

Karakterizacija prirodnih izolata bakterija mlečne kiseline

Testirana su svojstva biosinteze bakteriocina 19 odabranih sojeva bakterija mlečne kiseline (BMK), kao i njihova sposobnost degradacije proteina iz mleka (proteolitička sposobnost). Rezultati bakteriološkog testa su pokazali da prirodni izolati laktobacila HO2, HO3 i HO4 ispoljavaju inhibitorno delovanje na senzitivni soj Lactobacillus casei HN14. Proteolitička aktivnost prirodnih izolata BMK je ispitivana testiranjem njihove sposobnosti da hidrolizuju β -kazein. Dobijeni rezultati pokazuju da je veliki broj testiranih prirodnih izolata proteolitički aktivan (HO1, HO4, HO5, HO6, HO7, HO8, HO12, HO13), odnosno da sintetišu ekstracelularne proteinaze koje hidrolizuju β -kazein. Soj HO4 (Lactobacillus rhamnosus) pokazao je efikasnost u hidrolizi kazeina, kao i inhibitorno (tj. antimikrobno) dejstvo na senzitivni soj Lactobacillus casei HN14.

Uvod

Bakterije mlečne kiseline: podela i osobine

Bakterije mlečne kiseline (BMK) predstavljaju heterogenu grupu organizama sa specifičnim metabolizmom. Njihova zajednička karakteristika je da su gram pozitivne, katalaza negativne, mikroaerofilne i ne stvaraju spore. Naziv su dobile po svojoj sposobnosti da fermentišu ugljene hidrate do mlečne kiseline (tzv. acidogena sposobnost), što je značajno zbog snižavanja pH vrednosti, čime se, pored izazivanja koagulacije proteina, inhibira rast štetnih mikroorganizama. Rasprostranjene su kao normalna mikroflora na biljkama, u usnoj duplji i gastrointestinalnom i uro-

genitalnom traktu sisara. Smatra se da ove bakterije imaju probiotička svojstva, inhibiraju rast patogena, a uz to snižavaju nivo holesterola u krvi i stimulišu imuni sistem (Harris *et al.* 1989). Upravo zbog ovakvih svojstava BMK su našle veliku primenu u industriji za preradu mesa, mleka i povrća.

Veliki broj sojeva BMK sintetišu različite antimikrobne supstance, kao što su etanol, vodonik peroksid, diacetil, rojterin i bakteriocini (supstance proteinske prirode sa bakteriostatskom ili baktericidnom aktivnošću). Za njihov normalni rast i razvitak značajan je dobro razvijen proteolitički sistem za degradaciju proteina (Tan *et al.* 1993).

BMK uključuju više rodova: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* (Axelsson 1998).

Proteolitička aktivnost BM

Izuzetno važno svojstvo bakterija mlečne kiseline je efikasan proteolitički sistem, koji služi za razlaganje ekstracelularnih proteina iz medijuma i transport produkata degradacije u ćeliju. Kazein, najzastupljeniji protein mleka, glavni je izvor aminokiselina bakterijama koje ga razlažu.

Ključni enzimi proteolitičkog sistema BMK su proteinaze, monomerni enzimi koji se nalaze na spoljašnjoj strani ćelijskog zida, molekulske mase između 180 i 190 kDa (Smid *et al.* 1991; Tan *et al.* 1993; Kok and de Vos, 1994). Bez funkcionalne ekstracelularne proteinaze, bakterije nemaju sposobnost razlaganja kazeina, čime im je onemogućen rast u mleku.

Bakteriocini BMK: definicija, podela i primena

Veliki broj sojeva BMK imaju sposobnost produkcije antimikrobnih supstanci označenih kao bakteriocini. Bakteriocini se definišu kao supstance proteinske prirode sa bakteriostatskom ili baktericid-

Ivana Petrović (1990), Novi Beograd, Studentska 39/27, učenica 2. razreda Devete beogradske gimnazija "Mihailo Petrović Alas"

MENTOR: dr Đorđe Fira, Biološki fakultet Beograd

nom aktivnošću, koja je ograničena na blisko srodne vrste (Tagg *et al.* 1976), pri čemu soj proizvođač ima mehanizme specifične samozaštite (Jack *et al.* 1995)

Dejstvo bakteriocina zavisi od mnogih faktora. Aktivnost proteolitičkih enzima poreklom iz BMK može uticati na njihovu degradaciju. Takođe, bakterije mogu postati rezistentne na dejstvo bakteriocina ako su produženo izložene njihovom delovanju. Aktivnost varira između rodova, između vrsta istog roda, kao i bakterija istog soja koje su gajene u različitim uslovima.

Prednost koju bakteriocini imaju u odnosu na druga sredstva koja se koriste za konzerviranje hrane jeste njihova laka svarljivost i nepostojanje štetnih dejstava po organizam konzumenta. Jedini predstavnik grupe bakteriocina koji je do sada našao primenu u prezervaciji hrane je nizin.

Cilj ovog rada je karakterizacija izolata BMK, radi utvrđivanja njihove sposobnosti za sintezu bakteriocina i razgradnju β -kazeina iz mleka. Poznavanje ovih osobina je od značaja za primenu ovih mikroorganizama u industriji hrane, kao i farmaceutskoj industriji.

Materijal i metode

1. Korišćeni bakterijski sojevi

Prirodni izolati BMK koji su korišćeni u ovom radu su prikazani u tabeli 1:

Tabela 1. Bakterijski sojevi korišćeni u radu

<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (humanog porekla)	<i>Lactobacillus brevis</i> (humanog porekla)
HO1	HO2
HO4	HO3
HO5	HO9
HO6	HO10
HO7	HO11
HO8	HO14
HO12	HO15
HO13	HO16
	HO17
	HO18
	HO19
Senzitivni soj	<i>Lactobacillus casei</i> HN14

Kao senzitivan soj u bakteriocinskom testu korišćen je *Lactobacillus casei* HN14.

2. Podloge za rast bakterija

Za gajenje bakterija roda *Lactobacillus* korišćen je medijum MRS (Merck GmbH Darmstadt, Germany). Čvrste podloge dobijene su dodavanjem 2% agara u tečnu podlogu pre autoklaviranja. Za testiranje proteolitičke aktivnosti, odabrane bakterije su uzgajane na mlečno-citratnom agaru (čvrsta podloga koja sadrži obrano mleko u prahu 44g/L, Na-citrat 8g/L, glukozu 8g/L, ekstrat kvasca 4g/L i agar 20 g/L). Sojevi su uzgajani na 25°C, na odgovarajućoj podlozi.

3. Bakteriocinski test

Princip ovog testa je usko vezan za selektivnu prednost u kompeticiji za prostor i nutritijente u medijumu. Svaki od konkurentnih sojeva teži da eliminiše onaj drugi, tako što će proizvoditi antimikrobnu supstancu na koju je on sam otporan. Pojava zone inhibicije rasta konkurentnog soja oko soja proizvođača jasno ukazuje na sintezu antimikrobnih supstanci.

Za detekciju biosinteze antimikrobnih supstanci kod tretiranih sojeva korišćen je sledeći metod (Harris *et al.* 1989):

Difuzioni metod u bunarčićima je izvođen tako što su petri šolje sa čvrstim MRS podlogama prelivene sa 5ml soft 0.7% MRS agara, u koje je resuspendovano 10^4 - 10^5 ćelija indikatorskog soja/mL medijuma, odnosno konačan broj ćelija/ml medijuma iznosio je oko 10^3 . U soft agaru su napravljeni bunarčići prečnika 5 mm u koje je sipano 50 μ L pre-konočne kulture potencijalnog proizvođača bakteriocina. Prisustvo antimikrobnih supstanci je detektovano na osnovu pojave svetle zone oko bunarčića, kao posledica inhibicije rasta senzitivnog bakterijskog soja.

4. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti

Sojevi testirani na proteolitičku aktivnost tretirani su po modifikovanoj metodi koju su opisali Hill i Gason (Hill i Gason 1986): bakterije su ezom sa čvrste podloge resuspendovane u 50 μ L 0.1 M natrijum-fosfatnog pufera (NaPi) pH 6,8 i dodato je 50 μ L β -kazeina, kao supstrata za digestiju. Nakon mešanja na vorteksu, smesa je inkubirana 3 sata na 30°C, a potom centrifugirana na 10 minuta na

13000 rpm u mikrofugi. Izdvojeno je 30 μ L supernatanta i pomešano sa istom količinom pufera za pripremu uzoraka za elektroforezu (125 mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 2% glicerol, 0.01% brom fenol plavo, 5% 2-merkaptetanol). Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 2 minuta na 100°C, i nakon inkubacije nanošeno je 12 μ L uzorka na gel za elektroforezu.

SDS-PAGE po Laemlieju korišćena je za identifikaciju proteolitičke aktivnosti odabranih sojeva BMK. Nakon polimerizacije gela nanošeni su uzorci, pri čemu su kao kontrole korišćeni rastvori odgovarajućeg supstrata (β -kazeina). Elektroforeza je vršena pri konstantnoj struji od 20mA, u trajanju od 2-3 sata. Po završetku elektroforeze gelovi su bojeni pomoću Coomassie brilliant blue G250. Obezbojavanje je vršeno korišćenjem smeše 15% etanola i 8% sirćetne kiseline, nakon čega su gelovi čuvani u odbojivaču.

Proteolitička aktivnost je identifikovana poređenjem kontrolne trake (sa odgovarajućim netretiranim supstratom) i ostalih traka, u kojima su se nalazile ćelije ispitivanih sojeva inkubirane sa tim istim supstratom.

Rezultati

Bakteriocinski test prirodnih izolata BMK

U ovom radu testirana je sposobnost proizvodnje antimikrobnih supstanci 19 prirodnih izolata BMK humanog porekla, izolovanih iz usne duplje. Korišćeni sojevi roda *Lactobacillus* zasejavani su na podloge direktno iz štokova, koje je za ovo istraživanje obezbedio Centar za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd.

Korišćenjem opisane difuzione metode, utvrđeno je da inhibitorno delovanje na senzitivni soj *Lactobacillus casei* HN14 ispoljavaju prirodni izolati HO2, HO3 i HO4.

Proteolitička aktivnost i utvrđivanje supstrate specifičnosti proteinaza BMK

Po završenoj digestiji β -kazeina, uzorci su analizirani na SDS-PAGE elektroforezi. Dobijeni rezultati pokazuju da je veliki broj testiranih prirodnih

izolata proteolitički aktivan (HO1, HO4, HO5, HO6, HO7, HO8, HO12, HO13), odnosno da sintetišu ekstracelularne proteinaze koje hidrolizuju β -kazein.

Rezultati istraživanja su sumirani u tabeli 2.

Tabela 2. Sumarni rezultati istraživanja

Soj	Vrsta	Bakteriocinski Test	
		test	proteolitičke aktivnosti
HO1	<i>L. rhamnosus</i>	-	+
HO2	<i>L. brevis</i>	+	-
HO3	<i>L. brevis</i>	+	-
HO4	<i>L. rhamnosus</i>	+	+
HO5	<i>L. rhamnosus</i>	-	+
HO6	<i>L. rhamnosus</i>	-	+
HO7	<i>L. rhamnosus</i>	-	+
HO8	<i>L. rhamnosus</i>	-	+
HO9	<i>L. brevis</i>	-	-
HO10	<i>L. brevis</i>	-	-
HO11	<i>L. brevis</i>	-	-
HO12	<i>L. rhamnosus</i>	-	+
HO13	<i>L. rhamnosus</i>	-	+
HO 14	<i>L. brevis</i>	-	-
HO15	<i>L. brevis</i>	-	-
HO16	<i>L. brevis</i>	-	-
HO17	<i>L. brevis</i>	-	-
HO18	<i>L. brevis</i>	-	-
HO19	<i>L. brevis</i>	-	-

Diskusija

Sposobnost hidrolize proteinskih supstrata ukazuje na postojanje ekstracelularnih proteinaza, kao najznačajnijeg dela sopstvenog proteolitičkog sistema bakterije. Ovaj faktor može imati poseban uticaj na sam proces varenja hrane kod čoveka.

Bakteriocini, kao produkt BMK, svojom bakteriostatskom i baktericidnom aktivnošću sprečavaju rast saprofitnih i patogenih mikroorganizama i pružaju bakteriji-proizvođaču selektivnu prednost u kompeticiji za prostor i nutritijente, u odnosu na blisko srodne vrste, osetljive upravo na taj bakteriocin. Bakteriociosku aktivnost testiranih sojeva na senzitivnom soju *Lactobacillus casei* HN14 pokazali su izolati laktobacila HO2, HO3 i HO4.

Prirodni izolat HO4 jedini je dao pozitivne rezultate u oba testa, zbog čega bi od velikog značaja bilo dalje testiranje ovog soja, kao i pronalaženje njegove primene u industriji i medicini. Zahvaljujući svojoj sposobnosti da hidrolizuje kazein, HO4 ima uslove za opstanak u sredini koja sadrži dovoljne količine proteina, a uz to bi se uz prethodno ispitivanje bakteriocinskog opsega, mogao svrstati u jednu od starter kultura. Ovaj soj bi mogao poslužiti i kao prirodni konzervans, čime bi se produžio rok trajanja namirnica, a ne bi postojao negativan uticaj na zdravlje konzumenta. Takođe bi mogao učiti u sastavu posebnog antibiotičkog leka. Uz kombinaciju neko-liko sojeva koji imaju različite antimikrobne spektre dejstva, efikasno bi mogao smanjiti potrebnu količinu ili čak potpuno zameniti antibiotike, koji sem korisnih imaju i niz neželjenih osobina. Bakteriocini, kao neškodljive i lako svarljive supstance, mogle bi postići isti efekat kao i moderni lekovi. Ipak, njihova loša strana jeste mogućnost da neke bakterijske vrste postanu rezistentne na određeni bakteriocin, pri čemu bi novi lek izgubio dejstvo.

Dalja karakterizacija sojeva-proizvođača bakteriocina bi podrazumevala utvrđivanje njihovog antibakterijskog spektra, s obzirom da je u ovom radu testirana njihova inhibitorna aktivnost na rast jednog od standardnih laboratorijskih sojeva, kao i testiranje proteolitičke aktivnosti na drugim izolatima kazeina (α i β -kazeinu).

Zaključak

Ispitivanje proteolitičke aktivnosti prirodnih izolata BMK humanog (oralnog) porekla, pokazalo je da izolati HO1, HO4, HO5, HO6, HO7, HO8, HO12 i HO13 imaju sposobnost hidrolize β -kazeina. S druge strane, antimikrobna aktivnost na senzitivnom soju *Lactobacillus casei* HN14 uočena je kod manjeg broja izolata laktobacila: HO2, HO3 i HO4. Odavde možemo doći do zaključka da je većina sojeva sposobna da egzistira u mleku, odnosno u bilo kojoj sredini koja sadrži α -kazein, ali da je jako mali broj onih sojeva koji su sposobni da lučenjem bakteriocina eliminišu srodne sojeve.

Prirodni izolat HO4 pokazao je istovremeno efikasnost u hidrolizi kazeina, kao i inhibitorno dejstvo na senzitivni soj *Lactobacillus casei* HN14, zbog čega bi od značaja bila njegova dalja karakterizacija. Prema svojim karakteristikama, mogao bi naći pri-

menu u konzervaciji hrane, kao zamena za današnje antibiotike ili u sastavu starter kultura za proizvodnju mlečnih fermentisanih proizvoda.

Zahvalnost. Posebnu zahvalnost pri izradi ovog rada dugujem dr Đorđu Firi (Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo), za pomoć pri organizaciji eksperimenta, kao i na obezbeđenim sojevima.

Literatura

Axelsson L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology. U *Lactic acid bacteria- microbiology and functional aspect, second edition* (ur. S. Salminen i A. von Wright). Food science and technology Marcel Dekker, III Series.

Cvetanović D. T. 2003. Biohemijska i genetička karakterizacija prirodnih izolata bakterija mlečne kiseline. Magistarski rad. Biološki fakultet. Univerzitet u Beogradu

de Vos W. M., Mulders J. W. M., Siezen R. J., Hugenholtz J., Kuipers O. P. 1993. Properties of nisin Z and distribution of its gene, nisZ, in *Lactococcus lactis*, *Am Soc Microbiol.*, **59**: 213.

Drider D., Fimland G., Hechard Y., McMullen L. P., Herve. P. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **70**(2): 564

Harris L. J., Daeschel M., Stiles M. E. Klaenhammer T. R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, **55**(11): 2802.

Hill S. H. A., Gasson M. J. 1986. A quality screening procedure for the detection of casein hydrolysis by bacteria, using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Review of Biochemistry*, **53**: 625.

Jack R. W., Tagg J. R., Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59

Kamaly K. M., Marth E. H. 1989. Enzyme activities of lactic streptococci and their role in maturation of cheese. *A review.*, **72**: 1945.

Kok J., de Vos W. M. 1994. The Proteolytic System of Lactic Acid Bacteria. U *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria* (ur. M. Gasson i W. M. de Vos). London: Blackie and Professional, str. 169-210.

Sharpe E. 1979. Identification of lactic acid bacteria. U *Identification methods for microbiologist, second edition*. (ur. B. A. Skinner et al.). London: Academic Press, str. 233-259.

Smid E. J., Poolman B., Konnings W. N. 1991. Casein utilization by lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 2447.

Tagg J. R., Dajani A. S., Wanamaker L. W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriology Review* **40**: 722

Tan P. S. T., Poolman B., Konnings W. N. 1993. Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Res.*, **60**: 269.

and HO19 (*Lactobacillus brevis*) were selected for this work.

For the bacteriocine test the diffusion method was used. The presence of an anti-microbial substance was detectable corresponding to the diameter of the growth inhibition zone around the well that contained the producer strain, a consequence of inhibition of growth of sensitive bacterial strain seeded on the medium. Results of the biosynthesis show that natural isolates of *Lactobacillus* HO2, HO3 and HO4 inhibit the growth of the sensitive strain *Lactobacillus casei*. The methods of Hill and Gason (1986) were used to test the proteolytic activity, and then the SDS-PAGE electrophoresis according to Laemli was applied to identify the proteolytic activities of the treated LAB. The results show that large numbers of tested isolates are proteolytically active, which means that their extracellular proteinases hydrolyse β -casein.

The HO4 (*Lactobacillus rhamnosus*) strain showed high efficiency in hydrolysing casein, as well as exerting an inhibitory effect on *L. casei* HN14. According to its characteristics it could be applied in the food industry, as a substitute antibiotic or as a starter culture for producing lactic acid products. Further investigation of this strain should be performed. Further characterisation of producer type bacteria would assume the determination of its antibacterial spectrum.



Ivana Petrović

Characterisation of Isolates of Natural Lactic Bacteria

Biosynthetic characteristics of bacteriocines from 19 selected strains of lactic acid bacteria (LAB) were tested, as well as their proteolytic capability to degrade proteins from milk. Types HO1, HO4, HO5, HO6, HO7, HO8, HO12 and HO13 (*Lactobacillus rhamnosus*), and HO2, HO3, HO9, HO10, HO11, HO14, HO15, HO16, HO17, HO18