

# ПРОБИОТИЦИ ЗА ФУНКЦИОНАЛНИ ХРАНИ И ЗДРАВЕ

## Абстракт

*Пробиотиците са понятие от началото на 20 век, с което все по-често се среща съвременният консуматор. Нещо повече днес те са приети и научно доказан полезен компонент от хранителната верига, с важна роля за добрия физиологичен статус, здравословен баланс и превенция на заболяванията при хора и животни. Пробиотици, от старогръцки „Pro” (за) и „Bio” (живот), са „Живи организми, които приети в съответните количества оказват здравословен ефект върху организма” (СЗО, 2002 г.). Пробиотиците не са панацея, но са биологичен подход, който по естествен начин превръща „храната в лекарство, а лекарството в храна” и ни помага да бъдем здрави. Ролята на учени и експерти е да осъществят правилния подбор и контрол на прилагането им за да няма риск и да се гарантира здравето.*

*Настоящото становище разглежда основни въпроси, свързани с пробиотиците (дефиниция, приложение и критерии за подбор), както и здравни претенции и пробиотици (проблеми на настоящето и перспективи) в светлината на съществуващите регулаторни рамки на Европейската общност (история, политика и ключови разпоредби).*

*Новите предизвикателства в научните изследвания на пробиотиците са създаването на модерни форми на храни, добавки и терапевтици, покриващи изискванията за сигурност - безопасност, удобство и полезност съгласно Европейските регулаторни рамки, както и да се предоставят знания за генетичните основи и молекулни механизми на полезно действие, които да осигуряват оптимално здраве за всеки индивид. Това ще позволи създаването на т.нар. целеви пробиотични препарати, които най-точно ще отговарят на нуждите на целевите групи от консуматорите, без риск при тяхното прилагане.*

## Увод

Съвременният консуматор, загрижен за своето здраве търси не само хранителни, но и здравословни продукти, които биха контролирали по естествен начин здравето и добрата форма (Salminen S. 1996). Това създава ново предизвикателство пред учени, технолози и медици. Своеобразен отговор на новите изисквания на консуматорите през 21 век е разработването на пробиотици и функционални храни.. Концепцията за функционалните храни е създадена най-напред в Япония през 1980 г. (The American Dietetic Association). Функционалните или “биотерапевтични” храни включват в състава си специфични добавки и субстанции, които въздействат положително върху здравето на човека, обуславят добрата форма и наред с хранителните си качества допринасят за превенцията на някои заболявания (Salminen, S. et al. 1996a). Определени натурални продукти могат да бъдат квалифицирани като функционални ако съдържат хранителен компонент, който повлиява положително някоя от физиологичните функции при човека и/или има предпазен, лечебен ефект. Функционални храни са различни продукти, съдържащи пробиотици, пребиотици, витамини и в известна степен някои специфични добавки. Най-значимата и добре позната група сред тях са пробиотичните храни, съдържащи живи бактерии оказващи положителен ефект за човека (Food Marketing 1999). При тях е доказан по-добър здравословен ефект в сравнение с традиционните храни и най-често това е непосредствено свързано с наличните живи микроорганизми с уникални биологични свойства (Salminen, S., et al. 1998). Следователно пробиотиците и продуктите с тяхно участие постепенно се превръщат във важен елемент от хранителната верига и като такива е нужно да бъдат следени и оценявани много сериозно.

Настоящето становище ще разгледа основни проблеми свързани с пробиотиците (дефиниция, приложение и критерии за подбор), както здравни претенции и пробиотици (проблеми на настоящето и перспективи) в светлината на съществуващите регулаторни рамка на Европейската общност (история, политика и ключови разпоредби).

### **1. Пробиотици - история и дефиниция**

Стотици микробни видове живеят в съжителство с хората и животните – по кожата, в устната кухина, стомаха, червата, в пикочно-половите пътища и т.н. Например в гастроинтестиналния тракт на човека (ГИТ) са установени понастоящем повече от 500

бактериални вида, като само в дебелото черво техният брой достига над 1000/g. Чревната микрофлора представлява 95% от общия клетъчен брой в човешкото тяло и е отговорна за коректния имунен отговор и защита срещу микробни патогени. Изчислява се, че бактериалните популации достигат до 100 000 000 000 000 в човешкото тяло – число, превишаващо 10 пъти броя на всички човешки клетки. Някои от тях са патогенни микроби или микроорганизми причиняващи болести – стафилококи, клебсиела, протеус и др. Друга част от микробните видове са условно патогенните (коменсални) микроорганизми. Те при нормални защитни сили не увреждат организма, но при нарушаване на имунната система се превръщат в болестотворни микроби. Третият вид бактерии са „добрите“ или оздравяващите за човека и животните бактерии. Най-важното място за здравето на човека сред тях заемат млечнокиселите бактерии и вероятно и бифидобактериите. Различните видове бактерии – патогенни (болестотворни), условно патогенни и оздравяващи (полезни) образуват вътрешната микробна флора на човека и животните. От превеса в полза на полезните бактерии, в тази вътрешна микробна биоценоза, зависи здравето на човека. Тези приятелски настроени микроорганизми, обикновено наричани пробиотици помагат да се намали количеството на „лошите“ бактерии, което е от неограничена полза за организма-гостоприемник. Затова се счита че използването на пробиотични култури стимулира растежа на предпочитани микроорганизми, измества потенциално вредните бактерии и подсилва естествените защитни механизми на организма. По този начин се поддържа необходимия баланс между чревната микрофлора, с което се гарантира нормалната функция на червата. Регулатори на микрофлората на чревния тракт могат да бъдат както монокултури, така и смесени култури от микроорганизми. С напредъка в микробиологията и интестиналната бактериология се разбира, че определени представители, по-специално от родовете *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* играят важна роля за здравето на човека (Holzapfel, 2001) и са сред признатите пробиотици.

### **1.1. Определение за пробиотик**

Терминът пробиотик е сравнително нов, датира се към средата на миналото столетие. Произлиза от старогръцки „**PRO**“ = за и „**BIOS**“ = живот (т.е. „про-био“ – „за живота“). През 1954 г. Фердинанд Въргин за първи път използва термина „пробиотик“ в статията си „Anti and Probiotika“ сравнявайки вредното влияние на антибиотиците и други

микробни субстанции върху микрофлората с ползотворните ефекти (Пробиотика). Няколко години по-късно терминът е използван от D.M. Lilly и R. H. Stillwell през 1965 г като антоним на антибиотик, т.е. за обозначаване на „микробни метаболити, притежаващи способност да стимулират растежа на други микроорганизмите” (Lilly & Stillwell, 1965). През 1974 г., Parker et al. (1974) използват „пробиотик” за обозначаване на “*организми и субстанции*”, които повлияват интестиналната микрофлора и имат благоприятен ефект върху животните. Като понятието “субстанция” не е било дефинирано и предполагало включването дори на антибиотици. Поради тази причина през 1989 г. Fuller дефинира пробиотиците като препарати от живи микроорганизми, оказващи благоприятен ефект при въвеждане в организма за сметка на корекция на чревната микрофлора. Сходно определение дават и Havenaar & Huis int Veld (1992) „Живи моно или смесени култури, които приложени при хора или животни, благоприятно повлиява гостоприемника, подобрявайки ендогенната микрофлора.

През 1996 г. Conway обобщава: „Днес е общоприето мнението за пробиотиците като препарати от живи микроорганизми, които приложени при хора и животни положително повлияват гостоприемника, подобрявайки ендогенната микрофлора.” Същата година Sanders изказва своето виждане: „Пробиотиците, просто дефинирани са микроби консумирани за да окажат здравословен ефект“. Понятието пробиотик трябва да се използва в храни а при клиничните приложения негов аналог е биотерапевтик” (Sanders, 1996). Вследствие Salminen S. (1996) определя пробиотиците като „храни съдържащи живи бактерии, полезни за здравето.

Повечето от предложените определения за пробиотици акцентират на приема на жизнеспособни микроорганизми с цел да модулират чревната микрофлора на гостоприемника с изключение на авторите Lilly и Stillwell, които обръщат повече внимание на растежните фактори (Lilly и Stillwell, 1965).

В последствие се натрупват множество определения и всички те се обединяват около разбирането за пробиотици, като препарати от живи микроорганизми които подобряват ендогенната микрофлора (Conway P. L. 1996). Различни съобщения разкриват терапевтичен ефект при употреба на пробиотиците. Още през 1955 г. Колб отбелязва, че "Антибиотичната терапия често оказва негативен ефект върху естествената протективна микрофлора. И в такива случаи могат да бъдат администрирани симбионтни култури. По

този начин, вредните ефекти на антибиотиците са преодоляват с помощта на пробиотична терапия ". Напр. препаратът "Symbioflor" е цитиран като биологичен антисептик. Този вид «дезинфекция», прилагайки Symbioflor, имал предимството да повлиява патогените, но не и бенигнените микроорганизми, и в допълнение да подобрява клетъчните функции. По този начин, се определя бактериотерапията като пробиотик в контраст с антибиотична терапия "(Rusch, 1956).

С развитието на изследванията за пробиотиците се засилва необходимостта те да бъдат коректно дефинирани и валидирани. След искане на аржентинското правителството, през 2001 г. ФАО и СЗО спонсорират експертна консултативна група. По време на консултацията, която е председателствана от д-р Грегор Рейд, директор на канадския Център за изследвания и развитие за пробиотици, в групата с консенсус е прието определението за пробиотиците като "живи микроорганизми, които, когато се прилагат в достатъчни количества предоставят полза за здравето на гостоприемника".

Така през 2002 г. СЗО официално дефинира определение за пробиотиците: „*Живи организми, които приети в съответните количества оказват здравословен ефект върху организма*” Понастоящем това е най-широко използваната и приета дефиниция, тъй като тя обхваща всички приложения на пробиотиците като живи микроби, а не само ползата за чревния хомеостаз.

Т.е. отчитат се като най-важни двата основни признака:

1. Пробиотичните препарати да съдържат живи микроорганизми.
2. Желаните ефекти са свързани с количеството което се приема

## **1.2. Исторически данни за възникването на концепцията за пробиотиците**

Българското кисело мляко се приема за първия пробиотик, привлякъл вниманието на лауреата на Нобелова награда проф. Иля Мечников. В края на XIX и началото на XX век руският учен И. Мечников (1845 – 1916 г.), при пътешествието си в България открива, че българите консумират ежедневно кисело мляко, съдържащо специфична българска бактерия. Тя е изолирана и характеризирана от българския студент д-р Стамен Григоров през 1905 г. като причинителя на подквасването и е наречена *Lactobacillus bulgaricus Grigoroff*. Според И. Мечников именно този бацил на ферментацията въздейства благотворно върху микробната флора на дебелото черво, като намалява токсичната

микробна дейност. Той стига до заключението, че тайната на дълголетието на българите се крие в консумирането на кисело мляко. Така Иля Мечников става основател на концепцията за пробиотиците. Книгите му – „Етюды о природе человека“ (1903) и „Етюды оптимизма“ (1907) издадени от института „Луи Пастьор“ в Париж поставят на строго научна основа хранителните, диетичните и лечебните свойства на българското кисело мляко. В тях И. Мечников разглежда въпросите за остаряването на човека. Той приема, че белтъчните вещества загиват в дебелите черва на човека като се получават токсични амини. Те се абсорбират от организма и довеждат до промени както на артериалните стени, така и на останалия организъм. И. Мечников смята, че вредното въздействие на гнилостните микроорганизми може да се премахне чрез постоянно заселване на лактобацили в червата и препоръчва българското кисело мляко. Според него българското кисело мляко не само спира гнилостните процеси в червата, но съдържа и други вещества с благоприятни за човека ефекти. Той смята, че „Нашата старост е болест, която трябва да се лекува като всяка друга“. Тази научна хипотеза поддържана от руския учен се потвърждава по много интересен начин от друг носител на Нобеловата награда – американския учен д-р Алексис Каръл от института “Рокфелер” в Ню Йорк. Той доказва, че живата плът може да бъде безсмъртна. През 1912 г. д-р А. Каръл в експеримента си със сърдечен мускул на пилешки ембрион като му осигурил две основни неща за живота – белтъчини и правилно дрениране на тъканите. По този начин той успял да поддържа сърдечния мускул на ембриона жив в продължение на 35 години. В края на експеримента през 1947 г. сърдечният мускул е живял вече много по-продължително отколкото е животът на пилето – равностойност на стотици години човешки живот. По време на експеримента ембрионалната сърдечна тъкан е удвоявала размерите си на всеки 48 часа. Всекидневно са се изрязвали част от нея, за да се запази в размерите осигуряващи храненето и дренирането. Експериментът на д-р Каръл показва, че ако на тялото се осигури правилно хранене, а отровите и отпадъците се отстраняват по подходящ начин животът може да продължи неопределено време.

Във времето на разработките на руския учен Мечников, доказващи ползите от млечно киселите бактерии, независимо от него друг учен - френският педиатър Хенри Тиссие установил, че в изпражненията на децата с диария има по-малък брой от бактерии, които се характеризират с една особена морфология изразена във форма Y. Тези V-

образни - сякаш «разцепени на две» бактерии, напротив, били в изобилие при здрави деца. Той предположил, че тези бактерии може да бъдат прилагани при пациенти с диарийен синдром за да се помогне възстановяването на здравословната чревна флора. Бактериите били наречени бифидобактерии, име генерирано от формата на клетката им и днес са сред доказалите се като ефективни пробиотици.

Всички тези изследвания поставят началото на интензивни проучвания у нас и по света, върху лечебните и профилактични свойства на киселото мляко, лактобацилите и другите полезни бактерии. Установяват се пробиотичните свойства на българското кисело мляко, който е не само традиционен и оригинален български продукт, но и лидер сред пробиотичните храни в света.

В ерата на откриването на антибиотиците, преди и след Втората световна война почти напълно е забравен Мечников и теориите му. С изключение на използването на Yakult в Япония през 1930 г. и текущи изследвания в Съветския съюз, има малко доказателства, че концепцията Metchnikoff е приемана на сериозно от научна и още по-малко от търговска гледна точка. Действително, между 1908 и 1964 г., малко или нищо не се е чувало за микробни терапия в западните страни.

Като признание на делото и ролята на Мечников за доказване значението на пробиотиците Международната млекарска федерация (IDF), учредява специална награда през 2007 г. ‘The IDF Elie Metchnikoff Prize 2007’ , с която да бъдат удостоявани изключителни научни открития в областта на микробиологията, биотехнологиите, храненето и здравето в тясна връзка с ферментационните продукти и млечно-киселите бактерии. Първото награждаването на победителите, в Москва през 2007 г., илюстрират дълбочината и размаха в областта на изследванията на пробиотиците постигнати за изминалите години.

Професор Томатари Митсуока от Япония е първият спечелил награда в категория Микробиология за изключителния му принос за постигане на напредък в изследванията на чревната бактериология и разработването на методи за култивиране на тези култури и чревната флора, което е позволило впоследствие да бъдат открити, класирани и таксономияно определени множество млечно-кисели бактерии и чревни анаероби. Научна работа на проф. Mitsuoka проправи пътя за прилагането на теорията за значението на баланса в чревната флора за поддържане на човешкото здраве и за превенция на болестите, както и за разработване и оценка на функционалните храни.

В категорията биотехнологии проф. Лари Лий МакКей от САЩ бе удостоен, за поредица от открития главно свързани главно с подвижните генетични елементи в млечните лактококи. Тези работи, създават изцяло ново поле за изследване- генетика на млечно киселите стартерни култури, на което днес работят хиляди изследователи, както от академичните така и от индустриалните среди, по целия свят. Важното откритие на проф. Маккей е, че лактококите притежават разнообразие от плазмиди, които кодират ключовите характеристики, които са необходими за тяхната функциониране като млечни стартерни култури.

В категорията „хранене и здраве”, е удостоена работата на проф. д-р Грегор Рейд и проф. Андрю Брус от Канада. Те показват, че пробиотиците могат да се поглъщат *per os*, но влияят на здравословния хомеостаз на влагалището, което е от значение за доброто здраве на жените по целия свят. Учените демонстрирали, че пробиотичните *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 и *Lactobacillus reuteri* RC-14 могат да достигнат до вагината при перорален прием, преминавайки по естествен път през ГИТ достигайки живи до перинеалната област преминават и колонизират влагалището. Техните открития, са потвърдени от учени и в други части на света и поставят началото на разработването на важна група пробиотици за лечение и профилактика при заболявания на уро-гениталния тракт.

Учредената награда на името на Мечников е своеобразно признание за постиженията на учените развиващи идеите за пробиотиците и може да се разглежда като стимул обуславящ големия напредък в една област, която обещава да осигури осезаема полза за много хора по целия свят.

Редица български учени посвещават значителна част от професионалната си дейност в изследване на киселото мляко и лактобацилите – д-р Ив. Богданов, проф. Балабански, д-р Катранджиев, д-р М. Кондратенко, доц. Р. Еникова, д-р Дончев, проф. Чомаков. Задълбочената им научна работа позволи през последните 15-20 години да се разработят оригинални български пробиотични сухи млечнокисели продукти. Тези успехи в научноизследователската и практическо-приложната дейност са принос към делото на родоначалника на науката за пробиотиците д-р Ст. Григоров.

## **2. Обща характеристика и класификация на пробиотиците**

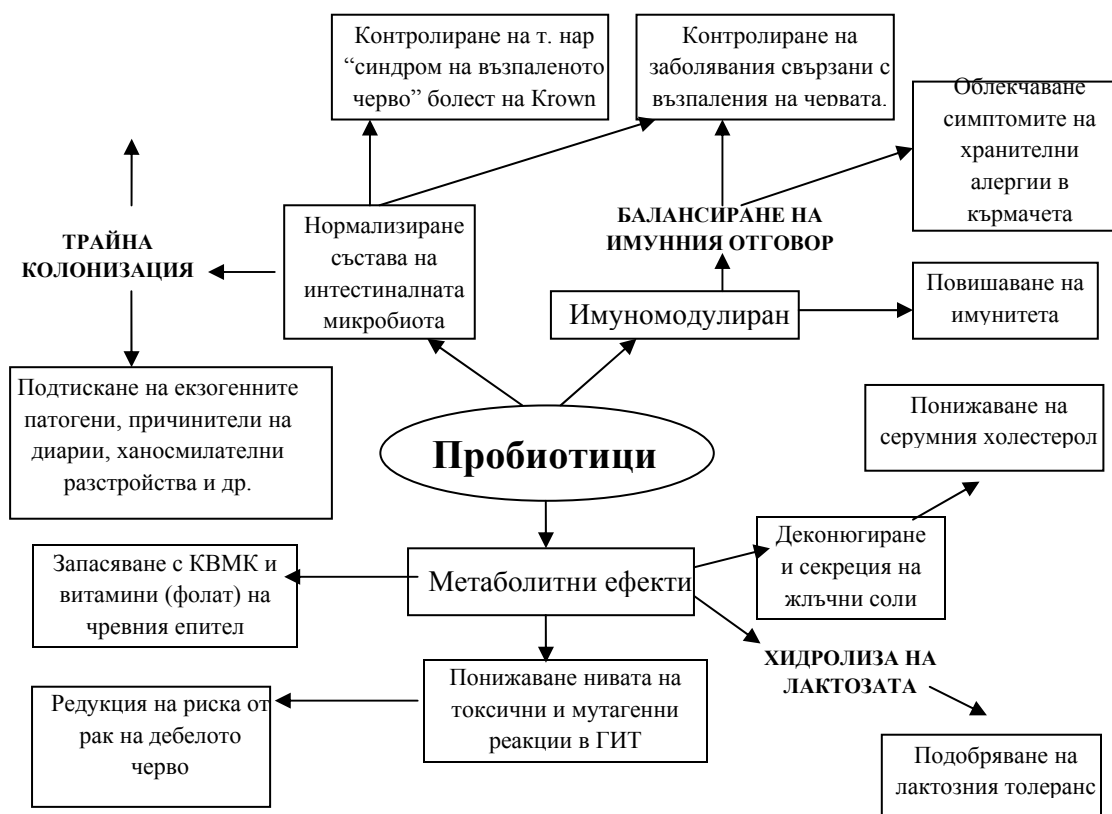


Благоприятното въздействие на храните с добавени живи микроби (пробиотици) върху човешкото здраве и по-специално на млечни продукти, за деца и за други групи с висок риск от населението, все повече се адмира и се препоръчва приема им от професионалисти в сферата на здравеопазването. В последните години се натрупаха много данни, че тези пробиотици могат да играят важна роля за правилното функциониране на ГИТ и храносмилането, уро-гениталния тракт, имунната система, дори и дихателните функции и алергиите, и може да имат значителен ефект за облекчаване на различни инфекциозни заболявания (Гаппоск GW., 2002). В научната литература има множество доказателства за полезните ефекти на тези уникални микроорганизми. Част от тях са са обобщени на фиг. 1. Те са резултат от изследванията на учени и клиницисти в различни страни и броят им непрекъснато расте. Например само през 2005 г. са публикувани над 300 научни статии за положителните въздействия на пробиотичните микроорганизми (Магсо M. et. al. 2006). Но тези данни не могат да се пренасят механично към практиката в същото време възникват въпросите: „Дали те могат да се разглеждат само като полезни или могат да навредят? и Доколко универсални са доказаните ефекти?“

Независимо от множеството научни доказателства концепцията за пробиотиците и техните ползи не се приема еднозначно от изследователите в тази област. Върви активна дискусия относно положителните ефекти, които пробиотиците трябва да предизвикват. Kaufmann *et al.* (1997) дефинират 8 постулата свързани с оценката на пробиотиците, по-важни от които са:

- ❑ Всеки индивид си има собствена бактериална флора в чревния тракт, а повечето от видовете, обитаващи чревния тракт се култивират трудно *in vitro*, така че е трудно да бъдат идентифицирани
- ❑ Микрофлората на ГИТ е много комплексна
- ❑ Взаимоотношенията между екзогенните и ендогенните бактерии не са изучени достатъчно и следователно не може да се повлияват с универсален подход
- ❑ Липсва научно обяснение на много от ефектите на пробиотиците, докладвани до момента

- Ефективността на пробиотиците зависи от много фактори: техния състав, състоянието на микрофлората на организма, възрастовата, половата и видовата принадлежност на последния, условията на живот и др.



**Фиг. 1.** Здравословни ефекти и прицелни места на въздействие на пробиотиците (по Saarella *et al.*, 2002).

Ето защо още от 2001 г. отчитайки липсата на международен консенсус по методологията за оценка на ефикасността и безопасността на тези микроорганизми и съдържащите ги продукти, се правят експертни становища, допитване за да се оцени и предложат общи насоки за такива оценки.

Цялата дискусия от миналото и настоящето, показва необходимостта от разграничаване на различните категории пробиотици. Това се дължи на различията в начина на действие, целите и начина им на приложение както и претенциите (здравни и нормативни) във връзка със законовите разпоредби за храните и лекарствата.

Най-общо пробиотичните щамове могат да бъдат разделени на две групи: (1) **резидентни** и (2) **транзитиращи**. Щамове от първата група са постоянно пребиваващи и често откривани в ГИТ. Препарати, конструирани на основата на подобни микроорганизми, благоприятстват тяхното възстановяване в чревния тракт. Резидентните щамове са по-съвместими и по-малко антагонистични към други постоянно пребиваващи в човешкия организъм полезни микроорганизми. Т.е. това е една своеобразна еволюционно закрепена микробиална асоциация с позитивен ефект върху организма-гостоприемник. Като резидентни при човека са описани следните видове: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Bifidobacterium spp.* Транзитиращите щамове, принадлежащи към видовете *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus yogurti*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum*, само временно пребивават в чревния тракт, но за времето на преминаване също могат да окажат положително въздействие. Затова се препоръчва използването на мулти-щамови препарати съдържащи бактерии и от двете групи. В практиката обаче се прилагат само отделни щамове, отговарящи на определени критерии за селекция. Следователно пробиотиците като "живи микроорганизми" имат профилактично и терапевтично действие, подобрявайки вътрешния микробен баланс.

Международната изследователска група по Нови Антимикробни стратегии (ISGNAS) разработва концепция за подробна дефиниция на пробиотици в три категории (Rusch et al., 1996):

- ❑ **Медицински пробиотици** - микробиален препарат съдържащ живи/или убити микроорганизми вкл. техни компоненти или метаболити композирани за да се използват с терапевтична цел, като лекарство за лечение и профилактика.
- ❑ **Фармацевтичен пробиотик** – микробиален препарат дизайнван като хранителна добавка.
- ❑ **Хранителен пробиотик** - микробиален препарат създаден за приложение в хранителните ферментации и продукцията на храни. Механизмът на действие на който включва имуномодулация, ефективно повлияване на протективната микрофлора и модулация на метаболитната активност (ISGNAS 1998).

Това разделяне, макар и все още дискусивно дава по-точна представа за сферата на приложение на пробиотиците и може да бъде прието с оглед изготвяне на законодателни и нормативни документи и разпоредби за пробиотиците.

Пробиотиците могат да бъдат разглеждани по групи според сферата на приложението и гостоприемника:

Пробиотици за животновъдството

Пробиотици за храни/ хранителни добавки, консумирани от хората

Пробиотици с медицинска насоченост за профилактика и лечение, като тук може да се включат не само живи микроорганизми, но и техни актишни метаболити или компоненти).

Независимо от подреждането им както учените, така и експертите по храни, безопасност на храни и оценка на риска се консолидират около становището, че се налага да бъдат доказвани за всеки предложен пробиотик:

**(А) произход и идентичност**

**(Б) безопасност на пробиотика**

**(В) Ефикасност и ефективност на пробиотика** - т.е. да се докажат физиологичните ползи при използване на определен брой жизнеспособни пробиотични бактерии в определените като подходящи форми за администриране (храна, капсули или др.), при определен брой пациенти, контролирани от плацебо и/или стандартна опция за лечение, ако крайният резултат е лечение на заболяването.

Това са основни показатели, по които днес се прави оценка за практическата допустимост на всеки един пробиотик и те с допълващи, но не по-малко важни критерии ще бъдат разгледани по-подробно (т. 3.). Следващата стъпка в разработката е да се включат тези биологично-активни микроорганизми и/или продуцираните от тях активни метаболити в производството на естествено защитени и функционални франи, пробиотични добавки за храни и фуражи или във формули с терапевтично приложение. Затова непрекъснато се търсят щамове с подходящи свойства и положителен потенциал за човека и неговото здраве. Перспективите за развитие на пробиотичните продукти са в тясна зависимост от научните доказателства за тяхната безопасност, органолептичните им качества, здравословния и лечебен ефект (Robert E. Ward and J. Bruce German, 2004). Нужни са по-обстойни изследвания на основните групи пробиотични микроорганизми

(млечно-кисели и бифидобактери, както и някои дрожди) и нови биомаркери, които адекватно да разкриват физиологичния потенциал на функционалните храни и млечно-киселата микрофлора участваща в получаването им (Т. Mattila-Sandholm et al., 2002).

### 3. Подбор и приложение на пробиотични щамове

Подборът на пробиотици включва два типа анализи:

(i) *in vitro* анализи, които са важни за цялостния процес на селекция и за предварителния подбор измежду голям брой щамове на потенциално пробиотичните такива. Този тип анализи се основават на използването на различни моделни системи;

(ii) контролирани *in vivo* изследвания със здрави доброволци, на които се дава определена доза от подбрани чрез *in vitro* анализа щам или щамове (Morelli, 2000).

Част от признатите днес пробиотични микроорганизми са открити и използвани при получаването на храни. Напр. много голямо е разнообразието от fungi (гъби) и бактериални видове при ферментационните производства (алкохолни напитки, ферментирали млека, краве масло, сирене, хляб, сурово-сушени колбаси и т.н.). Те се произвеждат от векове, поради което са издържали теста на времето. Консумацията на ферментационни продукти, съдържащи живи клетки от желани микроорганизми в милиарди и техните метаболитни продукти не предизвикват притеснение в загрижения за сигурността си консуматор (Hansen, E.V. 2002). Затова с изключение на микроорганизмите, които не са били използвани в значителна степен в подготовката на храна за хора в рамките на ЕС (Регламент на новите храни, 1997), микроорганизмите за употреба като храна не са обект на регламент на Общността. За тях се приема т.нар. **дълга история на предполагаемата безопасна употреба**. За разлика от тях, микроорганизмите, използвани като фуражни добавки или като растителна защита продукти, са изчерпателно уредени. Това доведе до ситуации, при които едни и същи или тясно свързани щамове, които се използват свободно в човешки храни са били предмет на строги оценки за безопасност, когато се изисква одобрение на Общността, като фуражна добавка.

Директното добавяне на пробиотични микроорганизми към функционални храни, нефармакологични или лекарствени препарати изисква да бъде направен внимателен подбор на щамове, годни за прилагане в индустриален мащаб. Трябва да бъдат установени

техните качества и функционални свойства на прилаганите. Могат да се формулират три основни аспекта, които трябва да се вземат под внимание при подбора на пробиотични щамове: **(1) Безопасност, (2) Функционалност (3) Технологичност**

### **3.1. Критерии за подбор и оценка на пробиотици**

#### **3.1.1 Безопасност**

Храните и препарати, съдържащи пробиотични микроорганизми, преди всичко трябва да бъдат безвредни за гостоприемника (хора или животни), както за здравите, така и за специфични групи (напр. възрастни, малки деца, имунокомпроментирани лица). Критериите, според които даден щам се определя като бездреден са:

- Произход,
- История на употреба,
- История на непатогенност,
- Липса на синтез на вредни за гостоприемника метаболити,
- Антибиотична резистентност

Нека ги разгледаме по-подробно

#### **Произход**

Лактобацилите, други млечно кисели бактерии и дрожди (главно сред признатите като пробиотици) са повсеместно разпространени, но за пробиотично приложение предпочитани са щамове изолирани от човека (когато се разработват препарати за хора) или от съответния гостоприемник (например пилета за пробиотици в птицевъдството), тъй като след прилагане на препаратите, щамовете попадат в свойствена и благоприятна за тях среда и имат по-големи шансове да се задържат и да окажат положителния си ефект в прилагания хабитат. Дълго време това е бил задължително условие за прилагането им. В резултат на което, повечето търговски продукти на пазара спазват това условие. С напредването на научните търсения е доказано, че изолати от други екологични ниши също могат да бъдат успешни пробиотици в нова среда, различна от тази от която са изолирани.

#### **История на употреба**

Необходимо условие за да се класифицира един шам като безвреден, в употребяваните от човека пробиотични препарати, е той да има **ДЪЛГА ИСТОРИЯ НА ПРИСЪСТВИЕ**. EFSA отбелязва, че тези микроорганизми, не са обект на регламент на Общността, а по-скоро се предполага да бъдат безопасни, въз основа на тяхната дълга история на употреба, без очевидна вреда. (The EFSA Journal , 2007). За оценка на пробиотиците по този показател на практика се използва концепцията на EFSA за "**Квалифицирана Презумпция за Безопасност (QPS - Quality Presumption of Safety)**", създадена за микроорганизми използвани в храни и фуражи.

Голямо е разнообразието от микробните видове, които се използват в производството на храни и фуражи. Някои от тях имат дълга история на видима безопасна употреба, докато други са по-малко използвани и тяхното прилагане може да представлява риск за потребителите. Опитът е показал, че има нужда от инструмент за определяне на приоритетите в рамките на оценката на риска на тези микроорганизми, използвани в производството на храни/фуражи, посочена на EFSA и следователно предмет на официална оценка на безопасността. За да отговорят на тази нужда, е потърсена система за оценка на безопасността преди пускането на пазара на избрани групи от микроорганизми. Т.е. EFSA търси да разработи обща система за одобрение и така възниква концепцията за "*квалифицирана презумпция за безопасност*" (*QPS*), определена като предположение, основано на разумни и квалифицирани доказателства, за да се позволи на определени рестрикции да се прилагат. За целта EFSA (2003 г.), свиква работна група, състояща се от членове на Научния комитет за контрол храненето на животните, на Научния комитет по храните и на Научния комитет по растенията, които подготвят работен документ, очертаващ този подход. С цел да се проучи възможността за въвеждане на система, подобна на приетата и използвана в САЩ концепция на GRAS статут (**General Recognize As Safe** – т.е. Обикновено Признатите като Безопасни) е бил изготвен работен документ за обществено допитване, съвместно от цитираните научни комитети на бившия DG SANCO (Directorate General for Health and Consumer Affairs). Този документ дава общ подход за оценка на безопасността на микроорганизми, използвани във фуражите/храните е на разположение на уебсайта на Европейската Комисия, ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out178\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf)). Този документ пръв въвежда концепцията QPS и възможен начин за хармонизиране на подходите за оценка на

безопасността на микроорганизми, използвани в производството на храни/фуражи, без да прилага ненужни и драконовски мерки в области, в които законодателството в момента отсъства и където не е имало проблеми с безопасността, което позволява да се обърне внимание на съществените нови опасения за безопасността. Предложеният подход е посочен като квалифицирана презумпция за безопасност на храните (QPS) и се определя като "*предположение на базата на разумни доказателства*". Една такава система може да подобри последователността при оценка на безопасността и в същото време позволява по-добро използване на ресурсите за оценка, като не се изисква пълен и може би ненужен преглед на безопасността на организми с дълга история на безопасна употреба. Т.е. оценките за безопасност могат да бъдат елиминирани или ограничени само до онези аспекти, които са от значение за въпросния организъм. Въпреки това, няма формална процедура за оценка и операционализиране на тази така наречена "*презумпция за безопасност*", такава, че да може да се използва като основа за екстраполиране на вероятна безопасност при нови приложения на пробиотичните щамове и култури или на тясно свързани с тях щамове и култури. Всеки микроорганизъм, който притежава QPS статут е освободен от необходимостта да бъде подлаган да допълнителни тестове за безвредност. Така презумпцията за безопасност QPS е освободила много, но не всички, пробиотични щамове от необходимостта да представят токсикологични данни. За не-QPS щамове за фуражни добавки например, се изисква да се изготвят три независими проучвания за генотоксичност, 90-дневно перорално проучване за токсичност при плъхове, и проучване за толерантност при целевите видове животни. За да се докаже ефикасността с малки изключения, най-малко три *in vivo* тестове със статистически значими резултати, са необходими за всеки вид. Към днешна дата, само около 30 пробиотични щамове са одобрени за използване в храни за животни. Следователно изключително строги са мерките за контрол на пробиотици за нуждите на животновъдството, което е съществен сегмент гарантиращ безопасността на хранителната верига и здравето на хората. Изненадващо обаче пробиотиците за директна употреба от хората не подлежат на подобен стриктен контрол и няма регламенти задължаващи следенето им. Може би фактът, че те не са ежедневен елемент на трапезата на консматора и приемът им е асоцииран най-често с конкретен проблем, оставят в сянка необходимостта от по-детайлна оценка на безопасността и полезността на тази група пробиотици, както



това се прави с животинските, за да се избегне всякакъв риск. Експертна оценка по този въпрос би била от полза за бъдещето на пробиотичните препарати за хора.

Приема се, че срок от десет години е достатъчно дълъг период за да предствлява документирана история на употреба. Съществува предложение да се даде статут „**Качествена презумция за безопасност**” на редица представители от род *Lactobacillus* поради дългогодишната им употреба в производството на множество храни. Засега на оценка са подложени значителен брой видове Грам (положителни) неспорообразуващи микроорганизми, дрожди и гъби, за които е направено това предложение. Списъкът им е достатъчно голям, за да покрие по-голямата част от оценките за безопасност, на микроорганизмите, включени в хранителната верига под контрол на EFSA. Следователно, Научният комитет счита, че въвеждането на QPS система за микроорганизми ще отговаря на първоначалните цели, за предоставяне на практически инструмент за определяне на приоритетите и избягване на обширни разследвания за организми, които вече са известни да бъдат безопасни (*EFSA Journal* , 2007). В заключенията на EFSA се отбелязва, че QPS като концепция може да осигури обща система за оценка на различни микроорганизми, която може да се прилага за всички молби, получени за оценка на безопасността на микроорганизми, съзнателно въведени в хранителната верига (EFSA 2005a). Ползите от въвеждането на QPS ще бъде по-прозрачен и по-последователен подход в различните експертни панели на EFSA и потенциал за по-добро използване на ресурсите, като вниманието се съсредоточи главно върху тези организми, които крият най-големите рискове и неизвестни.

#### □ История на непатогенност

Задължително е да се установи непатогенността на всички използвани щамове в пробиотичната индустрия, които да имат **история на непатогенност**. Т.е. пробиотиците се оценяват за патогенност, инфекциозност, токсичност, както и наличие на вирулентни фактори. Липсата на патогенност и инфекциозност е задължително условие за пробиотична безопасност.

Международно приет е GRAS-статут (**G**enerally **R**ecognize **A**s **S**afe – т.е. Обикновено Признатите като Безопасни) за млечнокиселите бактерии, особено за тези, които се използват като пробиотици. По принцип GRAS-статут е една от четирите правни

категории, определени от Конгреса в САЩ през 1958 г. за хранителни добавки. За вещество, GRAS е било определено само това, което има дълга, сигурна историята на обща употреба в храни, или е доказано безопасно, въз основа на научни доказателства.. Ако обаче, има нови данни, които показват, че добавка с GRAS статут вече не е безопасна, Агенцията по контрол на лекарствата и храните (FDA) може да забрани използването или да изиска допълнителни проучвания, за да се определи доколко е безопасна.

В тази връзка трябва да отбележим, че през последните години бяха съобщени случаи на изолиране на лактобацили при инфекции с хора (Salminen et al. 2006). Те касаят щамове от единични видове (Табл. 1) – *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus plantarum*, като най-често това са в случаи с имунокомпрометирани индивиди. Изследванията показват, че някои лактобацили могат да проявят патогенен потенциал главно при новородени, при възрастни и имунокомпрометирани лица. Инфекции, свързани с пробиотични щамове на лактобацили са изключително редки. Michael H. Land et al. (2005) докладват 2 случая с пациенти, които са получили пробиотични лактобацили и впоследствие са развили бактериемия и сепсис, свързани с пробиотичните щамове. Това е един от първите доклади показали, че инвазивно заболяване може да бъде свързано с пробиотични микроорганизми от групата на млечно киселите бактерии. При анализ на стари случаи на лактобацилемия е установено, че лактобацилите имат отношение главно към ендокардита и бактериемията (Rola N. Husni et al. 1997).

**Табл. 1.** Представители на млечно кисели и бифидо бактерии изолирани при случаи на ендокардити, бактериемия, кръвни проби и локални инфекции

Род	Вид
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus, plantarum, casei, paracasei, salivarius, acidophilus, plantarum, gasseri, leichmanii, jensenii, confusus, brevis, bulgaricus, lactis, fermentum, minutus, and catenaforme sp.</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>mactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides, paramesenteroides, citreum, pseudomesenteroides, and lactis sp.</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici and pentosaceus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Dentium (eriksonii) and adolescentis sp.</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Faecalis, faecium, avium, and others</i>

\*Литераурни източници: Gasser F. (1994); Aguirre M. et al. (1993); Brook (1996); Jett BD. et al. (1994).

Обясненията за излезлите най-често нетипични инфекции могат да се търсят в следните причини: лошият имунен статус на пациента; щамовете, използвани като пробиотици, не са били правилно идентифицирани до видово ниво; не са били идентифицирани първоначалните им източници; не са били подложени на изчерпателни тестове за определяне на биологичната им активност; обработката на пробиотичните продукти е била извършена в нехигиенични условия. Масовото приложение на лактобацилите в пробиотичните препарати, налага изостряне на вниманието към подобни съобщения. Затова някои от пробиотичните добавки могат да имат GRAS за една група от консуматори, но за други не. В този случай, може да има специални съображения и ограничения, свързани с конкретната таргетна група, но не и с общото им ползване като пробиотична добавка за храни или други препарати.

Donohue и Salminen (1996) докладват някои методи за оценка на безопасността на млечно-кисели бактерии, чрез използване на *in vitro* проучвания, тестове с опитни животни и клинични изследвания и хора. Комбинацията им е доказала, че някои от настоящите пробиотични щамове отговарят на необходимите стандарти за безопасност. Според Salminen и Marteau (1997) са нужни също така проучвания за характерните свойства, фармакокинетиката и взаимодействията между гостоприемника и пробиотиците като средство за оценка на тяхната безопасност.

Много важен аспект при пробиотиците е отсъствието на така наречени вирулентни фактори. Проведени са изследвания за откриване на вирулентни фактори, подобни на известните при ентерококите, но за щастие такива не са били открити при нито един вид от род *Lactobacillus*. Много внимателно се следи този показател при пробиотични фуражни добавки от род *Enterococcus*. Ентерококите са важна част от коменсалната микрофлора на ГИТ при бозайниците и човека, но също са важни патогени, отговорни за сериозни инфекции. *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* са най-разпространените видове, при човека, и представляват повече от 90% от клиничните изолати. Други видове ентероки които причиняват инфекции при човека включват *Enterococcus avium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus raffinosus* и *Enterococcus mundtii* (de Perio MA et al. 2006). Тяхното включване като пробиотици за храни и/или фуражи трябва да се осъществява само след внимателен анализ в съответствие

с указанията на EFSA за отсъствие на вирулентни гени, гени на антибиотична резистентност, която може да се предава по пътя на хоризонтален трансфер.

Обективната оценка на безопасността на пробиотици в различни аспекти, не е лека задача. Въпреки това, има важни характеристики, които може да се определят *in vitro* и тези тестове са сравнително лесно изпълними с релевантни резултати. Много важен е тестът за инфекциозност на бактериите. Но оценка на способността да причинят опортюнистични инфекции за пробиотици е трудно. За наличие на остра и хронична токсичност вероятно може да се съди и по косвени доказателства. Въпреки това, наблюденията за преминаване на бактериите през чревната бариера, колонизацията в тялото на гостоприемника и транслокацията осигуряват по-преки данни за определяне на тяхната инфекциозност. Напр. Японски автори (Yamazaki et al.) проследявайки транслокация, на *Bifidobacterium longum* в моноасоциирани гнотобиотични мишки не са наблюдавали вредни ефекти, но било отчетено активиране на имунната система. Ако транслокацията или инфекцията започват от момента на адхезия на бактериите към мукозния слой на чревната лигавица, се изисква допълнително характеризиране и обсъждане бъдещето на пробиотика В тези случаи е добре да се направят молекулярно-биологични изследвания на бактериите, изолирани от местата на инфекция и на тези, които са приложени като пробиотици (Saxelin M. et al. 1996). Доказване връзка/сходство на ниво генетични характеристики на изолатите и пробиотика ще позволи да се определи щам-специфична ли е инфекцията и доколко се налагат по-нататъшни изследвания. Под въпрос трябва да бъде и използването на пробиотици, които в резултат на ензимните им активности (гликозидази и протеази) разграждат защитния мукозен слой на лигавицата.

Друго важно условие при подбора на пробиотични щамове е те **ДА НЕ ПРОДУЦИРАТ ВРЕДНИ ПРОДУКТИ** по време на метаболитната си активност. Затова задължителен тест е да се определи дали бактериите преобразуват хранителни компоненти или биологични секрети във вторични вещества, вредни за гостоприемника. Например, някои чревни бактерии въздействат на белтъците и техните катаболитни продукти с производство на амоняк, индол, феноли и амини (Drasar B. S. et al. 1976). В сравнение с други чревни бактерии, *Bifidobacterium* sp. имат по-ниска дезаминаза дейност, участващи в производството на амоняк от аминокиселини, но по-висока активност при усвояване на амоняк. Възможно е възникването на някои проблеми, свързани с използването на чревни

изолати като пробиотици, защото в храните чревните микроорганизми могат да проявят свойства, каквито не притежават в червата. Пример за това е способността за образуване на биогенни амини в храната, които се получават при декарбоксилиране на аминокиселините (напр. тирамин и хистамин, съответно от аминокиселините тирозин и хистидин) по време на ферментационните и гнилостните процеси. Тези амини могат да се окажат вредни, а образуването може да се дължи на качествения и количествения състав на микрофлората, хигиената по време на производството и на физични и химични променливи. Друг пример, илюстриращ вероятността за пробиотичен щам да продуцира опасни за гостоприемника вещества са бактериите притежаващи ензима за хидролиза на жлъчни соли (BSH- Bile salt hydrolase). Той е част от механизма за избягване на детергентното действие на жлъчните соли и дава възможност на бактериите да ги трансформират биохимично (Ferrari A. et al. 1980). Много чревни бактерии, включително *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* видове, могат да деконюгираат конюгираните жлъчни киселини (Midtvedt T, 1967). Изследвания върху BSH активността, обаче показват, че това може да навреди на метаболизма на липидите и мастните киселини и на адсорбцията на моноглицеридите и косвено може да доведе до възникването на други заболявания на гастроинтестиналния тракт.

В друг аспект вторичните жлъчни киселини са доказани вредни вещества, които се произвеждат от чревната бактериална микрофлора въздействаща на биологичните секрети (Araya-Kojima T. et al., 1995). Те могат да бъдат канцерогенни, като действат върху лигавицата и мукус-секретиращите клетки, стимулирайки пролиферацията им, или те могат да действат като стимулатори на канцерогенезата (Cheah P.Y., 1990). Потенциалните вреди за човешкия организъм, от микробиалната BSH активност се обсъждат „полугласно” и нееднозначно, но все по-често се включва сред критериите при оценка на кандидат-пробиотичен щам отсъствието на такава активност (Máire Begley et al. 2006).

#### ❑ Резистентност към антибиотици

Изключително важен въпрос по отношение на безопасността на пробиотичните щамове е широко разпространената **антибиотична резистентност** в микроорганизмовия свят. Появата и разпространението на устойчивост към антимикробни средства при бактериите представляват заплаха за здравето на хората и животните и е причина за

сериозни финансови и социални разходи. Оценката на пробиотиците по този показател напълно се покрива с директивите на EFSA прилагани за микроорганизми включени в хранителната верига.

С разбиране сериозността и значението на проблема са били предприети различни действия в държавите-членки на Общността. Те са предназначени за насърчаване на разумното използване на антимикробни агенти в първичната здравна помощ и ветеринарната медицина (включително отстраняване на всички антибиотици от животинските фуражи, използвани за стимулиране на растежа). Тези мерки са предприети в усилията си да се забави развитието на резистентност (The EFSA Journal, 2008). Затова важна част от дейността на Експертната група по добавките и продуктите или веществата, които се използват в храните за животни (FEEDAP) е съсредоточена в тази област. Като следствие е преразгледано Становището на Научния Комитет по хранене на животните (SCAN- Scientific Committee on Animal Nutrition) относно оценката на резистентни към антибиотици бактерии, със значение в клиничната и ветеринарно-медицинската практика, на база най-новите публикувани данни. Определени са критичните точки и граничните стойности, като показател за необходимостта от по-широка оценка на резистентността. Оценено е дали разграничението между "вродена" и "придобита" резистентност е достатъчен показател за вероятността от прехвърлянето, който е валиден за оценка на безопасността на микробни хранителни добавки (The EFSA Journal, 2008).

Поради масовото прилагане на антибиотици през последните 50 години микробите са развили различни механизми на резистентност към дадени антибиотици: (1) инактивация на ензими, (2) ограничено постъпване в клетката или активно изхвърляне от нея, (3) модификация на мишената.

Въпреки че, пробиотичните бактерии не са склонни да причиняват патологични процеси, те могат да служат като резервоар на детерминанти за устойчивост към антибиотици, които могат да се пренасят в патогените. Гените за антибиотична резистентност могат лесно да се разпространяват чрез хоризонтален трансфер, конюгативни плазмиди, транспозони, инсерционни елементи, както и посредством литични или лизогенни бактериофаги. Прехвърлянето на резистентни детерминанти върху плазмиди към други Грам-положителни бактерии, е показано при лактобацили както в лабораторни условия, така и в чревния тракт. За да се предотврати нежелано прехвърляне

на резистентност към ендogenous бактерии, пробиотиците не трябва да носят антибиотична устойчивост, която може да се трансферира и да постави под заплаха здравето на гостоприемника.

Знае се, че щамове на *Lactococcus lactis* показват резистентност, вероятно вродена, към колистин, фосфомицин, пипемидинова киселина и рифамицин. При род *Enterococcus*, много щамове, включително и тези, които са изолирани от клинични проби, е наблюдавана множествена резистентност към различни антибиотици (Gray J. W. et al, 1991), вкл. и такава която е придобита и може да се предава. Тези бактерии могат да са придобили резистентност към антибиотици вследствие контакт с тях (поради честа и безразборна терапия), или са развили някои от горе-изброените механизми.

Доказана е и естествена антибиотична резистентност при бифидобактерии (Matteuzzi D. et al.; Saarela et al. 2008) и лактобацили (Gupta P.K et al. 1995). Профилите на антибиотична чувствителност на род *Lactobacillus* варират между отделните видове, като за някои от тях липсват достатъчно данни. Това трябва да се вземе под внимание при оценката на безвредността на даден пробиотичен щам. Европейската служба за хранителна безопасност (EFSA) посочва как да се извърши оценка на антибиотичната резистентност на микроорганизмите използвани като пробиотици:

(1) трябва да се определи минималната инхибираща концентрация за даден щам към широк набор антибиотици;

(2) ако се окаже, че щамът е резистентен към даден антибиотик, трябва да се определи генетичната предпоставка за тази устойчивост. Ако резистентността е вродена или се дължи на геномна мутация, продуктът е приемлив.

В крайна сметка основният проблем се свежда до възможността за предаването на резистентността. В повечето случаи тя сама по себе си не се счита за опасност. Трябва да се проведе тест за проверка на способността на даден пробиотичен щам да стане донор на гени за антибиотична резистентност чрез конюгация. Например, търговският щам на *Lactobacillus rhamnosus* притежава вродена резистентност към ванкомицин, която не е близка до наблюдаваната при ентерококите и е доказано, че лактобацилите не могат да предават тази устойчивост на други микроорганизми (включително ентерококи). Следователно един такъв щам ще бъде безопасен и може да се прилага като съпътстващ

антибиотичната терапия пробиотик, който да подпомогне бързото възстановяване на естествената протективна микрофлора на гостоприемника.

Всички бактериални продукти, вкл. и пробиотичните, предназначени за използване като фуражни добавки трябва да бъдат изследвани, за да се установи възприемчивостта на щама към съответната група от антимикробни средства от хуманната или ветеринарната медицина. Важно е, тези тестове да са направени по един последователен начин, с международно признати и стандартизирани методи. Като основно изискване е MIC (минимална инхибиторна концентрация), изразена като мг L-1 или µg ML-1 трябва да се определя за всеки от следните антибиотици: ампицилин, ванкомицин, гентамицин, канамицин, стрептомицин, еритромицин, клиндамицин, квинупристин + далфопристин (например Synergid), тетрациклин, хлорамфеникол. Тези антибиотици са избрани за да се достигне до максимално точна идентификация на генотиповете на антибиотична резистентност към най-често използваните антимикробни средства посредством оценка на резистентните фенотипове (The EFSA Journal, 2008).

### 3. 2. Функционални аспекти

Вторият важен аспект за избора на подходящи пробиотични щамове, засяга функционалните им свойства – **ЖИЗНЕСПОСОБНОСТ, ЗАДЪРЖАНЕ/КОЛОНИЗАЦИЯ, ИМУНОМОДУЛАЦИЯ, АНТАГОНИСТИЧНО И АНТИМУТАГЕННО ДЕЙСТВИЕ, ПРОДУКЦИЯ НА АНТИМИКРОБНИ ВЕЩЕСТВА, АНТИГЕНОТОКСИЧЕН ЕФЕКТ, СПОСОБНОСТ ЗА ПОВЛИЯВАНЕ НА МЕТАБОЛИТНИТЕ АКТИВНОСТИ.** Този набор от т.нар функционални характеристики гарантират полезните свойства и ефективност на даден щам. Те са щамово-специфични и намирането на щамове които съчетават такива полезни свойства е обемна и сериозна научна задача. Доказването им е предпоставка за по-нататъшно разработване и приложение, но само ако е налице съчетание с безопасност на щама. При изучаване тези функционални свойства на всеки кандидат-пробиотичен щам, с които се цели подобряване на човешкото/животинското здраве се използват *in vivo* експерименти или *in vitro* модели. В първия случай това е много трудно по етични, а също така и по комерсиални съображения. При разработването на моделите се наподобяват по изкуствен начин – стимулиране на перисталтичното движение, проследяват се рН криви при



различни условия и при различна ГИТ секреция, при физиологично третиране и транспорт, проследява се абсорбцията на водата в модела и пр. И то за срокове адекватни на тези, които преживяват пробиотиците в ГИТ. Бурното развитие на науката в този аспект създава нови усъвършенствани модели, според които през миналата година са създадени нови модели, които обезпечават комбинирано предвиждане на вода и метаболити, за да се имитира по-оптимално физиологичната концентрация на микроорганизми + метаболити в гастроинтестиналния тракт. Така резултатите могат да дадат една точна картина за пробиотичния потенциал който има всеки тестван щам.

## □ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТ

Пробиотиците проявяват своята основна активност в ГИТ, който представлява своеобразна комплексна екосистема със стотици бактериални видове . Техните метаболитни функции и взаимодействия с гостоприемника повлияват човешкото здраве. Сред тях от особена важност са метаболитната активност и свойства на доминиращите полезни бактерии. Затова пробиотичните бактерии трябва да преживяват при преминаването през различните отдели на храносмилателната система попадайки последователно през различни неблагоприятни въздействия. Затова (i) *устойчивост към стомашната киселина*, (ii) *към храносмилателните ензими* и (iii) *вариабилното рН в различните отдели на ГИТ* са само част от качествата които гарантират тяхната жизненост.

Транзитната толерантност: Обединява, тези качества на пробиотичните щамове, благодарение, на които те могат да преживеят неблагоприятните въздействия при пасажа им в различните отдели на ГИТ за да достигнат колона и окажат полезното си действия. Тук се включват:

**Устойчивост към стомашната киселина-** пробиотичните бактерии трябва да преживяват при преминаването през стомаха, където отделянето на солна киселина представлява първата защитна бариера срещу по-голямата част от приетите микроорганизми. Храната престоява от 1 до 3 ч. в стомаха при кисело рН- 1.5-2.0, което се оказва сериозно изпитание за много от микроорганизмите. Толерантността на лактобацилите към кисела среда се определя от способността им да поддържат

постоянен рН градиент между рН на средата и това на цитоплазмата. Когато вътреклетъчното рН достигне една прагова стойност клетъчните функции се инхибират и клетките умират (Kashket, 1987).

**Устойчивост към жлъчен и панкреатичен сок.** Жлъчните соли синтезирани в черния дроб се секретират в дванадесетопръстника в свързана форма и впоследствие претърпяват различни химични модификации като разкъсване, дехидратация, дехидрогениране и деглюкуронизация, основно в дебелото черво под действието почти само на микробната активност на резидентната чревна флора. И свързаните и несвързаните жлъчни киселини проявяват антибактериална активност инхибирайки растежа на щамове *E. coli*, *Klebsiella* sp. и *Enterococcus* sp. *in vitro*. Несвързаните форми проявяват по-силна инхибираща способност. Грам-положителните бактерии са по-чувствителни от грам-отрицателните и за да достигнат и колонизират колона е необходимо да притежават добра устойчивост към жлъчни соли. Добрата преживяемост до 3 ч с високо микробно число в моделна система, *in vitro* симулираща жлъчен и панкреатичен сок може да се счита като достатъчен критерий за предварителен подбор на пробиотични лактобацили.

**Устойчивост при преминаване през червата.** Важно условие при избора на пробиотичен микроорганизъм е способността му да оцелява в средата, за която е предназначено неговото действие. Дебелото черво е преференциално място за колонизация от чревните лактобацили и бифидобактериите. За да достигнат до тази ниша те трябва да запазят жизнеността си под последователните въздействия на стомашна киселина и храносмилателните ензими, жлъчка и алкално рН.

Преживяемостта на пробиотичните щамове в различните отдели на ГИТ варира. Някои щамове бързо умират в стомаха, докато други успешно могат да преминават през целия чревен тракт във висок брой и успешно да колонизират дебелото черво, което е преференциално място за колонизация от чревните лактобацили и бифидобактерии (Marteau *et al.*, 1993). Изследванията, основаващи се на приемането на различни пробиотични щамове показват, че пробиотичния щам обикновено изчезва от ГИТ две седмици след като приема се преустанови (Alander *et al.*, 1999). В този случай се потапя под въпрос ролята на пробиотика в ГИТ. Но дори и временно да пребивават, което е било

наблюдавано при няколко проботични щама, това може да повиши техните шансове за благоприятно влияние в ГИТ, и поради тази причина се разглежда като желана отличителна черта.

## □ АДХЕЗИЯ И КОЛОНИЗАЦИЯ

Адхезията към епитела на вътрешните органи обхваща и способността за колонизация на стомашно-чревния и уро-гениталния тракт и е важна характеристика за пробиотичните щамове. Напоследък се доказва, че директният контакт с чревните епителни клетки е необходимо условие за някои пробиотични ефекти върху имунната система. Адхезията на пробиотичните млечно кисели бактерии към чревните епителни клетки е първата стъпка за постоянна или временна колонизация и предпоставка за продългото задържане в тракта и осъществяване на метаболитни процеси с изявено имуномодулаторно действие. Адхезията осигурява взаимодействието с лигавицата, подпомагайки контакта с чревносвързаната лимфна тъкан, което на свой ред води до стабилизация на чревната лигавица, изпълняваща бариерна функция. От своя страна чревносвързаната лимфна тъкан може да контактува с клетките на пробиотичните щамове и техни компоненти и по такъв начин оказва положителен ефект върху имунната система на гостоприемника. Ето защо способността за адхезия и последваща колонизация в дадената екологична ниша е основен критерий, при избора на подходящи пробиотични щамове. Адхезията се постига неспецифично чрез физико-химични фактори или специфично чрез адхезивни молекули по повърхността на бактериалната клетка и рецепторни молекули по епитела. Бактериите, способни да се прикрепят и да колонизират специфичните си ниши, имат по-голям шанс да проявят своите имуномодулаторни и антипатогенни свойства. Благодарение на адхезионната си способност пробиотичните щамове изключват конкурентно патогенните микроорганизми, като надделяват в съревнованието за местата за свързване и за хранителни вещества. Адхезията може да варира с възрастта и навигите на гостоприемника.

Така прикрепилети се вече микроорганизми към мукозната повърхност на дадената екологична ниша могат да влязат в контакт с подлежащата лимфоидна тъкан. Доказано е, че пробиотиците **могат да повлияят положително имунната система** и да намалят противовъзпалителните ефекти. Тези им качества са изключително интересни и

обещаващи, но поради тяхната многобройност и лабораторното ниво на определяне за значителна част, не може да бъдат разгледани подробно. Някои примери на утвърдени комерсиални препарати са обобщени в таблица 2. Много важен и интензивно изучаван аспект при пробиотиците от последните години е ефектът който те оказват върху имунната система. Натрупаните данни показват, че въвеждането на пробиотици води до редица специфични и неспецифични имунни реакции в гостоприемника, както при болни, така и при здрави индивиди. Тази модулация на имунната система включва: засилване на фагоцитозата, стимулиране на неспецифичните секреторни IgA, стимулиране на специфичния отговор на антителата към мукозни ваксини и повишен синтез на цитокини. В резултат се смекчават провъзпалителните процеси, предизвикани от патогени, а в имунокомпрометирани гостоприемници се потиска имуно-възпалителния отговор. Нещо повече, има данни, че пробиотичните микроорганизми могат да модулират образуването на IgE при алергични индивиди.

**Таблица 3** Комерсиално използвани лактобацили и бифидобактерии и докладваните клинични ефекти при хора.

Щам	Компания	Докладваните клинични ефекти
<i>L. rhamnosus</i> GG	Valio, Финландия	Адхезия към чревните епителни клетки, понижаване на фекалната ензимна активност, лечение и превенция от диария, имуномодулиране, превенция и третиране на хранителни алергии
<i>L. jonsonii</i> La1	Nestle, Швейцария	Модулиране на интестиналната флора, засилване на имунната система, роля в третирането на <i>Helicobacter pylori</i>
<i>L. casei</i> Shirota	Yakult, Япония	Адхезия към чревните епителни клетки, понижаване на фекалната ензимна активност, превенция рака на пикочния мехур
<i>L. reuteri</i> SD2112	BioGaia, САЩ	Колонизира ГИТ, превенция от диария
<i>L. plantarum</i> 299V	Probi, Швеция	Адхезия към чревните епителни клетки, модулиране на чревната микрофлора
<i>Bif. lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen, Дания	Третиране/ превенция от диария, модулиране на чревната микрофлора, модулиране на имунния отговор, облекчаване на запек и симптомите на хранителна алергия

Макар че, много усилия са насочени към изследване адхезията на пробиотици, ролята на адхезията за успешното функциониране на пробиотиците остава спекулативна. Би могло също да се твърди, че адхезионната способност може да повиши риска от инфекция на гостоприемника. Някои пробиотични щамове, които са слабо адхезиращи *in*

*vitro* и/или *in vivo*, все пак могат да имат положителен ефект за гостоприемника. В допълнение, възпроизводимостта на *in vitro* адхезионните изследвания може да бъде слаба (по специално между различни лаборатории), което също усложнява интерпретирането на резултатите.

#### □ ПРОДУКЦИЯ НА ЕКЗОПОЛИМЕРИ.

Много важни функции се приписват на екзополисахаридите, синтезирани от конкретен щам извън клетъчната стена. Тук се включват промотори на адхезията, интер- и интрагенетична агрегация и формирането на биофилм, стабилност в присъствието след адхезия, промотори на резистентност към неспецифичната и специфична имунна система на гостоприемника и др.

#### □ АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ.

Някои метаболитни компоненти като органични киселини, мастни киселини, водороден пероксид, продуцирани от МКБ и бифидобацтерии показват антимикробни ефекти. Бактериоцините с специфична инхибираща активност срещу близкородствени видове са най-интензивно изучавани. В последните години се натрупаха много данни за продукцията на антагонистични щещества и срещу редица хранително асоциирани патогени и развалящи продуктите микроорганизми. Следователно пробиотични култури подбрани по този признак могат да окажат положителен ефект при лечение на инфекции с хранителна етиология. Могат да бъдат посочени множество примери от научната литература, доказващи подобен ефект в лабораторни условия *in vitro* и *in vivo*. Доказаната антибактериална активност и роля в естествената биологична защита на организми се проявява и при прилагането на правилно подбрани пробиотични щамове, при лечението и профилактиката на екологични ниши от човешкия организъм, които са техни естествени хабитати – гастроинтестиналният тракт, влагалището, устната кухина.

Много важна е антимикробната активност на полезните бактерии в аспект безопасност на храни. Различни групи млечно-кисели бактерии намират приложение като биоконсерванти. Те са основни агенти на биоконтрола на хранителни продукти, изразяващ се в използването на живи микробни клетки или на техните метаболити, за потискане на растежа на други бактерии, имащи същото местообитание, но оказващи вреден ефект.

Жизнеспособните лактобацилни клетки в хранителните продукти са типичен пример за ограничаване по естествен начин развитието на развалящи или патогенни микроорганизми, посредством синтез на биологично активни метаболити и промени в общата среда на местообитание. Най-често използваните лактобацили в биоконтрола са: *L. casei*, *L. delbrueckii bulgaricus* и *lactis*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, и *L. sakei*. През последните години се наблюдава засилен интерес към биоконсервантите, като заместители на химическите такива. Те могат да се използват както във ферментативни, така и в неферментативни хранително продукти и да ограничат до 90% развитието на вредните бактерии, при нехладилно съхранение. Изискванията към тези защитни лактобацилни култури са: те да бъдат безвредни за консуматора; да оказват благоприятен ефект върху продукта; да не оказват негативно влияние върху сетивните качества на продукта; да служат като индикатори при неправилно съхранение.

Млечната киселина, синтезирана от лактобациллите е главен овкусител, но има и бактериостатичен ефект при концентрация от 1 до 2 %.

Млечнокиселите бактерии продуцират голямо количество диацетил. Той е ефективен при ниско рН (ненадвишаващо 5,0) и концентрация от 0,1 до 0,25%. Силният му аромат е приемлив само в млечните продукти. Тъй като е летлив, приложението му се ограничава до продукти с кратък срок на годност. Антимикробното действие на диацетила се дължи на встъпване в реакция с аргинина в състава на белтъците. Това води до промяна в структурата и инактивиране на важни клетъчни ензими.

Продукцията на  $H_2O_2$  от каталазоотрицателните лактобацилни щамове е много важна в суровото мляко, защото спомага за образуването на хипотиоцианова киселина, която е силен окислител и атакува SH-групите на мембранните белтъци на бактериите. При други хранителни продукти водородният пероксид причинява директно увреждане на мембраните и клетъчните компоненти. В такива случаи той може да има и неблагоприятен ефект върху качеството на хранителните продукти, защото ги обезцветява. Водородният пероксид има бактериостатична активност при концентрации над 6-10  $\mu\text{g/ml}$ , а бактерицидна – над 30-40  $\mu\text{g/ml}$ . При подходящи условия само някои щамове могат да отделят бактериостатични концентрации водороден пероксид, а в редки случаи и бактерицидни. Той е активен срещу бактерии, fungi и вируси. Това широкоспектърно действие го прави приложим и срещу бактериофаги в стартерните култури.

Ниски концентрации етанол могат да се добавят за удължаване на срока на годност на пакетирани храни. Наличието на етанол ограничава развитието на микроорганизми. Основно приложение намира при печени и полуготови продукти като хляб и блатове за пица.

Реутеринът ( $\beta$ -хидроксипропионалдеhid) инактивира бактериалната рибонуклеотид редуктаза. Продуцира се от някои щамове *Lactobacillus reuteri* при анаеробен растеж в присъствие на глицерол в субстрата. *Lactobacillus reuteri* присъства в гастроинтестиналния тракт на животните и човека. Използването на тази бактерия като хранителна добавка се приема за безопасно и благоприятно за здравето. Реутеринът е водоразтворим, ефективен е в широк рН диапазон и е устойчив на протеолитични и липолитични ензими. Може или директно да се прибавя към хранителните продукти, или да се внася глицеролов субстрат със стартерната култура. Реутеринът се характеризира с широк спектър на действие: има антибактериално, антимиотично и антипротозойно действие. Използван като антимиотик, потиска растежа на голям брой развалящи фунги (*Penicillium*, *Aspergillus* и др.), като е ефективен и срещу *Bacillus spp.*

Бактериоцините, синтезирани от лактобацилите са особено важни в хранително-вкусовата промишленост от една страна заради действието си срещу различни развалящи и патогенни микроорганизми, а от друга – поради безвредността им спрямо консуматора. Бактериоцините могат да се добавят към храните под формата на: (i) инокулат от жизнеспособни клетки на млечно-киселите бактерии; (ii) пречистени или полупречистени бактериоцини като консерванти; (iii) съставка предварително подложена на ферментация с щам-продуцент на бактериоцини. Бактериоцините имат и друго приложение – могат да се инкорпорират в опаковъчните материали за предпазване от развитие на развалящи и патогенни микроорганизми. Повърхностното антимиотично действие се обезпечават от контакта между опаковката и храната, което прави възможно дифундирането на бактериоцини върху повърхността на продукта. Това става постепенно и е по-ефективно от директното напръскване с бактериоцини. Обяснението за намаляването на антимиотичното действие с времето трябва да се търси в инактивиране на бактериоцините от някои хранителни съставки и мигрирането им във вътрешността на продуктите. Всъщност концентрацията на бактериоцините на повърхността намалява с времето.

Съществуват два метода за инкорпориране на бактериоцините в опаковките: чрез директно включване в полимерите и чрез покриване, или адсорбция върху повърхността им.

#### □ ДРУГИ ПОЛЕЗНИ ФУНКЦИОНАЛНИ СВОЙСТВА:

**Агрегационен и Ко-агрегационен фенотип.** Смята се, че ко-агрегацията повишава елиминирането или разрушаването на патогени в стомашно-чревния тракт. Пробиотични бактерии които притежават способността да агрегират по-добре преживяват неблагоприятни въздействия на различни анти-микробни агенти.

**Антибиотична резистентност** освен като критерий за безопасност може да се оцени и като важен функционален показател. Устойчивостта срещу антибиотици при пробиотичните щамове дава възможност пробиотичните продукти да се използват за възстановяване на чревната микрофлора на пациенти страдащи от колити, предизвикани от антибиотици. Поради остатъка от антибиотици в чревния тракт, само резистентни щамове могат да населяват тази екосистема. След като бъдат приложени, пробиотичните микроорганизми трябва да могат да оцелеят в екологичните ниши и да се задържат там достатъчно дълго, за да могат да окажат благоприятния си ефект върху гостоприемника.

### 3. 3. Технологични и сетивни критерии

Третата група качества, при оценката и подбора на пробиотичните щамове се отнасят към технологичните и сетивните им свойства. Разрастващият се пазар на пробиотични храни и продукти и натрупаните нови данни за биологичните активности на лактобацилите, предполагат все по-добро качество на крайния продукт. Усилията са съсредоточени върху подобряване на производствените процеси както при ферментацията на пробиотичните храни, така и при производството и съхранението на пробиотични щамове, които влизат в състава на различни препарати. Основните технологични свойства, които трябва да притежава пробиотичния щам, за да бъде оценен като подходящ за използване в производствени мащаби са **ДОБРИ СЕТИВНИ КАЧЕСТВА, БЪРЗО НАТРУПВАНЕ НА БИОМАСА, ПОНОСИМОСТ КЪМ ДРУГИ МИКРООРГАНИЗМИ, УСТОЙЧИВОСТ КЪМ ОРГАНИЧНИТЕ И НЕОРГАНИЧНИ СЪСТАВКИ НА ПРОДУКТА, СТАБИЛНОСТ В ПРОДУКТА ПО ВРЕМЕ НА СЪХРАНЕНИЕТО, УСТОЙЧИВОСТ НА ФАГИ И ДР.**



Промените в производствените етапи, имащи за цел да стимулират растежа на пробиотичните култури, засягат подгряване на суровините, температура на инкубация, добавка на ензими и други съединения, окислително-редукционен потенциал, условия на съхранение (рН, O<sub>2</sub>), микро-инкапсулиране. Понякога се оказва, че щамове, които имат много добри свойства, не могат да издържат на производствените процеси, а култивирането в промишлени мащаби и последващото съхранение на пробиотиците в голям брой е възлова точка при реализацията на търговския им потенциал. Този набор от характеристики няма пряко отношение към безопасността на пробиотиците, но без коректната му оценка на практика не може да бъде реализиран нито един пробиотик. Технологичните и сетивни свойства пряко детерминират и формата, под която ще се прилага даден щам, така че да се гарантира неговата ефективност и полза. Следователно следи се да бъде постигнат достатъчен брой жизнеспособни и с добра метаболитна активност клетки, които да достигнат до екологичната ниша и окажат положителните ефекти. Жизнеспособният брой на пробиотиците може да намалява и по време на съхранението на продукта. За да се запази желаният жизнеспособен брой, се внася голям брой клетки, т.е. високо микробно число пробиотици при производството. Консумирането на пробиотици в големи дози е безопасно. В практиката, прибавянето на значително количество на пробиотик, може да е скъп проект, определящ относително висока цена на пробиотичната култура. Също така може да се окаже, че има органолептична граница за количеството на пробиотика, който може да се добавя към даден продукт. Следователно много е важно да се определят условията за поддържането на жизнеспособността на пробиотиците в храните/продуктите по време на производството и съхранението им (Yuan Kun Lee et al., 2009).

Общо има 5 важни точки, когато се добавят пробиотици към храни:

1. Избира се съвместим за вида на храната/продукта пробиотичен щам;
2. Използват се хранително-вкусови процеси при условия, които са съвместими с оцеляването на пробиотика;
3. Ако е необходим ферментационен процес, трябва да се провери, дали хранителната матрица ще поддържа растежа на пробиотика;

4. Избира се подходящата матрица на продукта, опаковките и условията за да се осигури оцеляване на пробиотика по време на доставянето на продукта и съхранението му.

5. Проверява се, че добавянето на пробиотика няма да влияе лошо на вкуса и структурата на продукта.

Валидирането на всички тези характеристики позволява да се пристъпи към внедряване на пробиотичния шам. Пускането на пазара обаче е свързано с оформянето на така нареченото регистрационно досие. В него се обобщават получените резултати от оценката съгласно набора от критерии подробно разгледан в предходните точки от становището.

Трите части на Европейско регистрационно досие, приложими за пробиотици, са:

1 - **идентичност и качество**: включва характеристики на щама (таксономия, обмяната на веществата, свойства), характеристики на производствения процес, стабилност (моно култура или в комбинация от щамове), метод на анализ. Изискванията на ЕФСА относно точното идентифициране на щамове до вид са много строги- задължително се представят резултати от поне 2 високо дискриминативни молекулярни метода. Златният стандарт в бактериалната таксономия- 16S rDNA секвенционен анализ е задължителен подход при идентификация на всеки пробиотичен шам за влагане в хранителни добавки, фуражи или храни.

2. - **безопасност за потребителя** липса на антибиотична резистентност, генотоксичност и мутагенност и вреда за околната среда, за прицелните видове (напр. при животни -безвредни се считат пробиотици издържали тестове в концентрация 10 пъти над препоръчаната доза на формата, под която ще се предлага).

3 - **ефикасност**: да се докаже наличието на такава, за целевите видове, чрез поне три значими изследвания на две различни места. Разделът *Ефикасност* описва подробно целевите видове, условията (възраст, физиологичен етап, вида на ефикасното производство), доказателства, за ефекта на използваното дози, посочени от изпълнителя, както и възможните механизми за действие.

Когато има здравни претенции, EFSA дава отговор на молбата съгласно регулаторната рамка и експертното становище на съответния панел.

## **4. Пробиотици- спецификация на продукти, осигуряване на качеството и регулаторна рамка**

### **4.1. Основни регулаторни въпроси**

Нормативните актове, които касаят този и други проблеми се различават в различните страни, но статута на пробиотици като компонент в храната в началото на 21 век, не е установено на международно ниво (WHO, 2001a). В по-голямата си част, пробиотиците се възприемат като храни и хранителни добавки, тъй като повечето от тях са доставени през устата под формата на храна. Но те се разграничават от лекарствата в редица аспекти, особено по отношение на вземанията. Лекарствата имат претенции относно ефективност при лечението, за смекчаване или премахване на симптомите на заболяването, докато за храните, фуражните и хранителни добавки може да се правят само общи здравни претенции. В тази връзка ще се спрем на два основни момента в оценката на храни и пробиотици:

#### **□ ЗДРАВНА ПРЕТЕНЦИЯ**

Важен въпрос е нормативното валидиране на "*здравна претенция*" при пробиотиците. Тя се определя като "изявление, което характеризира отношенията на дадено вещество, към заболяване или състояние, свързани със здравето, и трябва да се основава на добре установени, общоприети знания и конкретни научни доказателства, публикувани в литература и/или на препоръки утвърдени от национални или международни публични институции за здравето" (WHO, 2001a). Напр. здравна претенция е „предпазва от рак“.

Освен това и при пробиотиците може да се прилагат принципите за доказване на здравна претенция използвани за храни: т.е. здравните претенции могат да бъдат направени по категории храна или съставка на храна (например хранително вещество или друго вещество, или комбинация от хранителни вещества/други вещества, или про-пробиотик) и те да се обсъждат в рамките на термина храна/съставка". Панелът NDA преценява дали определена храна/съставка е достатъчно определена и характеризирана, за да се установи, че проучванията, предвидени за доказване на претенцията са извършени с храна/съставка, за която е направена претенцията.

#### **□ ПРЕТЕНЦИЯ СТРУКТУРА/ФУНКЦИЯ**

Твърдението се определя като "изявление на хранителна помощ, която описва ролята на хранително вещество или хранителна съставка, за да се отрази на структурата или функционирането на човешкото тяло, или характеризира документиран механизъм, чрез който хранителното вещество или добавка действа за да се постигне/поддържа такава структура или функция. Напр. претенцията "*стимулира имунната система*". Докато твърденията, че вещество/добавка могат да третират, диагностицират, лекуват или предотвратяват заболяване, не се оценяват като претенции структура/функция.

#### □ АНАЛИЗ И ОЦЕНКА НА РИСКА

Новите документите и становища препоръчват претенциите за „намаляване на определени болести и риска от тях” да бъдат разрешени за специфични пробиотици, ако те са били демонстрирани с помощта на насоките, очертани в доклада на Световната здравна организация. (WHO, 2001a).

Новата парадигма на анализа на риска е той да намери място в регулаторната рамка за безопасността на храните и като се фокусира върху функционално разделение на научно-обоснована оценка на риска и управлението на риска. Въпросът за комуникацията сега също се смята за важна интегрирана част от анализа на риска. Комуникацията включва обмен между оценителите и мениджъри и двупосочно взаимодействие с други заинтересовани страни. В рамките на концепцията за прозрачността на процеса на вземане на решенията за безопасността на храните/добавките и последващите регулаторни действия, се подчертава, и важноста от осигуряване на възможности за потребителите и други да участват в процеса. Затова комуникационни усилия, по отношение на употребата на пробиотици, трябва да се разглежда като неразделна част от развитието на регулаторни инициативи.

#### **4.2. Препоръки относно обозначаването на пробиотичните продукти**

Необходимо е да бъде точно идентифициран всеки пробиотичен щам или микроорганизъм включен в диетичен/пробиотичен или хранителен продукт. Т.е. Комисията препоръчва (WHO, 2001a) да бъдат ясно обозначени и отбелязан върху етикета съответните микробни видове. Ако характеристиката в процеса на подбор на пробиотика е осъществена до ниво щам, идентичността на щама трябва да бъдат посочена, тъй като пробиотичните ефекти е доказано че са щам-специфични.

Много е важно да бъде осъществен точен количествен анализ – като брой живи клетки (CFU/ml или CFI/g продукт) от конкретния пробиотичен микроорганизъм включен в продукта или добавката. По дефиниция ефектът на пробиотика е в зависимост от броя живи клетки консумирани. Следователно, задължително тази информация трябва да се отбелязва на етикета. Това означава, че производителят гарантира наличието им и следователно и съответния положителен ефект. Какво се наблюдава обаче на пазара на диетични продукти и хранителни добавки с пробиотици - вместо обозначен общ брой живи клетки в готовия продукт в срока на годност, понякога се посочват данните от количествения анализ в процеса на производство, което е некоректно и подвежда потребителите. Затова препоръките са стриктно да бъде отбелязван гарантирания брой живи клетки от всеки пробиотичен щам в срока на годност.

#### **4.3. Производство и производствени процедури**

За да се гарантира, че дадена култура запазва и поддържа полезните си свойства, е необходимо да се съхранява изходния щам при подходящи условия и да се проверява периодично за идентичност на щама и за наличие на декларираните пробиотични свойства. Освен това, е нужно да се следи дали се запазват жизнеспособност и пробиотична активност за целия период на производствена обработка и съхранение на съответните продукти, в които са вложени пробиотичните култури. Не на последно място по важност са и тестовете- за проверка на параметрите (жизненост/активност) в края на срока на годност.

Като цяло е при производството на пробиотици/храни и добавки трябва да действат адекватни програми за осигуряване на качество. Добрите производствени практики трябва да бъдат следвани в производство на пробиотични храни. Консултативният съвет препоръчва Codex General Principles of Food Hygiene и Общите принципи на хигиена на храните и насоки за прилагане на HACCP да бъдат следвани.

#### **Заклучение**

Използването на пробиотици е въпрос със социален отзвук. В съвременното общество, в което хората са подложени на прекомерни стресове, недоимъчно и неправилно хранене, в условията на влошаваща се екологична среда, неправилно и прекомерно

използване на антибиотици и консерванти, на пробиотиците се пада отговорна роля най-вече в профилактиката на голям брой тежки заболявания, водещи своето начало именно от нарушен баланс на стомашно-чревната микрофлора, като- чревни инфекции, дисбактериози, ентерити, гастрити, язви, повишен холестерол, отслабена имунна система, алергии и др. Чрез подходяща профилактика тези болести могат да бъдат поставени под контрол и обществото да спести огромен ресурс (трудова, материална, финансов, психически). Активното научно оповестяване на положителните резултати от оценката на голям брой пробиотични култури и възможностите, които те предоставят на загрижените за здравето си консуматори водят до все повече доверие и разширено търсене. Не случайно в Европа пробиотиците и пробиотичните храни са сред най-стабилния сегмент на пазара на храни. Увеличаването на употребата им ще засили необходимостта от адекватен и стриктен контрол за да бъде избегнат и минималния риск за здравето на хора и животни. Това е една нова и нарастваща отговорност за експертите по безопасност и оценка на риска, тъй като микробиалните пробиотици въпреки своята безвредност, GRAS и QPS статут трябва да се прилагат в съответствие с нуждите, а не като универсално средство за здраве.

### Използвана литература:

- Aguirre M**, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* 1993;75:95–107.
- Alander M**, Korpela R, Saxelin M et al. (1997) Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Letters in Applied Microbiology* 24, 361–364.
- Araya-Kojima T**, Yaeshima T, Ishibashi N, Shimamura S, Hayasawa H. Inhibitory effects of *Bifidobacterium longum* BB536 on harmful intestinal bacteria. *Bifidobacter Microflora* 1995;14:59–66.
- Brook I**. Isolation of non-sporing anaerobic rods from infections in children. *J Clin Microbiol* 1996;45:21–6.
- Cheah P.Y**. Hypotheses for the etiology of colorectal cancer—an overview. *Nutr Cancer* 1990;14:5–13.
- Conway, P.L.**: Probiotics and the gastrointestinal microbiota. Lecture. XIIth International Symposium on Gnotobiology. Honolulu, USA, June 24–28, 1996.
- de Perio MA**, Yarnold PR, Warren J, et al. Risk factors and outcomes associated with non-*Enterococcus faecalis*, non-*Enterococcus faecium* enterococcal bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Jan 2006;27(1):28–33.
- DG SANCO's** website: [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out178\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf)
- Donohue DC**, Salminen S. Safety of probiotic bacteria. *Asia Pac J Clin Nutr* 1996;5:25–8.
- Drasar B.S**, Hill MJ. Human intestinal flora. London: Academic Press, 1974;72–102.
- Drasar, B. S.**, Jenkins, D. J. A. and Cummings, J. H. (1976). The influence of a diet rich in wheat fibre on the human faecal flora. *J. Med. Microbiol.* 9:423–431.
- EFSA COLLOQUIUM 2** “Microorganisms in Food and Feed, Qualified Presumption of Safety – QPS” 13–14 December 2004, Brussels, Belgium.
- EFSA Journal (2007) 587, 1-16** :Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA Opinion of the Scientific Committee (Question No EFSA-Q-2005-293) [http://www.elika.net/datos/articulos/Archivo267/EFSA\\_QPS07.pdf](http://www.elika.net/datos/articulos/Archivo267/EFSA_QPS07.pdf)
- EFSA, 2005a**. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed

- additives. *The EFSA Journal* 226: 1-12. [http://www.efsa.europa.eu/en/science/sc\\_committee/sc\\_opinions/972.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/sc_committee/sc_opinions/972.html)
- EFSA**, Antimicrobial resistance in zoonotic agents from animals and food in the European Union in 2004 – 2007. *EFSA Journal* 2010 ,8(4):1309.
- Ferrari A**, Pacini N, Canzi E. A note on bile acid transformations by strains of *Bifidobacterium*. *J Appl Bacteriol* 1980; 49:193–7.
- Food Marketing Institute and PREVENTION Magazine**. *Shopping for Health 1999. The Growing Self-Care Movement*. Washington, DC: Food Marketing Institute and Emmaus, PA: PREVENTION Magazine, 1999. Raleigh, North Carolina *The Dairy Council Digest*.
- Gasser F**. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull Inst Pasteur* 1994;92 :45–67.
- Gray J.W.**, Stewart D, Pedler SJ. Species identification and antibiotic susceptibility testing of enterococci isolated from hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1943–5.
- Gupta P.K**, Mital BK, Gupta RS. Antibiotic sensitivity pattern of various *Lactobacillus acidophilus* strains. *Indian J Exp Biol* 1995;33:620–1.
- Hansen, E.B.** (2002) Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 119– 131.
- Havenaar & Huis int Veld** (1992): Havenaar, R. and Huis in't Veld, M.J.H.: Probiotics: A general view. In: *Lactic acid bacteria in health and disease* (Ed.: Wood, J.B.J.). Vol 1. Elsevier Applied Science Publishers, Amsterdam (1992).
- Jett BD**, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994;462–78.
- Kashket E.R.** (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Rev* 46, 233-244.
- Kaufmann P.** (1997) *BIO WORLD* 4, 12-17.
- Lilly, D.M.** and Stillwell, R.H. (1965) Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147, 747-748.
- Máire Begley**, Colin Hill and Cormac G. M. Gahan Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72(3):1729. DOI: 10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006.
- Marco M.**; S. Pavan and M. Kleerebezem Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17, 204-210.
- Marteau P**, Pochart P, Bouhnik Y, Rambaud JC (1993) Fate and effects of some transiting micro-organisms in the human gastrointestinal tract. *World Rev. Nutr. Diet.* 74, 1–21.
- Matteuzzi D**, Crociani F, Brigidi P. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1983;134A:339–49.
- Michael H. Land**, Kelly Rouster-Stevens, Charles R. Woods, Michael L. Cannon, James Cnota, Avinash K. Shetty, (2005) *Lactobacillus* Sepsis Associated With Probiotic Therapy *Pediatrics Vol. 115 No. 1 January 1, 2005, pp. 178 -181 (doi: 10.1542/peds.2004-2137)*.
- Midtvedt T**, Norman A. Bile acid transformation by microbial strains belonging to genera found in intestinal contents. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1967;7:629–38.
- Morelli L**, Vescovo M, Cocconcelli PS, Bottazzi V (1986) Fast and slow milk-coagulating variants of *Lactobacillus helveticus* HLM 1. *Can. J. Microbiol Immunol* 32, 758-760.
- Parker, R.B.**: (1974) Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutr. Health* 29,4-8
- Robert. E. Ward and J. Bruce German** (2004) Understanding Milk's Bioactive Components: A Goal for the Genomics Toolbox. *J. Nutr.* 134: 962S–967S, 2004.
- Rola N.** Husni, Steven M. Gordon, John A. Washington, and David L. Longworth (1997) *Lactobacillus* Bacteremia and Endocarditis: Review of 45 Cases *Clinical Infectious Diseases* 1997;25: 1048–55
- Rusch, V.**, Ottendorfer, D., Zimmermann, K., Gebauer, F., Schrödl, W., Nowak, P., Skarabis, H., and Kunze, R.: Results of an open, non-placebo controlled pilot study investigating the immunomodulatory potential of autovaccine. *Arzneimittelforschung/ Drug Research* 51 (II), 690-697 (2001).
- Saarela M**, Lähteenmäki L, Crittenden R et al. (2002) Gut bacteria and health foods—the European perspective. *International Journal of Food Microbiology* 78, 99– 117.
- Saarela, M.**, Mayrhofer, S., Domig, K.J., Danielsen, M., Mayo, B. and Mättö, J. (2008) Susceptibility of bifidobacteria originating from different sources to tetracycline, erythromycin, streptomycin and vancomycin. *Int.J.Prob.Preb.* 3: 269 – 270.

- Salminen MK**, Rautelin H., Tynkkynen S., Poussa T., Saxelin M, Valtonen V, Järvinen A. (2006) *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. Clin Infect Dis. 2006 Mar 1;42(5):e35-44. Epub 2006 Jan 25.
- Salminen S, and Marteau P.** Safety of probiotic lactic acid bacteria and other probiotics. Lactic 97 (Proceedings). Adria Normandie Caen, **1997**:71–2.
- Salminen S.** Uniqueness of probiotic strains. IDF Nutr News Lett 1996;5:16–8.
- Sanders, M.E.:** Probiotic cultures and human Health. In: Germfree life and its ramifications. Proceedings of the XIIth International Symposium on Gnotobiology. Honolulu USA, June 24-28, 1996 (Eds.: Hashimoto, K., Sakakibara, B., Tazume, S., and Shimizu, K.). XIIth ISG Publishing Committee, Shiozawa, 91-95 (1996).
- Saxelin M**, Chuang N-H, Chassy HR, Mäkelä PH, Salminen S, Gorbach L. *Lactobacilli* and bacteremia in southern Finland, 1989–1992. Clin Infect Dis 1996;22:564–6
- T. Mattila-Sandholm**, M. Blaut, C. Daly, L. De Vuyst, J. Dore´ , G. Gibson, H. Goossens, D. Knorr, J. Lucas, L. Lahteenmaki, A. Mercenier, M. Saarela, F. Shanahan and W. M. de Vos .Food, GI-tract Functionality and Human Health Microbiol Ecology in Health and Disease 2002; 14: 65–74
- Takahashi T**, Morotomi M. Absence of cholic acid 7-dehydroxylase activity in the strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. J Dairy Sci 1994; 77:3275–86.
- Tannock Gerald W.** (2002) Probiotics and Prebiotics: Where Are We Going, IBT Global, Barking, London (ISBN:0-9542464-1-1)p.1-41
- The American Dietetic Association.** J. Am. Diet. Assoc. 95: 493, 1995)
- The EFSA Journal (2008)** 732, 1-15 Technical guidance Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance Prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed
- The FDA Center** for Food Safety and Applied Nutrition
- WHO, 2001a**-“Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria” Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria ;Córdoba, Argentina, 1-4 October 2001.
- Yuan Kun Lee**, Seppo Salminen; 2009; Handbook of probiotics and prebiotics; Second edition, copyright John Wiley and Sons