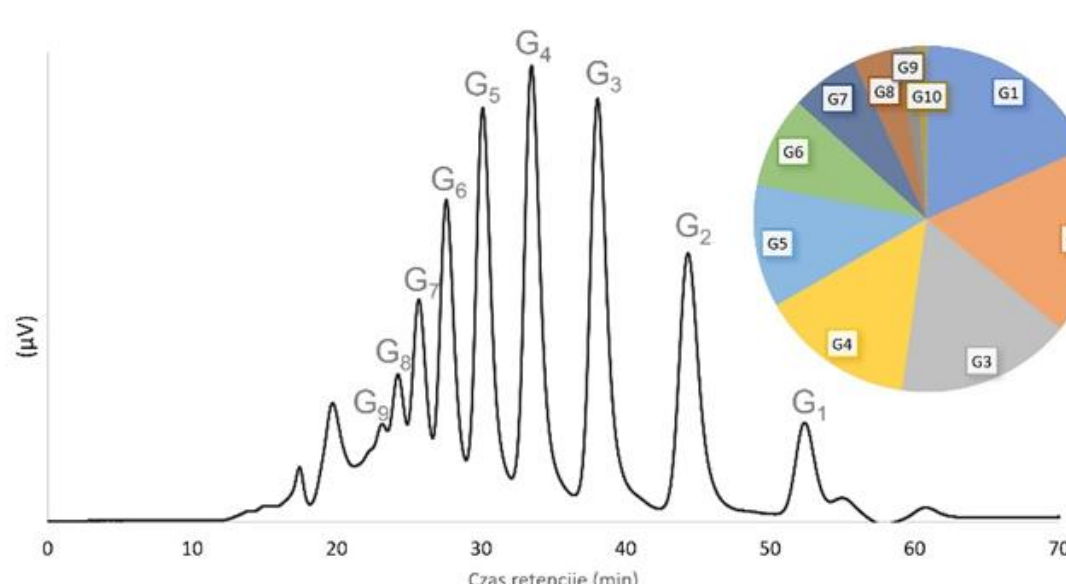
Hodowle mikroorganizmów prowadzono w probówkach typu Eppendorf á 5 ml w podłożu MRS (3,5 ml/probówkę) z dodatkiem nigerooligosacharydów (1%). Analiza jakościowa i ilościowa kwasu mlekowego oraz kwasów karboksylowych SCFA w płynach fermentacyjnych bakterii mlekowych wykonano techniką HPLC na chromatografii cieczowej Prominence LC-20A (Shimadzu, Japonia), wyposażonym w kolumnę REZEX 8u 8% H Organic Acid (300 x 7,8 mm) i detektor z matrycą diodową DAD SPD-M20A.



Rys. 2. Ocena wpływu nigerooligosacharydów na wzrost wybranych fruktofilnych bakterii mlekowych.



Rys. 3. Zmiany zawartości kwasów karboksylowych w podłożu hodowlanym MRS zawierającym hydrolizat (1→3)-α-glukanów jako źródło węgla, w czasie 72-godzinnej hodowli fruktofilnych bakterii fermentacji mlekowej.



Cukry (%)									
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
18,3	17,6	16,4	14,4	11,5	8,5	6,4	4,1	1,7	1,1
G1: glukoza, G2-G10: (1→3)-α-D-glukooligosacharydy o stopniu polimeryzacji od 2 do 10									

Rys. 1. Charakterystyka hydrolizatu (1→3)-α-D-glukanów.

Podsumowanie

• Wykazano stymulację wzrostu fruktofilnych bakterii mlekowych w podłożu hodowlanym, zawierającym nigerooligosacharydy jako jedyne źródło węgla. Uzyskany efekt, daje nadzieję na wykorzystanie nigerooligosacharydów w unikalnym preparacie synbiotycznym do utrzymania dobrostanu pszczoł zdrowych, a także leczeniu osobników chorych.

• Wykazano, że cukry obecne w hydrolizacie (1→3)-α-D-glukanów są selektywnie wykorzystywane przez fruktofilne bakterie fermentacji mlekowej, co z kolei stymuluje u nich wytwarzanie kwasu mlekowego oraz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, tj. kwasu mlekowego, octowego i masłowego.