

***IN VITRO* ISPITIVANJE BIFIDOGENOG EFEKTA INFANT FORMULA**

Olga Martinov¹, Snežana Spasić¹, Valerija Matić¹, Miroslav Vrvic²

¹Centar za hemiju-IHTM, Beograd, Srbija

²Hemijski fakultet, Beograd, Srbija

In vitro testom bifidogenog efekta infant formula obuhvaćeno je 6 proizvoda sa tržišta (jedna domaća formulacija i 5 uvoznih proizvoda). Kao referentni supstrat upotrebljeno je zrelo majčino mleko.

Ispitivanje bifidogenog efekta u *in vitro* uslovima, obuhvatilo je određivanje mikrobioloških i biohemijskih pokazatelja, na početku testa i posle 48 h bifidogeneze. Pankreatinska digestija uzoraka prethodila je inokulaciji sa bifidobakterijama.

Kao diskriminatorski kriterijum za ocenu bifidogenog efekta uveli smo BIFIDOGENI INDEKS.

U više ponavljanja pokazano je da se, uz slične deklarirane nutritivne i biološke karakteristike, proizvodi značajno razlikuju po bifidogenom efektu, pri čemu je ova osobina najizraženija kod domaće formulacije u poređenju sa ostalim ispitivanim infant formulama.

Ključne reči: *bifidogeni efekat, bifidogeni indeks, bifidobakterije, infant formule.*

Uvod

Bifidobakterije (rod *Bifidobacterium-Bf.*, vrste *Bf. Bifidum* biovar b i *Bf. Infantis*) se smatraju jednim od najznačajnijih činilaca za zdrav i uspešan početak života novorođenčeta. Kolonizacija digestivnog trakta bebe sa majke, desi se činom rađanja. Njihova brojnost, aktivnost i niz povoljnih efekata na organizam novorođenčeta, prevashodno zavisi od hrane-supstrata, koja se daje domaćinu. Stimulacija rasta, razmnožavanja i biohemijske aktivnosti bifidobakterija, koje su probiotici [1], zavisi od ishrane bebe. Uticaj supstrata, kao prebiotika, na bifidogenu mikrofloru digestivnog trakta novorođenčeta poznat je kao bifidogeni efekat.

Majčino mleko je najbolja hrana za novorođenče [2]. Kada majka ne može da doji, neophodno je obezbediti odgovarajuću hranu za bebu. Neophodno je da hrana, po biološkim i nutritivnim osobinama, bude što približnija majčinom mleku, što se postiže infant formulama - hranom za novorođenčad od rođenja do navršanih 12 meseci. Složeni sastav, a posebno biološka svojstva majčinog mleka nije moguće u potpunosti postići u hrani za odojčad, što se posebno odnosi na biološki aktivne komponente (imunoprotektivne i druge neimunogene zaštitne supstance, faktori rasta, hormoni i enzimi) [2].

Pored uobičajenih svojstava nutritivne i biološke vrednosti, bifidogeni efekat je jedan od najvažnijih bioloških pokazatelja sličnosti infant formula sa majčnim mlekom.

Cilj ovog rada bio je da se praćenjem biohemijskih i mikrobioloških pokazatelja bifidogenog efekta neposredno utvrdi da li postoji i kolika je razlika u pogledu kvaliteta između pojedinih infant formula, što bi trebalo da bude jedan od najvažnijih faktora u njihovom odabiru za ishranu novorođenčeta.

Eksperimentalni deo

Sve upotrebljene supstance bile su kvaliteta *pro analysi*, za biohemiju i mikrobiologiju, nabavljene od "Merck", "Sigma" i "Torlak" (Beograd, Srbija).

Materijal za izolovanje akumulirane mešane kulture *Bifidobacterium spp.* bio je feces zdrave, vaginalno i u terminu rođene bebe, koja je isključivo sisala i nije primala antibiotike. Feces je uzorkovan 3 dana po rođenju, neposredno po ekskreciji.

Bifidobakterije su izolovane na čvrstoj selektivnoj podlozi sa laktulozom (BML) [3]. Identifikacija roda (*Bifidobacterium*) i vrsta (*Bf. bifidum* biovar b i *Bf. infantis*, odnos približno 2:1) urađena je u svemu prema uobičajenim postupcima [4].

Inokulum za zasejavanje supstrata pripreman je tako što je 10 cm³ BML bujona zasejano bakteriološkom ezom iz treće subkulture (svaka inkubirana 48 h na 37 °C u anaerostatu (proizvodnje "Heraeus", TIP, PROIZVOĐAČ) u atmosferi ugljen dioksida. Ukupno potrebna zapremina, pripremana je mešanjem više pojedinačnih inokuluma, kako bi se dobila biomasa iste gustine za sva potrebna zasejavanja.

Supstrati

Kao supstrati, upotrebljeno je šest infant formula u prahu, pripremljenih kao obroci po uputstvu proizvođača (oznake IF-1 do IF-6) i zrelo majčino mleko kao referentni supstrat (oznaka ZMM).

Pankreatinska digestija-simulacija varenja

Digestija je rađena u erlenmajerima sa širokim grlom ukupne zapremine 300 cm³, nabavljenim u potrebnom broju, jednom nabavkom od istog proizvođača, da bi se obezbedili isti uslovi u pogledu geometrije sudova. U svaki erlenmajer sa 100 cm³ supstrata dodavan je pankreatin u obliku praha "A. Constantino & C.", Favria, Italy ili farmaceutske formulacije, u količini koja je na osnovu deklariranih aktivnosti enzima odgovarala približno ukupno: po 50000 amilaznih i proteaznih i 4000 lipaznih USNF jedinica. Proces je realizovan u imerzionom vodenom termostatu na temperaturi od 37 °C za vreme od 2 h, uz povremeno mućkanje. Erlenmajeri se zatim zatvaraju mikrobiološkim čepovima i sterilišu (121 °C, 20 min), čime je prekidana digestija termičkom inaktivacijom enzima. Za jednu seriju eksperimenata pripremano je po dva erlenmajera sa istim supstratima, od kojih je jedan posle inokulacije upotrebljavan za određivanje parametara na početku testa.

In vitro bifidogeneza

Nakon digestije, supstrat je inokulisan sa po 1,0 cm³ inokuluma iz iste akumulirane mešane kulture bifidobakterija. Bifidogeneza je trajala 48 h na 37 °C u anaerostatu sa ugljen dioksidom. Eksperimenti sa svakim supstratom urađeni su u tri ponavljanja.

Mikrobiološke i analitičke metode

Opis nativnog mikroskopskog preparata. Po završenoj bifidogenezi, iz supstrata je pripremljen nativni preparat (5) i posmatran svetlosnim mikroskopom sa svetlim poljem ("Laboval", Zeiss, GDR).

Određivanje ukupnog broja bifidobakterija (UBB) [6]. Ukupan broj bifidobakterija određen je indirektnom metodom razređenja po Kochu (LIT) na BML podlozi. Postupak se sastoji u pravljenju razređenja u fiziološkom rastvoru u tri ponavljanja, inkubiranju (48 h na 37 °C) i brojanju izraslih kolonija. Broj bifidobakterija je izražavan kao cfu (Colony Forming Units) u 1 cm³.

Određivanje suve biomase (SBM) [7]. Određivana je sušenjem (2h na 105 °C) taloga koji je dobijen centrifugiranjem (4500 rpm) 10 cm³ uzorka i trostrukim ispiranjem (centrifugiranje 4500 rpm) vodom.

Određivanje pH. Meren je pomoću pH-metra tip PHM 26, kombinovanom staklenom elektrodom tip GK 2401C ("Radiometer").

Određivanje ukupnih organskih kiselina (UOK). Određivane su automatskom potenciometrijskom titracijom (titrator tip TT 2, "Tacussel", Francuska, kombinovana staklena elektroda tip GK 2401C, "Radiometer") standardnim rastvorom NaOH, koncentracije 0,1 M iz 50 cm³ uzorka. Rezultati su obračunavani kao mlečna kiselina i izražavani u g/100 cm³.

Određivanje molskog odnosa sirćetne [8-12] i mlečne kiseline [13] (MOSM). Određivan je enzimskim testovima prema uputstvima proizvođača ("RANDOX", Crumlin, UK), modifikovanim za ove supstrate (filtracija kroz membrane veličine pora 0,2 µm i bez alkalne hidrolize).

Rezultati i diskusija

Prikazani rezultati odnose se na *in vitro* proučavanje razvoja dve dominantne bakterijske vrste tankog creva odojčadi (*Bf. bifidum* serovar b i *Bf. infantis*). Efekti *in vitro* bifidogeneze praćeni su u svih sedam supstrata (IF-1 do IF-6 i zrelo majčino mleko kao referentni supstrat), određivanjem mikrobioloških (mikroskopska slika, ukupni broj bifidobakterija i suva biomasa) i biohemijskih (pH, ukupne bakterijski generisane organske kiseline i molski odnos sirćetne i mlečne kiseline) pokazatelja. Svi rezultati su srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta na početku testa i posle 48h bifidogeneze.

Srednje vrednosti rezultata određivanja mikrobioloških pokazatelja iz tri nezavisne serije eksperimenata prikazani su u Tabeli 1. Vrednosti na početku testa bile

su iste i to: u nativnom preparatu bakterijske ćelije su izrazito sitne nepravilnog karakteristično izduženog oblika, UBB – $6,14 \times 10^5$ cfu/cm³ i SBM - $<0,0003$ g/100 cm³.

TABELA 1. Mikrobiološki pokazatelji bifidogenog efekta na kraju eksperimenta

Supstrat	Opis nativnog mikroskopskog preparata	UBB¹, x10⁷cfu/cm³	SBM², g/100cm³
IF-1	Sitne ćelije različitog oblika	1,04	0,161
IF-2	Sitne ćelije različitog oblika	0,65	0,110
IF-3	Sitne ćelije različitog oblika	0,98	0,146
IF-4	Sitne ćelije različitog oblika	1,48	0,163
IF-5	Sitne ćelije različitog oblika	2,06	0,114
IF-6	Sitne ćelije različitog oblika	1,38	0,227
ZMM	Krupne ćelije različitog oblika	0,85	0,318

1- ukupan broj bifidobakterija

2- suva biomasa

Ukupni broj bifidobakterija za sve supstrate je na kraju ispitivanja istog reda veličine (10^7 cfu/cm³). Ne postoji direktna korelacija između ukupnog broja i suve biomase bifidobakterija, što je posledica grešaka u indirektnoj metodi za određivanje broja ćelija. Za produkciju biomase najpogodniji supstrat je zrelo majčino mleko, što je i očekivano. Međutim, značajne su razlike u suvoj biomasi između pojedinih infant formula. U odnosu na suhu biomasu iz zrelog majčinog mleka, suva biomasa dobijena u pojedinim infant formulama nalazi se u granicama od 71,4 % (IF-6) do 34,6 % (IF-2).

Promene biohemijskih pokazatelja prikazane su u Tabeli 2. UOK na početku eksperimenta bile su $<0,005$ g/100cm³ u svim supstratima.

TABELA 2. Promene biohemijskih pokazatelja bifidogeneze

Supstrat	pH ^a	pH ^b ₀	pH ^c ₄₈	UOK ^d	MOSM ^e
IF-1	6,7 ₃	5,6 ₃	3,5 ₉	0,163	3,06 : 1,75
IF-2	6,7 ₀	5,6 ₅	3,5 ₄	0,187	3,10 : 1,83
IF-3	6,8 ₉	5,6 ₄	3,6 ₂	0,170	2,98 : 1,88
IF-4	6,8 ₂	5,6 ₇	3,5 ₃	0,163	3,22 : 1,90
IF-5	6,6 ₅	5,5 ₁	3,4 ₇	0,171	3,10 : 1,94
IF-6	6,7 ₈	5,5 ₇	3,6 ₁	0,176	3,46 : 1,90
ZMM	6,5 ₅	5,7 ₈	3,4 ₉	0,154	3,11 : 1,80

a-početno pH uzoraka

b-posle pankreatinske digestije-simuliranog varenja

c-posle završene bifidogeneze

d-ukupne organske kiseline

e-molski odnos sirćetne i mlečne kiseline

Na kraju procesa *in vitro* bifidogeneze, pH u svim supstratima je 3,5-3,6 (između 3,47 za IF-5 i 3,62 za IF-3, a srednja vrednost je 3,55) što odgovara acetatno-laktatnom puferu sa visokim puferskim kapacitetom, jer je pH približno pK_a mlečne kiseline (pK_a=3,86). Koncentracija bakterijski generisanih organskih kiselina u svim infant formulama je veća u odnosu na referentni supstrat, a razlike u odnosu na zrelo majčino mleko su od 5,8 % (IF-4 i IF-1) do najviše 21,4 % (IF-2).

Molski odnos sirćetne i mlečne kiseline u svim ispitivanim supstratima je približan 3:2, što je fiziološko-biohemijska karakteristika roda *Bifidobacterium*. Ovaj rezultat je još jedna potvrda da se izolovana akumulirana mešana kultura sastoji samo od vrsta bifidobakterija, tj. da su promene supstrata samo posledica njihovog dejstva, odnosno bifidogeneze.

Poređenjem razlika vrednosti za pojedine mikrobiološke i biohemijske pokazatelje bifidogenog efekta, uočava se da su izrazitije razlike u mikrobiološkim pokazateljima, zato smo kao diskriminatorski kriterijum za ocenu bifidogenog efekta

uveli **BIFIDOGENI INDEKS (BI)**, izražen u procentima, koji predstavlja odnos suve biomase bifidobakterija, dobijene u istoj seriji eksperimenata na kraju testa, sa infant formulom i majčinim mlekom pomnožen sa 100. Vrednosti bifidogenog indeksa za analizirane supstrate prikazani su u tabeli 3.

TABELA 3. Bifidogeni indeks (**BI**)

Supstrat	BI, [%]
IF-1	52
IF-2	35
IF-3	47
IF-4	52
IF-5	37
IF-6	73
ZMM	100

Na osnovu vrednosti za bifidogeni indeks, jasno se uočavaju razlike u bifidogenom efektu između pojedinih infant formula. Analizom dobijenih rezultata, može se reći da je uzorak IF-6 najbolji, dok proizvodi IF-1, IF-3 i IF-4 imaju međusobno isti ili sličan bifidogeni efekat i pripadali bi srednjoj kategoriji, a IF-5 i IF-2 pripadale bi najnižoj klasi. Pošto svi ispitani proizvodi imaju sličnu deklarisanu nutritivnu i biološku vrednost, očigledno je da se u pogledu sadržaja prebiotičkih komponenti razlikuju ili neke od njih sadrže supstance koje deluju inhibitory na aktivnost bifidobakterija - bifidogeneze.

Zaključci

Na osnovu svih dobijenih i diskutovanih rezultata ispitivanja *in vitro* bifidogeneze u svih sedam različitih supstrata (IF-1 do IF-6 i zrelo majčino mleko kao referentni supstrat), moguće je zaključiti:

1. Infant formule imaju izrazite bifidogene osobine na šta ukazuju praćeni mikrobiološki i biohemijski pokazatelji.

2. Dokazane bifidogene osobine ukazuju da infant formule, verovatno, sadrže prebiotičke supstance, koje su po svojoj strukturi prebiotici. Isto tako, infant formule da sadrže supstance koje nisu prebiotici u pravom smislu, ali imaju ove osobine jer stimulišu razvoj bifidogene mikroflore intestinalnog trakta.

3. Infant formule za ishranu odojčadi i u pogledu bifidogenih osobina u potpunosti odgovaraju deklarisanom kvalitetu, odnosno preporučenoj primeni uz navedene i diskutovane razlike u odnosu na proizvođača.

4. Bifidogene osobine domaće infant formule, kao kompleksnog supstrata, zajedno sa deklariranim nutritivnim i biološkim vrednostima, svrstavaju je u proizvode najvišeg kvaliteta u kategoriji hrane za odojčad, koja može da “zameni“ majčino mleko.

Potrebno je nastaviti proučavanja bifidogenog efekta infant formula, kako bi se u što većoj meri objasnio njegov značaj za zdrav i uspešan početak života bebe, tj. kako bi se dizajnirale nove infant formule što približnijeg sastava i osobina majčinom mleku.

Literatura

1. M. D. Collins and G. R. Gibson, Am. J. Clin. Nutr. 69 (1996) 1052S
2. M. S. Alles, P. A.M.J. Scholtens, J. G. Bindels, Curr. Pediatrics 14 (2004) 51
3. Y. Nebra, A. R. Blanch, Appl. Env. Microbiol. 65 (1999) 5173
4. “The Prokaryotes” 2 (1986) 1951
5. G. Gojgić-Cvijović, M. M. Vrvić, Praktikum za mikrobiološku hemiju, (2003) 43
6. F. G. Red, Metody obshchei bacteriologii (Prevod s angliiskogo) 1 (1983) 442
7. C. H. Collins, P. M. Lyne, Microbiological methods, 4th ed., (1976) 194
8. H. U. Bergmeyer and H. Möllering, Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed., 3 (1974) 1520
9. H. O. Beutler, Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed., 6 (1984) 639
10. E. P. Frenkel. and R. L. Kitchens, Methods of Enzymology, 71 (1981) 317
11. Ch. Junge and Ch. Spadinger, Die flüchtigen Säuren des Weines, 75 (1979) 12
12. W. J. Klopper, S.A.G.F. Angelino, B. Tuning and H. A. Vermiere, J. Inst. Brew. 92 (1986) 225
13. F. Noll, Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed., 6 (1984) 582

Summary

BIFIDOGENIC EFFECT OF THE INFANT FORMULAS: *IN VITRO* INVESTIGATIONS

Scientific paper

Olga Martinov¹, Snežana Spasić¹, Valerija Matić¹, Miroslav Vrvic²

¹Department of Chemistry IChTM, Belgrade, Serbia

² University of Belgrade, Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia

Bifidogenic effect is growth stimulation of bifidogenic bacteria – probiotics in the intestinal tract by the effect of food ingredients which are prebiotics for these bacteria. Beside nutritive and biological values, bifidogenic effect is one of the most important indicators for the baby's food quality.

In this paper *in vitro* bifidogenic effect was checked by testing of six infant formulas in powder from the market (one domestic and five imported products). Mature breast milk was reference substrate.

The effects of *in vitro* bifidogenesis of the infant formulas were observed in the beginning, and after 48 h of the test, and two kinds of parameters were monitored: microbiological (microscopic observation, total bifidobacterial counts and dry biomass) and biochemical (pH, total bacterially generated organic acids – computed as lactic acid and mole ration of acetic and lactic acid). Pancreatin digestion preceded bifidobacteria biomass inoculation.

As a discriminatory criterion for investigation of bifidogenic effects, we introduced BIFIDOGENIC INDEX.

In several repeated experiments, we proved that although infant formulas have similar declared nutritive and biological characteristics, there are also important differences in bifidogenic properties between individual products, which are the indicator of their quality in a whole. Domestic products have had best bifidogenic effect.

Keywords: *bifidogenic effect, bifidogenic index, bifidobacteria, infant formulae*