

IN VITRO MODEL Y ADHERENCE PROBIOTIK - PŘEHLED

R. Kadlec¹, L. Křížová², D. Halová¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

² Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o.

In vitro models of probiotics adhesion - a minireview

Abstrakt

Příspěvek se zabývá problematikou stanovení adherence probiotických kmenů bakterií metodami *in vitro*. V úvodu je popsána mukózní vrstva nacházející se v gastrointestinálním traktu a její charakteristické vlastnosti. Dále je popsána problematika probiotik a kritérií používaných při selekci potenciálních probiotických kmenů, z nichž nejdůležitější je adherence. Stručně jsou popsány a porovnány používané *in vitro* modely pro studium adherence probiotických kmenů.

Klíčová slova: adherence, probiotika, *in vitro*, mucin, buněčné kultury

Abstract

Minireview is focused on the problems of determination of adhesion of probiotic strains using *in vitro* models. At first, description of gastrointestinal mucus layer and its characteristic properties is given. Further, probiotics and criteria used for their selection are characterised with adhesion as the most important selection criterion. Currently used *in vitro* models are described and compared.

Key words: adhesion, probiotics, *in vitro*, mucin, cell cultures

Úvod

Mukózní povrch je přirozenou bariérou gastrointestinálního traktu, která jej chrání před patogenními mikroorganismy. Je komplexním organickým systémem tvořeným intestinálním epitelem, imunitními buňkami a rezidentní mikroflórou. Intestinální epitel je pokryt specializovanými pohárkovými buňkami, které sekretují vysokomolekulární glykoproteiny nazývané mucin, který má silný negativní povrchový náboj a velkou hydratační kapacitu. Tvoří hlavní strukturální složku mukózní vrstvy. Mucin se nachází především na obvodu epiteliálních buněk a v jejich extracelulárním prostředí nebo pokrývá epiteliální buňky. Vrstva mucinu slouží nejen jako bariéra, která brání difuzi nežádoucích makromolekul a pronikání škodlivých substancí a toxinů do vnitřního prostředí, ale má i mnoho dalších funkcí, jako je lubrikace lumenu střeva usnadňující pasáž tráveniny, zachovávání hydratační vrstvy epitelu a tvoří propustnou gelovou vrstvu pro výměnu plynů a živin s intestinálním

epitelem. Muciny mohou také obsahovat specifické oligosacharidy, které napodobují svojí strukturou epiteliální receptory, na které naváží patogenní bakterie, a tím je imobilizují. Kromě toho obsahují vazebná místa pro rezidentní mikroflóru a udržují vysoké koncentrace imunoglobulinu a tím brání ataku a kolonizaci patogenních mikroorganismů¹.

Doposud bylo identifikováno na 20 různých typů mucinů. V gastrointestinálním traktu, především pak v tlustém střevě, převládá mucin označený MUC2. V nedávných studiích bylo zjištěno, že se tento mucin skládá ze dvou vrstev. Ačkoliv obě vrstvy jsou tvořeny převážně MUC2 mucinem, mají rozdílné vlastnosti a funkce. Vnitřní vrstva přiléhá k epitelu střeva a je prostá bakterií, protože má ve své struktuře pouze malé póry, které neumožňují přímý kontakt s epiteliálními buňkami. Vnější vrstva ohraničuje lumen a vzniká chemickými a fyzikálními pochody z vrstvy vnitřní, má menší hustotu a obsahuje vysoký počet bakterií, kterým skýtá ideální prostředí - je pro ně nejen důležitým zdrojem energie, ale rovněž umožňuje vazbu bakterií na četná vazebná místa. Vnitřní přilnavou vrstvu je možné odstranit pouze jemným seškrábnutím, zatímco vnější, volně přiléhající vrstva se dá snadno odstranit šetrným odsátím².

Rezidentní mikroflóra, která trvale sídlí v gastrointestinálním traktu je tvořena především bifidobakteriemi, laktobacily, enterokoky a propionibakteriemi, které se podílejí na udržování rovnováhy mikrobiálního prostředí, na omezování kolonizace a invaze patogenů, na zachování epiteliální integrity a na podpoře imunitních funkcí. Pro zachování a podporu výše uvedených vlastností rezidentní mikroflóry se ve výživě člověka využívají probiotika. Od probiotických kmenů se očekává, že budou mít především schopnost kolonizovat, alespoň dočasně, mukózní povrch tlustého střeva a chránit sliznici před napadením patogeny, jakými jsou např. některé kmeny *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* nebo jiné intestinální nebo potravní patogeny, dále schopnost povzbuzovat imunitní odezvy organismu a také by měly vykazovat antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti³. Základním a nezbytným předpokladem pro výše uvedené vlastnosti probiotických bakterií je jejich schopnost adherence k intestinálnímu mukóznímu gelu nebo k epiteliálním buňkám⁴. Bakteriální adherence k intestinálnímu povrchu je často zprostředkována pomocí specifických vazeb mezi proteiny bakteriálního povrchu (lektiny) ke komplementárním oligosacharidům na povrchu tkání. Nicméně bakterie mohou také adherovat nespecificky, pomocí hydrofobních interakcí s intestinálním povrchem⁵. Kmeny s nejvyšší schopností adherence mají největší vliv na zdraví hostitele³. Proto je adherence považována za jedno ze základních selekčních kritérií pro probiotické mikroorganismy.

Stanovit adhezenci mikroorganismů metodou *in vivo* je obtížné, proto byly vyvinuty modely studií *in vitro*, které mohou být prováděny na různých površích simulujících

prostředí střeva. Nejčastěji jsou v těchto studiích používány humánní epiteliální buněčné linie HT-29 a Caco-2 (např. 6), které jsou obecně považovány za modely diferencované humánní intestinální mukózy, protože vykazují v modelech *in vitro* morfologické a funkční vlastnosti dospělých enterocytů⁶. Komparativní studie rovněž sledují adhezenci bakterií k buňkám HT29-MTX, což je homogenní populace humánních pohárkových buněk sekretujících mukus s cílem zjistit podíl mukózní vrstvy na interakci bakterií s intestinálním povrchem⁶. V pokusech *in vitro* se také využívá imobilizovaný intestinální mukus, mucinové agarové tubusy ve fermentorech, nebo celé fermentační systémy s mucinovými nosiči. Při sledování adhezních schopností se rovněž využívá značení bakterií radioaktivními izotopy nebo fluoreskujícími látkami.

In vitro modely pro studium adherence

Adherence bakterií k mucinu

Jedná se o nejjednodušší model vyhodnocení adherence k intestinálnímu mukusu, který je založen na imobilizaci komerčně dostupného mucinu na povrchu mikrotitračních destiček⁷. Výsledky adherence však vykazují větší variabilitu, než jaká je pozorována při použití buněčných kultur⁸. Pro vyhodnocení adherence je možné také využít humánního mucinu získaného ze vzorků stolice. Při použití syntetického a fekálního mucinu pro zjišťování adherence u komerčně dostupných probiotických bakterií *L. rhamnosus GG* a *B. lactis Bb12* nebyly zjištěny průkazné rozdíly v naměřených hodnotách. Pro stanovení rozdílu v adhezenci bakterií k mukózní vrstvě vytvořené v různých částech střeva se jako model používá intestinální mucin odebraný z různých částí střeva prasat⁹.

Adherence bakterií k buněčným kulturám

Pro tento typ studií *in vitro* jsou využívány buněčné kultury humánních intestinálních epiteliálních buněčných linií především Caco-2 buněk a HT29-MTX buněk, které lépe simulují prostředí *in vivo*. Caco-2 buňky vytvářejí kultury tvořené homogenní a polarizovanou jednoduchou vrstvou, která se svým charakterem blíží dospělým humánním enterocytům v tenkém střevě, čehož se využívá při studiu buněčných interakcí. Předchozí studie (např. 10) prokázaly, že fluorescenční značení bakterií ve spojení s jednovrstvou kulturou Caco-2 buněk je vhodný model pro studie adherence a může být využíván jako alternativa k radioaktivně značeným bakteriím. Nicméně, tyto kultury Caco-2 buněk nevytvářejí dostatečnou vrstvu mukusu, a proto i hodnoty adherence některých bakteriálních kmenů (např. *L. rhamnosus GG*, *B. lactis Bb12* nebo *B. animalis* IATA-A2) k Caco-2 buňkám jsou výrazně nižší než k mucinu. A naopak adherence některých kmenů patogenních bakterií *E. coli* k Caco-2 kulturám je vyšší než k mucinu⁸.

Buněčná linie HT29-MTX vznikla z izolace HT29 buněk adaptovaných na methotrexát (MTX), které se diferencují na pohárkové buňky, sekretující mucin. Při použití samot-

ných buněk HT29-MTX, jsou pozorovány výrazně nižší hodnoty adherence u všech testovaných probiotických kmenů, ve srovnání s hodnotami získanými u Caco-2 buněk⁸.

V intestinálním epitelu představují enterocyty a pohárkové buňky 2 základní fenotypy buněk. Pro zpřesnění *in vitro* studií bakteriální adherence byly proto vyvinuty modely využívající ko-kultury Caco-2 buněk reprezentujících enterocyty a HT29-MTX reprezentujících pohárkové buňky sekretující mucin¹¹ v poměru 90:10, který nejvíce odpovídá přirozeným podmínkám v intestinu.

Od Caco-2 buněčné linie byly odvozeny buněčné linie C2BBE (linie označené 1 a 2), které vytvářejí jednoduchou polarizovanou vrstvu buněk s apikální kartáčovou vrstvou srovnatelnou s buňkami v humánním intestinu¹². Ačkoli tyto buněčné linie byly používány jako *in vitro* model pro studium průniku bakterie *Salmonella typhi* přes intestinální epitel, linie C2BBE1 představuje potenciální alternativní model pro studium vztahů mezi probiotickými bakteriemi a intestinálními epiteliálními buňkami, jak již bylo ověřeno např. ve studii¹³.

Prasečí intestinální epiteliální buněčné linie IPEC-J2 jsou v poslední době používány jako relevantní *in vitro* modely pro studium intestinálních mezibuněčných interakcí¹⁴, protože i IPEC-J2 buňky mohou diferencovat do buněk vykazujících vlastnosti enterocytů.

Vyjádření adherence

Adherence probiotických bakterií je nejčastěji vyjadřována jako procento bakterií adhezních k počátečnímu množství bakterií přidaných k zvolenému médiu (např. k Caco-2 buňkám). V případě použití radioaktivně značených bakterií je adherence vyjádřena jako procento radioaktivity naměřené po adhezenci ve srovnání s radioaktivitou mikrobiální suspenze přidané k zvolenému médiu. Podobně i v případě využití fluorescenčního značení bakterií. Pro kvalitativní vyhodnocení procesu adherence jsou využívány elektronové mikroskopy.

Závěr

Rozdíly v adhezní schopnosti bakterií k mucinu, kulturám HT29-MTX a Caco-2:HT29-MTX (90:10) mohou být způsobeny rozdílným typem mucinu v uvedených modelech. V mnoha studiích bylo prokázáno, že adherence u různých metod *in vitro* se liší dokonce i u stejného kmene, což naznačuje, že bakteriální struktury zahrnuté do procesu vazby na epiteliální buňky a mukózní vrstvu mohou být rozdílné. Kromě toho bylo prokázáno, že adherence může být pozitivně ovlivněna takovými faktory, jako je použité medium, teplota a pH. Rovněž bivalentní ionty, jako třeba Ca²⁺ mohou bakteriální adhezenci ovlivnit¹⁵. Ačkoli použití buněčných kultur místo extrahovaného mucinu lépe odpovídá situaci v živém organismu, je nutné rovněž vzít v úvahu typ buněk i strukturu buněčných kultur, protože to určuje povahu adhezních míst v systému. Proto využitím různých *in vitro* metod pro studium adhe-

rence získáme komplexnější informace o rozdílech v adhezní schopnosti jednotlivých bakteriálních kmenů a můžeme tak odlišit jednotlivé typy interakcí a molekul, které zprostředkují interakce mezi hostitelem a mikroorganismem.

Literatura

- FORSTNER, J.F., FORSTNER, G.G. 1994. Gastrointestinal mucus; in Johnson LR (ed): Physiology of the Gastrointestinal Tract. New York, Raven Press, s. 1255-1283.
- ATUMA, C., STRUGULA, V., ALLEN, A., HOLM, L. 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 280: s. G922-G929.
- OUWEHAND, A.C., KIRJAVAINEN, P.V., SHORTT, C. AND SALMINEN, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.*, 9, s. 43-52.
- DUNNE, C., O'MAHONY, L., MURPHY, L., THORNTON, G., MORRISSEY, D., O'HALLORAN, S., FEENEY, M., FLYNN, S. ET AL. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, s. S386-S392.
- PAN, W.H., LI, P.L., LIU, Z.Y. 2006. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, 12, s. 148-152.
- COCONNIER, M., KLAENHAMMER, T.R., KERNEIS, S., BERNET, M. AND SERVIN, A.L. 1992. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2F04 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, s. 2034-2039.
- IZQUIERDO, E., MEDINA, M., ENNAHAR, S., MARCHIONI, E. AND SANZ, Y. 2008. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *bifidobacterium longum* strains. *Curr. Microbiol.*, 56, s. 613-618.
- LAPARRA J.M., SANZ Y. 2009. Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49, s. 695-701.
- LI, X.J., YUE, L.Y., GUAN, X.F. AND QIAO, S.Y. 2008. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *J. Appl. Microbiol.*, 104, s. 1082-1091.
- BIANCHI, M.A., DEL RIO, D., PELLEGRINI, N., SANSEBASTIANO, G., NEVIANI, E. AND BRIGHENTI, F. 2004. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Lett. Appl. Microbiol.*, 39, s. 301-305.
- PONTIER, C., PACHOT, J., BOTHAM, R., LENFANT, B. AND ARNAUD, P. 2001. HT29-MTX and Caco-2 / TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: Role of the mucus layer. *J. Pharm. Sci.*, 90, s. 1608-1619.
- PETERSON, M.D. AND MOOSEKER, M.S. 1992. Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BB6 clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *J. Cell Sci.*, 102, s. 581-600.
- CROCIANI, J., GRILL, J.P., HUPPERT, M. AND BALLONGUE, J. 1995. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21, s. 146-148.
- LARSEN N, NISSEN P, WILLATS W.G.T. 2007. The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* ssp. and *E. coli* O138. *Int. J. Food Microbiol.*, 114, s. 113-119.
- ZARATE, G., MORATA DE, A.V., PEREZ, C.A., GONZALEZ, S. 2002. Some factors affecting the adherence of probiotic *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 to intestinal epithelial cells. *Can. J. Microbiol.* 48, s. 449-457

Další použitá literatura je k dispozici u autorů.

Poděkování

Tato práce byla podporována prostředky projektu MZe ČR - QI 91B274 (NAZV-VAK 2008, program Potravinářství).

Přijato do tisku 4. 1. 2011

Lektorováno 24. 1. 2011

KYSELINA MLÉČNÁ JAKO POLOPRODUKT K VÝROBĚ POLYLAKTÁTŮ A BIODEGRADOVATELNÝCH PLASTŮ

Binder M.¹, Drbohlav J.¹, Šalaková A.¹, Nehyba A.², Sedlařík V.³

¹ VÚM s.r.o. Praha

² Milcom a.s. Praha

³ Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Lactid acid as semi product for the production of polylactates and bio-degradable plastics

Abstrakt

Sladká syrovátka je v současné době pro většinu sýráren, kde vzniká při výrobě sýrů, odpadním produktem. Poslední trendy ve výzkumu biodegradovatelných plastů na bázi polylaktátů, které by měly sloužit k balení např. potravinářských a dalších výrobků, využívají jako základní surovinu kyselinu mléčnou. Cílem této práce bylo optimalizovat přípravu kyseliny mléčné ze syrovátky, která je významným zdrojem laktózy. Byla sestavena aparatura pro fermentaci sladké syrovátky a na základě výsledků předcházejícího výzkumu vybrán vhodný kmen *Lbc. helveticus* CCDM 98 a zvolena optimální fermentační teplota 42 °C. Jako alternativní surovina byl místo syrovátky použit permeát - odpadní produkt získaný průmyslovou ultrafiltrací odtučněného mléka při výrobě proteinového koncentrátu. Byly použity tři druhy syrovátky a dva druhy permeátu. Některé fermentace proběhly za přidavku suplementu kvasničného extraktu. Průběhy pH v čase u jednotlivých fermentací byly znázorněny graficky a další výsledky sestaveny do tabulky. K posunu reakční rovnováhy byla vznikající kyselina mléčná neutralizována uhličitánem vápenatým. Vzniklý mléčan vápenatý byl konvertován kyselinou sírovou na kyselinu mléčnou a vedlejší produkt síran vápenatý byl dekantací a vakuovou filtrací odstraněn. Následně byla separovaná kyselina mléčná zahuštěna na vakuové odparce a podrobena analýze na obsah především L-kyseliny mléčné a D-kyseliny mléčné a zbytkové laktózy. Z dosavadních výsledků se jako nejlepší jeví fermentace syrovátky s přidavkem 0,5 % kvasničného autolyzátu a uhličitánu vápenatého přidaného jednorázově na začátku fermentace nebo postupně v průběhu fermentace, za použití 11 % inokula *Lbc. helveticus* CCDM 98, kdy došlo k více jak 90 % konverzi laktózy na kyselinu mléčnou.

Klíčová slova: syrovátka, permeát, polylaktát, biodegradovatelné plasty

Abstract

Sweet whey, which is a by-product in cheese processing, is considered for the most cheese dairies as a waste product.