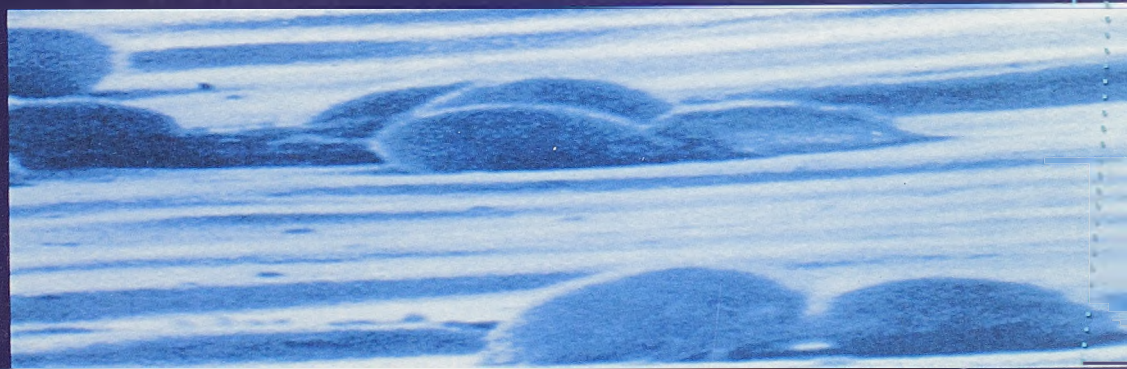


Ivana D. STRAHINIĆ

# Karakterizacija prirodnog izolata

*Lactobacillus sp.* BGRA43  
kao potencijalnog probiotika



doktorska disertacija

PA 18083

41-25691919

Karakterizacija prirodnog izolata  
*Lactobacillus* sp. BGRA43 kao  
potencijalnog probiotika

Ivana D. STRAHINIĆ

doktorska disertacija

MENTOR: dr Ljubiša Topisirović, redovni profesor,  
Biološki fakultet, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Ljubiša Topisirović, redovni profesor,  
Biološki fakultet, Beograd

dr Đorđe Fira, docent,  
Biološki fakultet, Beograd

dr Milan Kojić, naučni saradnik,  
Institut za molekularnu genetiku i  
genetičko inženjerstvo, Beograd

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_

DATUM PROMOCIJE: \_\_\_\_\_

DOKTORAT NAUKA: \_\_\_\_\_

*mojoj Nađi i mom Ivanu...*

*Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Ovom prilikom želim da se zahvalim:*

*prof. dr Ljubiši Topisiroviću, koji me je ovih deset godina vodio kroz zanimljiv i neistražen svet bakterija mlečne kiseline, na ukazanom poverenju, podršci i razumevanju, na brojnim korisnim diskusijama, savetima i sugestijama, koje su doprinele efikasnoj izradi ovog rada, kao i za kritičku ocenu ovog rada;*

*dr Đorđu Firi na nesebičnoj pomoći u toku eksperimentalne izrade ovog rada i stručnoj oceni ove disertacije;*

*dr Milanu Kojiću, za sve što sam naučila od prvog dana ulaska u ovu laboratoriju, za neizmerno strpljenje koje je pokazivao i nesebičnu pomoć na koju sam mogla uvek da računam, za pomoć u izradi ove disertacije kao i za njenu kritičku ocenu;*

*Ttk Nati, Ireni i Mikiju je teško ovim putem bilo šta reći osim hvala što ste oplemenili moj život svojim prisustvom;*

*Svaki radni dan bio je mnogo lepši, lakši i prijatniji i uz pomoć mojih kolega dr Gorana Jovanovića, dr Maje Vukašinović, Jelene Lozo, Ivane Tonić, Olge Momčilović i Branka Jovčića. Hvala i svim bivšim članovima naše laboratorije.*

*Veliku zahvalnost dugujem i Miri Mraović koja mi je omogućila da deo svojih eksperimenata uradim na Odseku za antibiogram, Instituta za imunologiju i virusologiju "Torlak".*

*Mami i tati najveće hvala na svetu za to što su još uvek tu svaki put kada mi zatrebaju.*

## ABSTRACT

Natural isolate BGRA43 was isolated from the human intestinal tract. Using the microbiology and molecular biology tests this thermophilic human isolate was determined as *Lactobacillus helveticus*. The strain BGRA43 was transformed with plasmid pA1-6, but efficiency of transformation was very low. It was found that BGRA43 contains only one small plasmid pRA1 about 2.4 kb. The strain BGRA43 grow very fast in milk (6h, pH 4.5) as well as in MRS ( $A_{600nm}$ , 0.858, 10h). Growth of *Lactobacillus helveticus* BGRA43 in non-fat skim milk after 6 h at 37°C resulted in a lowering of the pH value to 4.53. Besides the fast acidification, the strain generated a high viscosity of skim milk. The strain BGRA43 produced antagonistic substances against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and also exhibited an inhibitory effect on the growth of *Clostridium sporogenes*. Determination of caseinolytic activity done under optimal conditions (pH 6.5 and 45°C), revealed that proteinase from this strain completely hydrolysed all three casein fractions. The proteolytic activity of whole cells was inhibited by serine proteinase inhibitor (PMSF), suggesting that BGRA43 strain produce serine-type of proteinase. In addition, release of the proteinase from the cell envelope of strain BGRA43 is not  $Ca^{++}$ -dependent. DNA-DNA hybridisation, PCR analysis and analysis of subcloning PCR fragments from catalytic region of proteinase showed high similarity (98.9% identity) with *prtH* gene isolated from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. Spontaneous  $Prt^-$  derivative BGRA433 was isolated. This derivative is not able to hydrolyse any of casein fractions and hybridisation and PCR analysis showed deletion in catalytic region of proteinase gene. Human origin, antimicrobial activity and surviving at low pH and in presence of bile salts are all properties that consider this strain to be a potential probiotic. Finally, it was demonstrated that the strain BGRA43 can be very attractive as starter culture for production of fermented milk product.

Key words: human isolate, *Lactobacillus*, proteinase, probiotic, dairy products

## APSTRAKT

Prirodni izolat BGRA43, izolovan iz gastrointestinalnog trakta čoveka, determinisan je na osnovu klasičnih mikrobioloških i molekularno-bioloških metoda kao vrsta *Lactobacillus helveticus*. Soj poseduje jedan plazmid (pRA1), veličine 2.4 kb, koji se stabilno održava u ćeliji i nakon 10 sukcesivnih presejavanja. Za potrebe genetičkih manipulacija soj je uspešno transformisan plazmidom pA1-6, mada je efikasnost transformacije niska. Optimalna temperatura za rast ovog soja je 42°C, pri čemu je pokazano da soj dobro raste kako u MRS-u tako i u 10% obranom mleku. Nakon 6 sati rasta u 10% obranom mleku na temperaturi od 37°C dolazi do obaranja pH vrednosti u mleku na 4.53 pri čemu takodje dolazi do formiranja homogenog gruša visokog stepena viskoznosti. Soj BGRA43 pokazuje antimikrobijalnu aktivnost na veći broj Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Takodje je utvrđeno da soj BGRA43 poseduje ekstracelularnu proteinazu. Cele ćelije ovog soja hidrolizuju sve tri glavne kazeinske frakcije u Na-fosfatnom puferu pH 6.5 i temperaturi od 45°C za samo 2 h. Proteolitička aktivnost soja BGRA43 inhibirana je inhibitorom serinskih proteaza (PMSF). Oslobođanje proteinaze soja BGRA43 sa ćelijskog zida nije zavisno od Ca<sup>++</sup> jona. Na osnovu DNK-DNK hibridizacija, PCR analize kao i sekvenciranjem kloniranog PCR produkta koji odgovara katalitičkom regionu proteinaze utvrđen je visok stepen homologije sa *ptrH* genom iz soja *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. Izolovan je i okarakterisan spontani Prt<sup>-</sup> derivat soja BGRA43, označen kao BGRA433. Derivat BGRA433 nije hidrolizovao ni jednu kazeinsku frakciju i pokazano je da poseduje deleciju u katalitičkom regionu proteinaznog gena. Ćelije soja BGRA43 preživljavaju u visokom procentu u uslovima niske pH vrednosti kao i u prisustvu 0.3% žučnih soli. Humano poreklo, široki spektar antimikrobijalnog delovanja i sposobnost preživljavanja u uslovima koji vladaju u gastrointestinalnom traktu čine soj BGRA43 potencijalnim probiotikom. *Lactobacillus helveticus* BGRA43 je uspešno iskorišćen i kao starter kultura za proizvodnju jogurta i kiselog mleka.

Ključne reči: humani izolat, *Lactobacillus*, proteinaza, probiotici, fermentisani mlečni proizvodi

# SADRŽAJ

<b>I UVOD</b> .....	1
1. Bakterije iz roda <i>Lactobacillus</i> - opšte karakteristike .....	1
1. 1. Klasifikacija vrsta iz roda <i>Lactobacillus</i> .....	3
2. Industrijska primena laktobacila .....	7
2. 1. Laktobacili u proizvodnji sira i fermentisanih mlečnih proizvoda .....	7
2. 2. Laktobacili u proizvodnji ostalih fermentisanih proizvoda .....	8
3. Antimikrobijalne komponente i fenomeni inhibicije .....	10
3. 1. Organske kiseline .....	10
3. 2. Ugljen dioksid (CO <sub>2</sub> ).....	11
3. 3. Vodonik peroksid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	11
3. 4. Diacetil .....	12
3. 5. Antimikrobijalne supstance male molekulske mase .....	12
3. 6. Bakteriocini .....	13
3. 7. Adhezijska inhibicija.....	15
4. Proteolitička aktivnost bakterija mlečne kiseline .....	15
4. 1. Multidomenska struktura ekstracelularnih proteinaza laktobacila i njihova supstratna specifičnost.....	18
4. 1. 1. Proteinaza soja <i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32 .....	19
5. Probiotici - definicija.....	22
5. 1. Prisustvo mikroflore u živim organizmima - laktoflora.....	23
5. 2. Probiotici medju bakterijama iz roda <i>Lactobacillus</i> .....	25
 CILJ RADA .....	 30



<b>II MATERIJAL I METODE</b> .....	31
1. BAKTERIJSKI SOJEVI.....	31
2. KORIŠĆENI PLAZMIDI.....	32
3. MEDIJUMI ZA KULTIVISANJE BAKTERIJA .....	32
4. METODE IZOLOVANJA I DETERMINACIJE SOJA .....	33
5. METODE IZOLACIJE DNK.....	34
5. 1. Mini-metoda izolacije plazmida iz <i>E. coli</i> .....	34
5. 2. Prečišćavanje DNK fenolom (PCI procedura) .....	34
5. 3. Mini-metoda izolacije plazmida za sekvenciranje iz <i>E. coli</i> .....	35
5. 4. Mini-metoda izolacije plazmida iz laktobacila .....	36
5. 5. Mini-metoda izolacije velikih plazmida iz laktobacila .....	36
5. 6. Izolacija velikih količina DNK iz laktobacila .....	37
5. 7. Brza izolacija ukupne DNK .....	38
5. 8. Prečišćavanje DNK u gradijentu CsCl .....	39
6. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK .....	39
6. 1. Sečenje DNK restrikcionim enzimima.....	39
6. 2. Ligacija DNK fragmenata .....	40
6. 3. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom ("Polymerase chain Reaction") .....	40
7. ELEKTROFOREZA DNK.....	41
7. 1. Horizontalna elektroforeza DNK .....	41
8. ELUCIJA DNK FRAGMENTATA .....	42
8. 1. Elucija DNK fragmenata iz agaroze niske tačke topljenja.....	42
9. "SOUTHERN" HIBRIDIZACIJA.....	43
9. 1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane .....	43
9. 2. Obeležavanje DNK metodom "Nick-Translacije" .....	44
9. 3. Hibridizacija DNK.....	44

10. TRANSFORMACIJA ĆELIJA SA DNK .....	45
10. 1. Transformacija <i>E. coli</i> elektroporacijom.....	45
10. 2. Transformacija laktibacila elektroporacijom.....	45
11. SEKVENCIRANJE DVOLANČANE DNK .....	46
11. 1. Denaturisanje plazmidne DNK .....	46
11. 1. 1. Vezivanje matrice i prajmera i reakcije sekvenciranja.....	47
11. 2. Sekvenciranje DNK na "ALF-express" .....	47
11. 2. 1. Reakcije sekvenciranja pomoću Cy5-obeležene prajmera....	48
12. ISPITIVANJE PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI .....	48
12. 1. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti celih ćelija prirodnog izolata .....	48
12. 2. Dobijanje aktivnog proteinaznog ekstrakta.....	50
12. 2. 1. Ispitivanje aktivnosti proteinaznih ekstrakata .....	50
12. 3. Elektroforeza na SDS - poliakrilamidnom gelu .....	51
13. ANTIMIKROBIJALNI ESEJI .....	52
14. ISPITIVANJE PROBIOTIČKIH SVOJSTAVA .....	53
14. 1. Preživljavanje u uslovima niske pH vrednosti .....	53
14. 2. Preživljavanje u prisustvu različitih koncentracija žučnih soli .....	53
<b>III REZULTATI .....</b>	<b>54</b>
1. Izolacija, karakterizacija i identifikacija prirodnog izolata BGRA43 .....	54
1. 1. Utvrđivanje optimalne temperature rasta .....	58
2. Antimikrobijalno delovanje soja BGRA43 .....	59
3. Transformacija soja BGRA43 .....	62
4. Proteolitička aktivnost soja BGRA43 .....	63
4. 1. Utvrđivanje proteolitičke aktivnosti.....	63
4. 2. Utvrđivanje supstratne specifičnosti .....	64

4. 3. Utvrđivanje optimalne pH vrednosti i temperature za delovanja proteinaze.....	65
4. 4. Aktivnost proteinaznog ekstrakta .....	67
4. 5. Analiza BGRA433 - derivata soja BGRA43.....	69
4. 6. Utvrđivanje homologije proteinaznog gena PCR metodom .....	70
5. Preživljavanje soja BGRA43 u uslovima niske pH vrednosti i u prisustvu žučnih soli.....	74
6. Primena soja BGRA43 kao starter kulture u proizvodnji jogurta i kiselog mleka.....	76
<b>IV DISKUSIJA .....</b>	<b>79</b>
<b>V ZAKLJUČCI.....</b>	<b>87</b>
<b>VI LITERATURA .....</b>	<b>89</b>

## I UVOD

### 1. Bakterije iz roda *Lactobacillus* - opšte karakteristike

Rod *Lactobacillus* po svojim mikrobiološkim, biohemijskim i molekularno-genetičkim karakteristikama, zajedno sa rodovima *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc* pripada grupi bakterija mlečne kiseline (BMK). Laktobacili su Gram-pozitivne, nesporogene bakterije, manje ili više izduženih ćelija, često povezanih u lance. Najveći broj vrsta ovog roda raste u mikroaerofilnim uslovima (samo donekle tolerišu prisustvo kiseonika), mada postoje i vrste koje ne mogu da formiraju kolonije na čvrstim podlogama pod aerobnim uslovima. Najbolji rast ove bakterije postižu pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 8 do 10%. Različite vrste laktobacila se razlikuju po sposobnosti fermentacije ugljenih hidrata. Prilikom fermentacije šećera daju mlečnu kiselinu kao glavni krajnji proizvod (kod homofermentativnih vrsta u anaerobnim uslovima, sa glukozom u višku, formira se najmanje jedan mol mlečne kiseline iz jednog mola heksoze). Kod heterofermentativnih vrsta laktobacila pored mlečne kiseline kao proizvodi fermentacije javljaju se i acetat, etanol, CO<sub>2</sub>, mravlja kiselina ili sukcinat (Sharpe, 1979). Laktobacili su visoko specijalizovani organizmi adaptirani na kompleksan organski supstrat. Imaju relativno jednostavan metabolizam i visoke zahteve za nutritivnim komponentama u medijumima za rast. Pored ugljenih hidrata, kao glavnih izvora atoma ugljenika i energije, za rast su im neophodne i različite aminokiseline, vitamini, nukleinske kiseline i mineralne materije (Konings, 2002). Njihovo prirodno životno stanište usko je povezano sa biljnim, mesnim i mlečnim proizvodima. Kompletan gastrointestinalni trakt životinja i čoveka, od prvog dana rođenja, takodje je kolonizovan bakterijama iz roda *Lactobacillus*. Optimalna temperatura za rast najvećeg broja laktobacila je između 30°C i 40°C. Mali broj vrsta



raste na temperaturama ispod 15°C, a neki čak i na temperaturama nižim od 5°C. Termofilni laktobacili rastu na temperaturama do 55°C i to je ujedno i najviša temperatura na kojoj je utvrđen rast ove grupe bakterija. Optimalna pH vrednost za njihov rast se kreće od 5.5 do 6.2 iako pojedine vrste dobro rastu i kada pH sredine padne ispod 4. Generalno gledano, genomi laktobacila spadaju u grupu G+C siromašnih, a sastav njihove DNK varira od 33-53 mol% G+C (Woese, 1987). *Lactobacillus gasseri* je tipični predstavnik laktobacila sa veoma niskim G+C sadržajem (33-35%), *Lactobacillus delbrueckii* ima 49% G+C, dok se soj *Lactobacillus sharpeae* nalazi na drugoj strani lestvice i njegov G+C sastav iznosi 53% (Venema *et al.*, 1996). Veličina genoma takodje varira, od 1.8 Mb kod *Lactobacillus gasseri* ATCC33323, do 3.3 Mb kod soja *Lactobacillus plantarum* WSFS1, što je u korelaciji sa njihovim relativno jednostavnim metaboličkim kapacitetima. Do danas su kompletno sekvencirani genomi sojeva *Lactobacillus plantarum* WSFS1, *Lactobacillus johnsonii* NCC533 i *Lactobacillus acidophilus* ATCC700396, a do kraja 2003. godine u planu je da se završe sekvence još 13 genoma atraktivnih laktobacila (Altermann *et al.*, 1999, Klaenhammer *et al.*, 2002, Russell and Klaenhammer, 2001). Pored hromozomalne DNK neki laktobacili poseduju i plazmide. Broj plazmida koji može koegzistirati u jednoj bakteriji kreće se i do deset različitih plazmida po ćeliji, a veličina do sada okarakterisanih je od jedne pa do preko 100 kilobaza - neki linearni plazmidi (Roussel *et al.*, 1993). Većina plazmida je kriptična, ali u nekim slučajevima na plazmidima se mogu naći geni koji kodiraju sekvence za veoma važne fenotipske karakteristike: proizvodnju i rezistenciju na bakteriocine, metabolizam prostih ugljenih hidrata, metabolizam proteina, sintezu egzopolisaharida itd. Najčešće prisutni geni na plazmidima su oni koji obezbeđuju njihov transfer iz jedne ćelije u drugu mehanizmom konjugacije (Clewel, 1994). U vezi sa ovim fenomenom, kod nekih laktobacila razvijen je sistem agregacije koji umnogome olakšava komunikaciju između ćelija.

Iako ih je čovek koristio vekovima unazad, poslednjih 30-tak godina laktobacili doživljavaju renesansu zahvaljujući sve većoj praktičnoj primeni u agroindustriji, u procesima fermentacije mlečnih proizvoda, mesa, povrća i žitarica kao i u bioprezervaciji, bilo da se koriste kao prirodna mikroflora, ili da se koriste njihovi antibakterijski produkti. Takođe, laktobacili se sve više koriste u medicini; u imunoterapijama, u stabilizaciji ili kolonizaciji intestinalne mikroflore kod akutnih diarea ili u slučajevima oštećenja mukoznog tkiva creva, a u poslednje vreme i kao alternativa u medicinskim dijetama kao i posle radioterapija (Mayra-Makinen and Bigret, 1998; Dunne *et al.*, 1999; Prescott *et al.*, 1999).

### **1. 1. Klasifikacija vrsta iz roda *Lactobacillus***

Klasični načini klasifikovanja vrsta unutar roda *Lactobacillus* obuhvataju: sposobnost fermentacije različitih ugljenih hidrata, sposobnost produkcije mlečne kiseline, hidrolizu arginina, sposobnost rasta na odredjenim temperaturama kao i zahtevi za specifičnim komponentama neophodnim za njihov rast. Pored ovih karakteristika, klasifikovanje vrsta unutar jednog roda, danas zahteva i specifičnu analizu peptidoglikana, elektroforetsku pokretljivost laktat dehidrogenaze (LDH), G+C sastav njihove DNK kao i stepen homologije na nivou DNK (Axelsson *et al.*, 1989).

Identifikacija laktobacila na osnovu ćelijske morfologije, analize produkata fermentacije, enzimske aktivnosti, strukture ćelijskog zida i drugi fenotipski testovi danas se koriste samo kao dobra polazna osnova pri preliminarnoj klasifikaciji rodova laktobacila. Analiza nukleotidne sekvence obezbedjuje osnovu za brzu i tačnu identifikaciju mikroorganizama, pri čemu reproducibilnost dobijenih rezultata ne varira od uslova u kojima se eksperimenti izvode, kao i od fiziološkog stanja bakterija koje se determinišu. Molekularne metode za determinaciju bakterija, takođe i laktobacila, mogu se podeliti u tri grupe: DNK-DNK hibridizacija - koja se zasniva na korišćenju manje ili više specifičnih oligonukleotidnih proba (Dot-hibridizacija); PCR

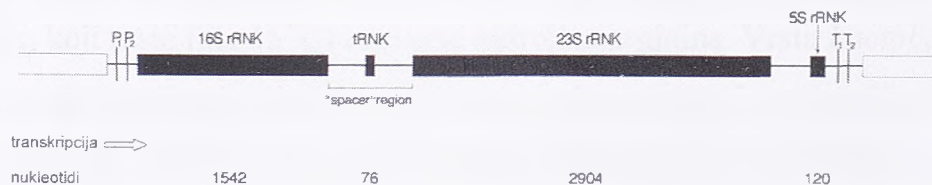
metode, zasnovane na primeni oligonukleotida specifičnih za određeni rod, vrstu i podvrstu (RAPD - Randomly Amplified Polimorfic DNA, ARDRA-Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis). Treća metoda podrazumeva sečenje hromozomalne DNK pomoću restrikcioničkih enzima i razdvajanje tako dobijenih fragmenata na PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis), zatim sledi RLFP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analiza i kasnija hibridizacija uz pomoć specifičnih rRNK proba ("ribotyping") (O'Sullivan, 1999; Johansson *et al.*, 1995).

Početakom devedesetih godina dvadesetog veka ustanovljena je DNK hibridizacija kao prva molekularna metoda za determinaciju različitih bakterijskih vrsta. U te svrhe sintetisan je niz oligonukleotidnih proba za detekciju vrsta roda *Lactobacillus*; npr. za *Lactobacillus delbrueckii* pY85, za *Lactobacillus helveticus* SLh, itd. (Delley *et al.*, 1990; Pillound and Mollet, 1990). Jedan od glavnih nedostataka ove metode je količina hromozomalne DNK neophodne za hibridizaciju (pozitivan signal u hibridizaciji može se dobiti sa minimum 50 ng hromozomalne DNK), kao i nemogućnost razlikovanja podvrsta, kao u slučaju hibridizacione probe za *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus pentosus* (Hertel *et al.*, 1993; Heinsiek *et al.*, 1992).

Raspored DNK fragmenata na gelu nakon *in situ* digestije i PFGE takodje donekle omogućava razgraničavanje pojedinih vrsta i podvrsta. Ova metoda posebno je pogodna za uočavanje polimorfizma i nekih strukturnih promena kao što su delecije, insercije ili inverzije unutar DNK određene vrste, a koje u okviru iste mogu nastati usled specifične adaptacije na promene uslova sredine.

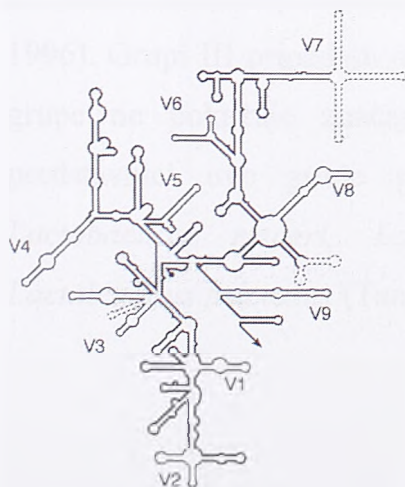
U poslednjih nekoliko godina nukleotidna sekvenca gena za rRNK se najčešće koristi u determinaciji vrsta i sojeva bakterija. Naime, analizom genoma različitih bakterija utvrđeno je da nukleotidne sekvence gena za 16S i 23S rRNK kao i DNK sekvence između njih (IGS - Inter Genetic Spacer) poseduju visoko konzervirane regione koji su tipični za predstavnike pojedinih vrsta i podvrsta. Ovi regioni su poslužili za dizajniranje prajmera specifičnih za determinaciju tih vrsta. Nakon

umnožavanja DNK iz konzerviranih sekvenci, produkti ampifikacije (PCR) se restrikciono obraduju ili sekvenciraju, a zatim sekvence upoređuju sa sekvencama referentnih sojeva (Klijn *et al.*, 1991; Tannock *et al.*, 1999). Pored gena za rRNK i neki drugi visoko konzervirani regioni kao što su REP (Repetitive Extragenic Palindromic) sekvence, ERIC (Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus) sekvence ili BOX elementi mogu se umnožiti uz pomoć dizajniranih prajmera karakterističnih za svaku vrstu i koristiti za determinaciju. Upoređivanjem produkata dobijenih nakon RAPD-PCR-a sa produktima dobijenim za referentne sojeve utvrđuje se stepen sličnosti sojeva ali i njihov polimorfizam (Welsch and McClelland, 1990). Kombinacijom nekoliko gore navedenih metoda može se izvršiti vrlo precizna determinacija do nivoa vrste, podvrste, biovarijeteta pa čak i soja. Zahvaljujući pomenutim metodama izvršena je reklasifikacija postojeće nomenklature u okviru roda *Lactobacillus*, a otkrivene su i nove vrste i podvrste laktobacila.



Slika 1. Šematski prikaz rRNK operona kod bakterija.

P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>-promotori; T<sub>1</sub>T<sub>2</sub>-terminatori (Gurtler and Stanisich, 1996).



Slika 2. Model sekundarne strukture prokariotske 16S rRNK. Regioni sa najvarijabilnijim regionima su obeleženi od V1 do V9 (Neefs *et al.*, 1993).



U grupi BMK rod *Lactobacillus* je predstavljen sa najvećim brojem vrsta. Svi laktobacili su svrstani u tri velike grupe koje zajedno obuhvataju 54 vrste kao i nekoliko podvrsta (O'Sullivan, 1998; Tannock, 1999). Grupa I obuhvata obligatno homofermentativne predstavnike. Vrste u ovoj grupi su uglavnom termofilne i većina daje negativnu reakciju hidrolize arginina. Značajne promene u klasifikaciji nakon uvođenja molekularnih metoda predstavlja svrstavanje *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* i *Lactobacillus delbrueckii* u podvrste vrste *Lactobacillus delbrueckii* usled izrazite genotipske sličnosti ustanovljene nakon DNK-DNK hibridizacije. Ovoj grupi danas pripada i šest novih vrsta proisteklih iz genetičkih istraživanja različitih sojeva *Lactobacillus acidophilus* i to: A1 - *Lactobacillus acidophilus*, A2 - *Lactobacillus crispatus*, A3 - *Lactobacillus amilovorius*, A4 - *Lactobacillus gaillinarum*, B1 - *Lactobacillus gasseri* i B2 *Lactobacillus jonsonii* (Ray, 1996). Grupu II čine fakultativno heterofermentativni laktobacili. Skoro sve vrste ove grupe su mezofilne i rastu na 15°C (osim *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, koji raste i na 45 °C) i ne vrše hidrolizu arginina. Vrsta *Lactobacillus casei* je podeljena na 4 podvrste: *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum*, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, i *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*. Najnovija istraživanja u koja su bili uključeni RAPD analize kao i sekvence rRNK reklasifikovala su tipski soj *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ATCC15820 u vrstu *Lactobacillus zae* (Dicks *et al.*, 1996), kao i uvođenje nove vrste *Lactobacillus paraplantarum*, srodne vrsti *Lactobacillus plantarum* (Curk *et al.*, 1996). Grupi III pripadaju obligatno heterofermentativni laktobacili. Većina vrsta ove grupe ne pokazuje značajnu medjusobnu homologiju na nivou DNK. Tipični predstavnici ove grupe po najnovijoj nomenklaturi su: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri* i *Lactobacillus fructosus* (Tannock, 1999).

## 2. Industrijska primena laktobacila

### 2. 1. Laktobacili u proizvodnji sira i fermentisanih mlečnih proizvoda

BMK, a među njima i veliki broj vrsta iz roda *Lactobacillus*, zauzimaju ključno mesto u proizvodnji sira i fermentisanih mlečnih proizvoda (pojedinačno ili u kombinaciji sa drugim bakterijskim vrstama, plesnima i kvascima). Uz pomoć ovih bakterija od mleka se može dobiti preko 1000 različitih proizvoda koji se razlikuju po svojoj konzistenciji, specifičnom mirisu i teksturi (Lücke and Ray, 1996). Sir, jedan od najstarijih mlečnih proizvoda, proizvodio se i konzumirao u Aziji nekoliko hiljada godina pre nove ere. Bogatstvo autohtone prerade mleka zadržalo se do današnjih dana tako da se danas u Evropi preko 50% ukupne količine mleka preradjuje u kiselo mlečne proizvode, kremove, maslac ili sir (Varnam and Sutherland, 1994). Uloga laktobacila u formiranju finalnih proizvoda je višestruka. U toku fermentacije šećera dolazi do sinteze mlečne kiseline i drugih produkata koji snižavaju pH proizvoda što dovodi do redukcije ili potpune obustave rasta nepoželjne mikroflore. Takođe, ovaj fenomen se postiže i zahvaljujući sposobnosti sinteze drugih inhibitornih supstanci ili bakteriocina od strane laktobacila. Usled hidrolize proteina mleka dolazi do formiranja specifične teksture i donekle ukusa finalnog proizvoda. Finalna aroma proizvoda umnogome zavisi od sekundarnih metabolita koje produkuju laktobacili dok je konzistencija proizvoda direktno povezana sa sposobnošću sinteze egzopolisaharida.

U Tabeli 1 dat je prikaz nekih od najvažnijih vrsta laktobacila koje se koriste u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda.



Tabela 1. Laktobacili koji se koriste u fermentaciji mlečnih proizvoda (Mayra-Makinen and Bigret, 1998).

Bakterija	Tip proizvoda	Relevantne karakteristike
<b>Termofilne homofermentativne vrste</b>		
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	jogurt, švajcarski i italijanski sirevi, bugarski puter, kiseli mlečni napici, kumis	produkcija acetaldehida iz piruvata
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	acidofilno mleko, krem sirevi, razni kiseli napitci, miru-miru, kefir, kumis	terapeutska primena
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>		
<i>Lb. acidophilus</i>		
<i>Lb. helveticus</i>		
<i>Lb. helveticus</i> subsp. <i>juguri</i>		
<i>Lb. fermentum</i>		
<b>Mezofilne heterofermentativne vrste</b>		
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	Yakult, razne vrste jogurta, miru-miru, kefir	produkcija diacetila iz citrata, etanola i CO <sub>2</sub> iz laktoze
<i>Lb. rhamnosus</i>		
<i>Lb. tholerans</i>		
<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Lb. brevis</i>		
<i>Lb. kefir</i>		

## 2. 2. Laktobacili u proizvodnji ostalih fermentisanih proizvoda

Osim u fermentisanim mlečnim proizvodima vrste roda *Lactoacillus* mogu se naći (kao starteri ili kao "nestererska" populacija) i u fermentisanim mesnim proizvodima, a prisutni su kao predominantni organizmi i u fermentisanom povrću i proizvodima od žitarica (ceralijama). Princip rasta bakterija mlečne kiseline u mleku, mesnim preradjevinama, povrću ili ceralijama se zasniva na nekoliko jednostavnih principa. Nakon uspostavljanja pogodnih fizičkih uslova za rast (optimalna temperatura, pH i dr.) dolazi do rasta i kompeticije različitih mikroorganizama, prisutnih u nekoliko niša. Brži razvoj BMK i opadanje pH, do koga dolazi usled brze

produkcije kiseline, izdvaja ih u predominantnu vrstu i dovodi do formiranja stabilnog fermentisanog produkta (Mayra-Makinen and Bigret, 1998).

U preradjevinama od mesa (razne vrste kobasica i šunki), pored *Staphylococcus carnosus* i nekih vrsta iz roda *Leuconostoc*, kao starteri iz roda *Lactobacillus* koriste se heterofermentativne mezofilne vrste: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus divergens* i *Lactobacillus pentosus* kao i psihrofilne vrste: *Lactobacillus sake* i *Lactobacillus curvatus* (Hammes *et al.*, 1990). Pored aktivnog učešća u procesima fermentacije laktobacili igraju ulogu i u bioprezervaciji mesnih preradjevina. Poslednjih decenija planski se kao starteri u proizvodnji dodaju sojevi koji produkuju bakteriocine koji deluju protiv *Listeria monocytogenes* i drugih Gram-negativnih bakterija, kontaminenata mesnih preradjevina.

U procesu fermentacije različitog povrća *Leuconostoc mesenteroides* najčešće nastupa prvi. Sa smanjenjem slobodnog kiseonika, povećanjem kiselosti i povećanjem koncentracije CO<sub>2</sub> kao i količine manitola (koji se dobija iz fruktoze), formiraju se pogodni uslovi za razvoj laktobacila koji su esencijalni za završavanje fermentacionih procesa i dobijanje finalnih fermentisanih proizvoda. U ukišljenom povrću (kupus, krastavac, masline) dominantna je vrsta *Lactobacillus plantarum*, mada se mogu naći i drugi heterofermentativni laktobacili - *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus curvatus* i *Lactobacillus brevis* (Marshall, 1987).

Razne vrste kiselog testa takodje sadrže znatan broj različitih laktobacila koji zajedno sa kvascima vrše njegovu fermentaciju. RAPD PCR-om je utvrđeno da se u fermentisanom testu mogu naći: *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus amilovorius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus acidophilus* (Ganzle *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1999).

### 3. Antimikrobijalne komponente i fenomeni inhibicije

Sposobnost BMK da proizvode antimikrobijalne supstance vekovima se koristi u konzervaciji hrane. U procesu fermentacije dolazi do redukcije raspoloživih ugljenih hidrata do organskih jedinjenja manjih molekularnih masa, koji pokazuju značajnu antimikrobijalnu sposobnost, u prvom redu mlečne, sirćetne i propionske kiseline. Pored produkcije primarnih metabolita BMK proizvode i niz drugih neorganskih jedinjenja i sekundarnih metabolita koja imaju antimikrobijalno dejstvo.

#### 3. 1. Organske kiseline

Tokom fermentacije heksoza, homofermentativne vrste laktobacila proizvode kao finalni proizvod mlečnu kiselinu. Kod heterofermentativnih vrsta, krajnji produkti fermentacije, pored mlečne kiseline su i sirćetna kiselina, etanol i ugljen dioksid. Mlečna i sirćetna kiselina imaju jače antimikrobno dejstvo na niskim pH vrednostima, u odnosu na neutralnu sredinu. Utvrđeno je da je na pH 4 - 4.6 sirćetna kiselina jači inhibitor od mlečne kiseline i da ima širi opseg inhibitornog delovanja na bakterije, kvasce i plesni, što se može objasniti nižim stepenom disocijacije. Pri navedenim pH vrednostima 11% mlečne kiseline je nedisosovano, dok je pri istim uslovima sirćetna kiselina nedisosovana 85% (Ouweland, 1998). Takođe je utvrđeno da, u kombinaciji mlečna i sirćetna kiselina redukuju rast nekih sojeva iz roda *Salmonella* više od 10 puta ukoliko se koriste zajedno što jasno ukazuje na njihovo sinergističko delovanje (Rubin, 1978). Nedisosovane forme organskih kiselina lako su propustljive za ćelijsku membranu, pošto su rastvorljive u mastima, a nakon ulaska u citoplazmu dolazi do njihove brze disocijacije, usled gotovo neutralne pH sredine koja je u njoj. Po najnovijoj teoriji akumulacija anjona unutar citoplazme dovodi do smanjene sinteze makromolekula kao i da poremećenog transporta kroz ćelijsku membranu što dovodi

do inhibicije rasta senzitivnih bakterija. BMK efekat akumulacije anjona rešavaju blagovremenim smanjenjem pH u sopstvenoj citoplazmi (Russell, 1992).

### 3. 2. Ugljen dioksid (CO<sub>2</sub>)

Ugljen dioksid se formira tokom heterofermentativnog iskorišćavanja heksoza, ali i drugi metabolički putevi dovode do formiranja CO<sub>2</sub> tokom fermentacije. On ima dvostruki antimikrobijalni efekat. U prvom slučaju dolazi do povećanja parcijalnog pritiska CO<sub>2</sub> i stvaranja anaerobnih uslova koji ne pogoduju rastu, ili su toksični za aerobne mikroorganizme, dok u drugom slučaju on sam ima antimikrobijalno dejstvo. Iako se ne zna tačan mehanizam delovanja, utvrđeno je da CO<sub>2</sub> u povišenim koncentracijama inhibira procese dekarboksilacije kao i da dovodi do promena u propustljivosti lipidnog dvosloja u membrani (Lindren and Dobrogosz, 1990; Ouwehand, 1998).

### 3. 3. Vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

U prisustvu kiseonika BMK su sposobne da produkuju vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i to uz pomoć flavinskih oksidaza, NADH peroksidaza ili superoksid dismutaza. BMK ne produkuju katalaze, osim u prisustvu gvoždja, tako da vodonik peroksid eliminišu mnogo lakše od drugih sistema koji ga sintetišu. Baktericidni efekat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se pripisuje njegovom snažnom oksidujućem delovanju na površinu bakterijske ćelije, kako membranskih proteina tako i na membranske lipide (Kamau *et al.*, 1990). Antimikrobijalni efekat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se ogleda i u blokiranju glikolize. Vodonik peroksid inhibira transport glukoze, heksokinaznu aktivnost kao i aktivnost gliceraldehid-3-



fosfat-dehidrogenaze tako što vrši oksidaciju sulfhidrilnih grupa navedenih metaboličkih enzima (Lindren and Dobrogosz, 1990; Ouwehand, 1998).

### 3. 4. Diacetil

Diacetil je jedna od aromogenih komponenti koja se javlja kao krajnji produkt metabolizma citrata kod pojedinih sojeva iz rodova *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*. Utvrđeno je da diacetil interferira sa arginin vezujućim proteinima Gram-negativnih bakterija tako što onemogućava iskorišćenje arginina. Veći antimikrobijalni efekat pokazuje na pH vrednostima manjim od 7, a njegovo delovanje zavisi i od prisustva glukoze, acetata i Tween 80. Pored nekih Gram-negativnih bakterija, diacetil deluje i na kvasce i plesni, a najmanju senzitivnost na njega pokazuju upravo Gram-pozitivne bakterije (Jay, 1982; Ouwehand, 1998).

### 3. 5. Antimikrobijalne supstance male molekulske mase

Ovu klasu antimikrobijalnih jedinjenja čine supstance koje imaju nekoliko zajedničkih karakteristika i to su: aktivnost na niskim pH vrednostima, termostabilnost, širok spektar delovanja i rastvorljivost u acetonu (Ouwehand, 1998). Iako je ovaj fenomen poznat, u literaturi su do sada dobro opisana samo dva jedinjenja - rojterin i piroglutaminska kiselina. Tokom anaerobnog metabolizma glicerola soj *Lactobacillus reuteri* LTH2584 produkuje 3-hidroksipropanal (rojterin). Utvrđeno je da se rojterin ne sintetiše tokom logaritamske faze i da njegova sinteza počinje u ranoj stacionarnoj fazi, a maksimalna produkcija i akumulacija su utvrđene kada se *Lactobacillus reuteri* gaji u prisustvu nekog drugog soja (Talarico and Dobrogosz, 1989; Ganzle *et al.*, 2000). Rojterin pokazuje vrlo širok spektar delovanja na druge Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, gljive, protozoe i neke viruse. Širok spektar

antimikrobijalne aktivnosti objašnjava se negovim delovanjem na enzim ribonukleotid reduktazu čime direktno utiče na sintezu DNK (Axelsson *et al.*, 1989). Piroglutaminska kiselina je nadjena u sojevima *Lactobacillus casei* subsp. *casei* i *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum*. Poznato je da piroglutaminska kiselina inhibira rast sojeva *Bacillus subtilis*, *Enterobacter colaceae* i *Pseudomonas putida*, dok mehanizam njenog delovanja nije poznat (Huttunen *et al.*, 1995) .

### 3. 6. Bakteriocini

Bakteriocini ili antibakterijski peptidi su, po definiciji supstance proteinske prirode sa baktericidnom ili bakteriostatskom aktivnošću koja je ograničena na blisko srodne vrste i prema kojima soj proizvodjač ima specifične mehanizme samozaštite (Tagg *et al.*, 1976; Jack *et al.*, 1995). Do danas su izdvojene četiri klase bakteriocina (Klaenhammer, 1993).

Klasu I bakteriocina čine lantibiotici - mali, membranski aktivni peptidi čija veličina ne prelazi 5 kD. Najpoznatiji i najbolje proučen bakteriocin iz ove klase je nizin (Kozak *et al.*, 1974). Nizin je termostabilni, hidrofobni peptid veličine 3.5 kD koji često obrazuje dimere i oligomere od 7-14kD (van der Mer *et al.*, 1993). Citoplazmatična membrana je primarni target ovog lantibiotika. U membrani, usled inkorporacije molekula nizina, dolazi do formiranja pora što u finalnom dovodi do narušavanja membranskog potencijala i izlaska intracelularnih jona i malih molekula (van Kraaij *et al.*, 1998; Breukink *et al.*, 1998). Nizin ima širok spektar delovanja prvenstveno na Gram-pozitivne bakterije iz rodova *Lactococcus* i *Lactobacillus*, ali i na vrste rodova *Staphylococcus*, *Bacillus* i *Clostridium*. Pored nizina u ovu klasu lantibiotika spada i Laktocin S, koga proizvodi soj *Lactobacillus sake* L45 (Mortved and Nes 1990; Mortved *et al.*, 1991), lakticin 481 (Piard *et al.*, 1993), salivaricin (Ross *et al.*, 1993) i dr.



Klasu II bakteriocina čine mali, termostabilni, membranski aktivni peptidi čija veličina ne prelazi 10 kD. Kao i lantibiotici, bakteriocini ove klase deluju na citoplazmatičnu membranu, ali za razliku od njih za svoje delovanje zahtevaju prisustvo specifičnih proteinskih receptora. Dobro proučeni bakteriocini ove klase medju predstavnicima roda *Lactobacillus* su: sakacin P iz soja *Lactobacillus sake* LB674 (Huehne *et al.*, 1996), sakacin A iz soja *Lactobacillus sake* Lb706 (Holck *et al.*, 1992), bavaricin A iz soja *Lactobacillus bavaricus* MI401 (Larsen and Norrung, 1993), kurvacin A iz soja *Lactobacillus curvatus* (Tichaczek *et al.*, 1992) i acidocin A iz soja *Lactobacillus acidophilus* (Kanatani *et al.*, 1995).

Klasu III čine veliki, termolabilni proteini. Molekulske mase ovih bakteriocina prelaze 30 kD, a spektar antimikrobijalne aktivnosti je sveden na jako mali broj srodnih vrsta. Mehanizmi delovanja i imunost ovih bakteriocina su za sada popuno nepoznati. Karakteristično je da su predstavnici ove klase izolovani isključivo iz roda *Lactobacillus*.

Klasa IV je sastavljena od kompleksnih bakteriocinskih molekula, koji pored proteinskog dela sadrže i neproteinske komponente, lipide ili ugljene hidrate (Gasson and Dodd, 1994).

Neki bakteriocini su već našli praktičnu primenu u prehrambenoj industriji, kao konzervansi, bilo da se dodaju prečišćeni (korišćenje nizina je do sada prihvaćeno u preko 50 zemalja sveta), bilo da se produkuju *in situ*, u slučaju kada ih sintetišu bakterije koje se koriste kao starter kulture. Poslednjih godina posebno interesovanje postoji za kontrolisanom *in vivo* produkcijom bakteriocina u gastrointestinalnom traktu čoveka i životinja, od strane probiotičkih sojeva.

### 3. 7. Adhezijska inhibicija

Sposobnost adhezije za određenu površinu je važno svojstvo koje neke bakterije poseduju. Ovo svojstvo bakterijama omogućava kolonizaciju određenog staništa kao i održavanje u njemu na duži vremenski period. Gastrointestinalni (GI) i urogenitalni (UGI) trakt naseljava preko petstotina različitih vrsta bakterija. Utvrđeno je da laktobacili i bifidobakterije poseduju sposobnost da onemoguće adheziju i invaziju mnogih entero- i uropatogena. Studije pokazuju da su cele ćelije, kao i delovi ćelija laktobacila odgovorni za adhezijsku inhibiciju. Iako se ne zna tačan mehanizam inhibicije utvrđeno je da na neki način deluju na lipoteihoičnu kiselinu odgovornu za adheziju za ćelije. Pokazano je da *Lactobacillus fermentum* 104r oslobadja jedinjenja velike molekulske mase (sastavljena od glukoze, N-acetilglukozamina i galaktoze), koja redukuju sposobnost adhezije uropatogene *E. coli* za najmanje 50%. Pretpostavljeni model u ovom slučaju podrazumeva specifično vezivanje za glikoproteine mukusa i blokiranje receptornih mesta za adheziju (Ouweland and Conway, 1996).

### 4. Proteolitička aktivnost bakterija mlečne kiseline

Kao što je ranije navedeno, veliki broj laktobacila nalazi praktičnu primenu u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda, na prvom mestu u dobijanju fermentisanih mlečnih proizvoda. Laktobacili su višestruki aminokiselinski auktotrofi, a mleko sadrži malu količinu slobodnih aminokiselina i oligopeptida. Za adekvatnu primenu laktobacila u tehnološkim procesima proizvodnje, od primarnog je značaja postojanje efikasnog proteolitičkog sistema koji će im omogućiti iskorišćavanje proteina, na prvom mestu kazeina koji čini 80% ukupnih proteina mleka. Komponente

proteolitičkog sistema bakterija mogu da se podele u nekoliko grupa na osnovu njihove funkcije:

- ekstracelularne proteinaze, koje vrše početnu degradaciju proteina do oligopeptida.

- transportni sistem, čijim se posredstvom produkti degradacije unose u ćeliju,

- intracelularne peptidaze, uz pomoć kojih se vrši degradacija oligopeptida do aminokiselina,

- grupa različitih enzima, koji prevode aminokiseline do jedinjenja koja će kao krajnji produkt dati specifični miris i aromu određenom proizvodu.

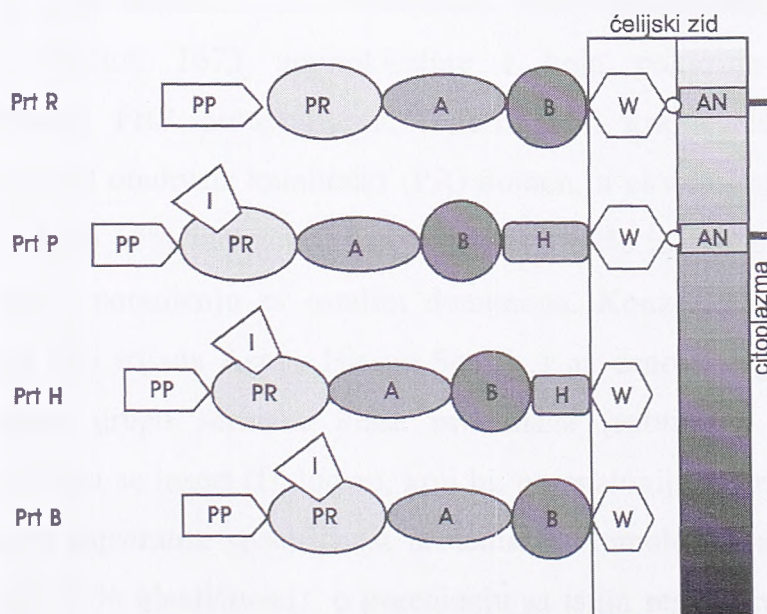
Proizvodnja jedinstvenih oligo, di i tripeptida kao i proizvodnja mlečne kiseline iz šećera primarni su faktori koji određene sojeve izdvajaju kao odabrane komponente starter kultura za industrijsku fermentaciju (Kok and de Vos, 1994).

Ekstracelularne proteinaze su na biohemijskom i genetičkom nivou najbolje izučene kod laktokoka (Kok and Venema, 1988). Laktokokalne proteinaze su enzimi velike molekulske mase (oko 200 kDa), i preko svog C-terminusa su vezane za ćelijski omotač. Ovi enzimi spadaju u subtilizinsku grupu serinske klase, a na osnovu sposobnosti hidrolize  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -, ili  $\kappa$ -kazeina dele se na PI i PIII tip (Visser *et al.*, 1986). Proteinaze PI tipa preferencijalno hidrolizuju  $\beta$ -kazein i u manjoj meri  $\kappa$ -kazein, dok proteinaze PIII tipa degraduju  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -, i  $\kappa$ -kazein (Pritchard and Coolbear, 1993). Svi do sada klonirani i sekvencirani laktokokalni proteinazni geni pokazuju visok nivo međusobne homologije od preko 90% (Vos *et al.*, 1989, Kiwaki *et al.*, 1989). Laktokokalne proteinaze se sintetišu u pre-pro formi, a prelazak u aktivnu formu se odvija autokatalitički, uz neophodno prisustvo membranskog lipoproteina koji je produkt gena lociranog neposredno uz proteinazni gen. U nekim slučajevima, ukoliko se bakterije nađu u medijumu bez  $Ca^{++}$  jona, enzim se autodigestijom oslobađa sa površine ćelije (Haandrikman *et al.*, 1991).

Veći broj ekstracelularnih proteinaza laktobacila je najpre biohemijski, a zatim i genetički okarakterisan. Soj *L. helveticus* CP790 sintetiše proteinazu koja pripada serinskoj klasi proteinaza molekulske mase 45 kDa, što je znatno manje od molekulskih masa proteinaza laktokoka i drugih laktobacila. Optimalni uslovi za aktivnost ovog enzima su na temperaturi od 42° C i pH 6.5, a što se tiče specifičnosti prema kazeinskim frakcijama, ova proteinaza hidrolizuje  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ - kazein, ali ne i  $\kappa$ -kazein (Yamamoto *et al.*, 1993). Soj *L. helveticus* CNRZ244 sintetiše proteinazu koja je vezana za ćelijski zid i čiji se aktivni ekstrakt može dobiti pranjem ćelija u fiziološkom rastvoru. Ova proteinaza je testirana u odnosu na afinitet prema supstratu i utvrđeno je da hidrolizuje  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ - kazein (Ezzat *et al.*, 1985). Soj *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* HN14 sintetiše proteinazu veoma sličnu laktokokalnim proteinazama PI tipa koja preferencijalno hidrolizuje  $\beta$ - kazein (Kojic *et al.*, 1991). Soj *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ397 sintetiše proteinazu koja je takođe vezana za ćelijski omotač ali se tokom ispiranja ćelija odgovarajućim puferima odvaja nezavisno od prisustva  $Ca^{++}$  jona (Ezzat *et al.*, 1987). Enzim postiže optimalnu aktivnost na 42°C i pH 5.5 i pokazuje sposobnost hidrolize  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ - kazeina, pri čemu se identični produkti degradacije dobijaju prilikom korišćenja celih ćelija i proteinaznog ekstrakta. Specifični inhibitori metalo-proteinaza i serinskih proteinaza nemaju značajnijeg efekta na njenu aktivnost, dok se parcijalna inhibicija postiže u prisustvu inhibitora cisteinskih proteinaza, što ukazuje na moguću ulogu cisteina u formiranju njenog aktivnog centra (Laloi *et al.*, 1991). Utvrđeno je da soj *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACADC235 sintetiše dve različite proteinaze. Jedna pripada serinskoj klasi proteinaza dok je druga okarakterisana kao cink zavisna proteinaza (u svom katalitičkom centru poseduje atom cinka). Optimalna aktivnost ove metaloproteinaze se postiže u kiseloj sredini na 45°C pri čemu se hidrolizuje preferencijalno  $\beta$ - kazeinska frakcija (Stefanitsi and Garel, 1997).

#### 4. 1. Multidomenska struktura ekstracelularnih proteinaza laktobacila i njihova supstratna specifičnost

Četiri različita tipa gena koji kodiraju za proteinaze laktobacila su do danas okarakterisana. Prema predloženoj nomenklaturi ovi geni označeni su kao *prtP* (Kojic *et al.*, 1991, Holck and Naes, 1992), *prtB* (Gilbert *et al.*, 1996), *prtH* (Zevaco and Gripon, 1988; Yamamoto *et al.*, 1993; Martin-Hernandez *et al.*, 1994; Christensen *et al.*, 1995; Pederson *et al.*, 1999), *prtR* (Pastar, 2003). Svi ovi enzimi pripadaju grupi subtilizinskih serinskih proteinaza koje u aktivnom centru sadrže katalitičku trijadu **Asp. His i Ser** (Siezen, 1999). Sekvenciranje gena koji kodiraju za proteinaze laktobacila omogućilo je detaljnu analizu njihovih aminokiselinskih sekvenci. Na osnovu aminokiselinskih sekvenci utvrđeno je postojanje većeg broja različitih domena ovih proteinaza. Šematski prikaz strukturne organizacije proteinaza BMK i njihovih domena dat je na slici 3.



Slika 3. Šematski prikaz domenske organizacije ekstracelularnih proteinaza BMK.

PP-pre-pro domen; PR-proteazni domen; I-insert domen; A-A domen; B-B domen; H-heliks domen; W-domen vezan za ćelijski zid; AN-ukotvljujući domen.

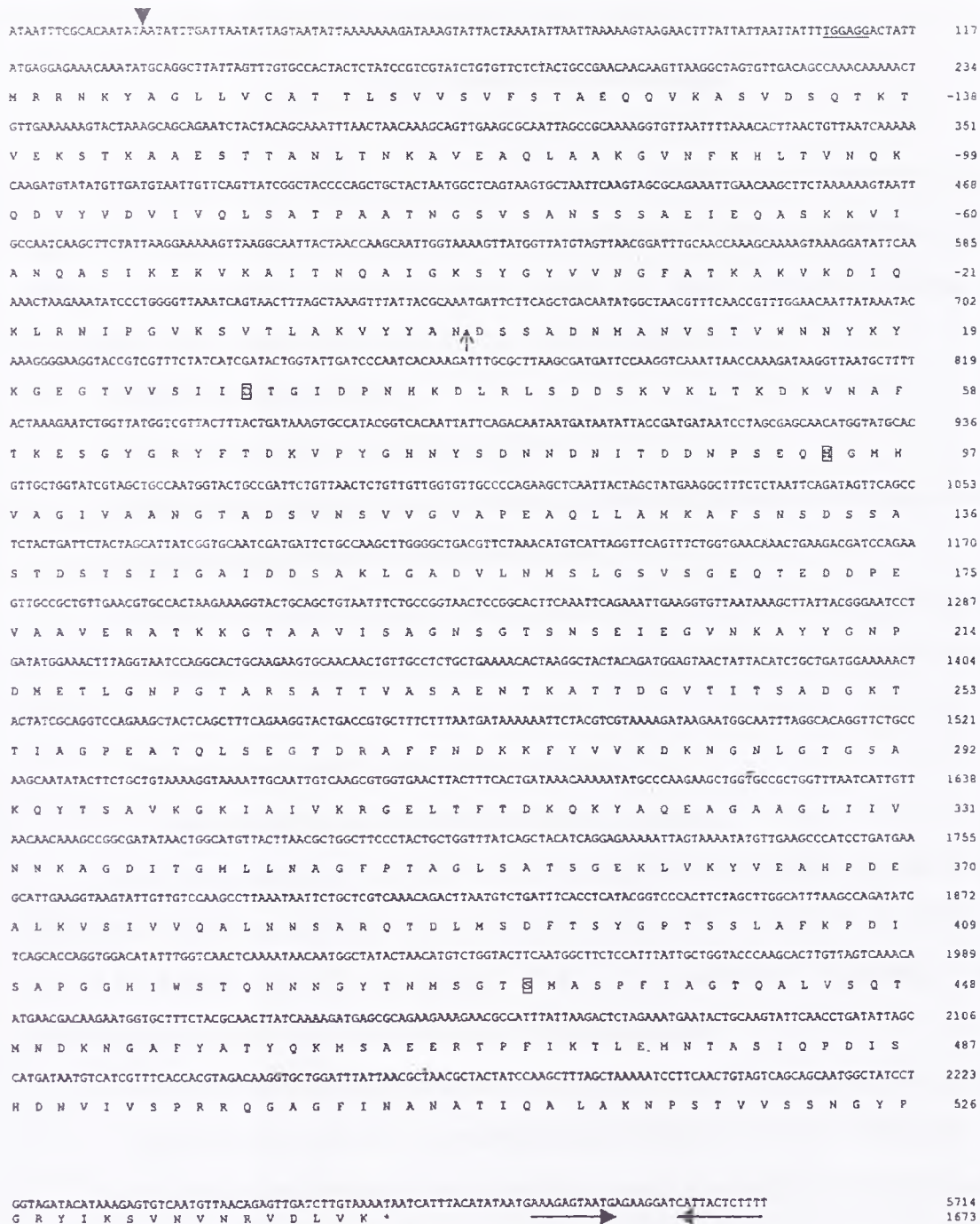
#### 4. 1. 1. Proteinaza soja *Lactobacillus helveticus* CNRZ32

Proteinaza iz soja *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 izolovana je i biohemijski okarakterisana, a gen koji kodira za ovu proteinazu je kloniran i sekvenciran (Slika 4). Na osnovu sekvence gena utvrđeno je da je protein veličine 1849 aminokiselina, molekulske mase 204kD. Gen je, kao i ostali *prt* geni kod laktobacila, lociran na hromozomu. N- terminalna sekvenca ove proteinaze počinje tipičnom (pozitivno naelektrisanom) signalnom sekvencom koja je odgovorna za transport proteinaze kroz ćelijsku membranu. Odmah iza signalne sekvence sledi pre-pro sekvenca u okviru koje se nalazi mesto za njeno isecanje. Pretpostavljeno mesto sečenja signal peptida je Ala<sub>152</sub> - Glu<sub>151</sub>. Poredjenjem ovog regiona sa do sada sekvenciranim odgovarajućim regionima drugih proteinaza utvrđeno je da pokazuje 51% homologije sa pro regionom PrtP proteinaze, na osnovu čega se zaključuje da se njeno procesovanje vrši na isti ili sličan način kao kod laktokoka. Nakon procesovanja dobija se zrela forma proteina veličine 1673 aminokiseline i koja pokazuje 45% identičnosti sa laktokokalnim PrtP proteinazama. N-terminalni kraj zrele proteinaze (oko 500 aminokiselina) obuhvata katalitički (PR) domen, u okviru koga je primećena najveća sličnost (preko 65% identičnosti sa PrtP i oko 32% identičnosti sa PrtB katalitičkim domenom) u poredjenju sa ostalim domenima. Konzervisani katalitički centar ove proteinaze čini trijada Asp<sub>30</sub>, His<sub>94</sub> i Ser<sub>432</sub> i na osnovu toga je autori svrstavaju u subtilizinsku grupu serinske klase proteinaza (subtilaza). U okviru katalitičkog domena, nalazi se insert (I) domen, koji bi, po analogiji sa PrtP proteinazama, trebalo da utiče na supstratnu specifičnost proteinaze. Homologija u ovom regionu je mala (manje od 10 % identičnosti) u poredjenju sa istim regionima ostalih proteinaza. Iza proteaznog domena nalaze se A i B domen za koje je, kompjuterskom predikcijom sekundarne strukture utvrđena organizacija u obliku β-naboranih ploča izmedju kojih se nalaze kratki konzervisani segmenti - hidrofobna jezgra (u okviru hidrofobnih

jezgara utvrđen je mnogo veći stepen identičnosti među istim domenima različitih proteinaza). S obzirom na jedinstvenu kombinaciju aminokiselina u okviru hidrofobnih jezgara, koji utiču na regulaciju proteolitičke aktivnosti, supstratnu specifičnost i stabilnost PR domena, autori ovu proteinazu klasifikuju kao novi tip proteinaze. C-terminalni region obuhvata domen odgovoran za vezivanje za zid (H-domen), dugačak 72 aminokiseline i jako bogat Ala, Leu, Thr, Lys i Asp. Ove aminokiseline su tipične za  $\alpha$ -heliks, a pretpostavljena funkcija podrazumeva ulogu drške koja pozicionira i razdvaja proteazni, A i B domen od površine ćelije. Iza ovog domena sledi W domen koji je kod PrtH proteinaze sličan familiji "S(urface)-layer" proteina laktobacila. C-terminalni deo "S-layer" proteina pokazuje 33% identičnosti sa W-domenom PrtH proteinaze. Ovaj konzervisani C-terminalni deo odgovoran je za vezivanje za ćelijski zid. Za "S-layer" proteine se smatra da se vezuju za površinu ćelije u tačno odredjenim zonama. Na osnovu sličnosti, pretpostavlja se da i za PrtH važi isti način vezivanja kao i za "S-layer" proteine.

"Southern-blot" analizama je pokazano da je ovaj gen široko rasprostranjen u sojevima *Lactobacillus helveticus*, dok je u slučaju proteinaze soja *Lactobacillus helveticus* L89 pokazano postojanje homologije od 100% u regionu odgovornom za vezivanje supstrata.

Na osnovu analize hidrolize  $\alpha_{S1}$ -CN (f1-23) supstrata, uz pomoć celih ćelija, utvrđeno je formiranje 8 različitih peptida, koji se ne mogu pripisati specifičnoj hidrolizi od strane jedne proteinaze. Konstruisanjem *prtH* mutanta zadržava se sposobnost degradovanja  $\alpha_{S1}$ -CN (f1-23), ali se dobijaju četiri od osam peptida, čime autori zaključuju da u okviru jedog soja postoje 2 odvojene proteinaze koje su uključene u proces degradacije kazeina i odgovorne za brži rast i bolju produkciju mlečne kiseline prilikom rasta u mleku (Pederson *et al.*, 1999; Siezen 1999).



Slika 4. Parcijalna nukleotidna sekvenca *prth* gena soja *Lactobacillus helveticus* CNRZ32.

▼ - start transkripcije, potencijalna RBS sekvenca je podvučena, ↑ - mesto sečenja pre-pro domena, aminokiseline katalitičke trijade su uokvirene. ★ - stop kodon, ↔ - potencijalni transkripcioni terminator.



## 5. Probiotici - definicija

Probiotici se definišu kao mono ili mešane kulture živih bakterija koje unete u organizam ispoljavaju pozitivan efekat na zdravlje ljudi (Guarner and Schaafsma, 1998). Da bi neki mikroorganizam mogao da bude svrstan u grupu probiotika neophodno je da zadovolji nekoliko ključnih kriterijuma:

- da je humanog porekla,
- da ne pokazuje patogeno ponašanje,
- da na zadovoljavajući način može da prodje kroz proces tehnološke obrade,
- da je rezistentan na želudačni sok i žuč,
- da ima sposobnost adhezije na epitelijalne ćelije gastrointestinalnog trakta,
- da je sposoban da, makar i na kratko vreme, funkcioniše u gastrointestinalnom traktu,
- da produkuje antimikrobijalne supstance,
- da na adekvatan način moduliše imuni odgovor,
- da ima sposobnost uključivanja u metaboličke aktivnosti, kao što je asimilacija holesterola, laktazna aktivnost, produkcija vitamina i dr. (Dunne *et al.*, 1999).

Utvrđeno je da pozitivan efekat u ljudskom organizmu probiotički mikroorganizmi ostvaruju na nekoliko različitih načina:

- kompeticijom sa patogenima za nutrijente i adheziona mesta u organizmu,
- inaktivacijom toksina i metabolita proizvedenih od strane patogena,
- produkcijom supstanci koje inhibiraju rast patogenih mikroorganizama,
- stimulacijom nespecifičnog imunog odgovora (Prescott *et al.*, 1999).

Svaki potencijalni probiotički soj mora da bude nezavisno determinisan i okarakterisan. Ekstrapolacije nisu dozvoljene, čak i kada se radi o veoma sličnim sojevima. Jedino dobro definisani sojevi kao i njihovi produkti mogu da budu uključeni

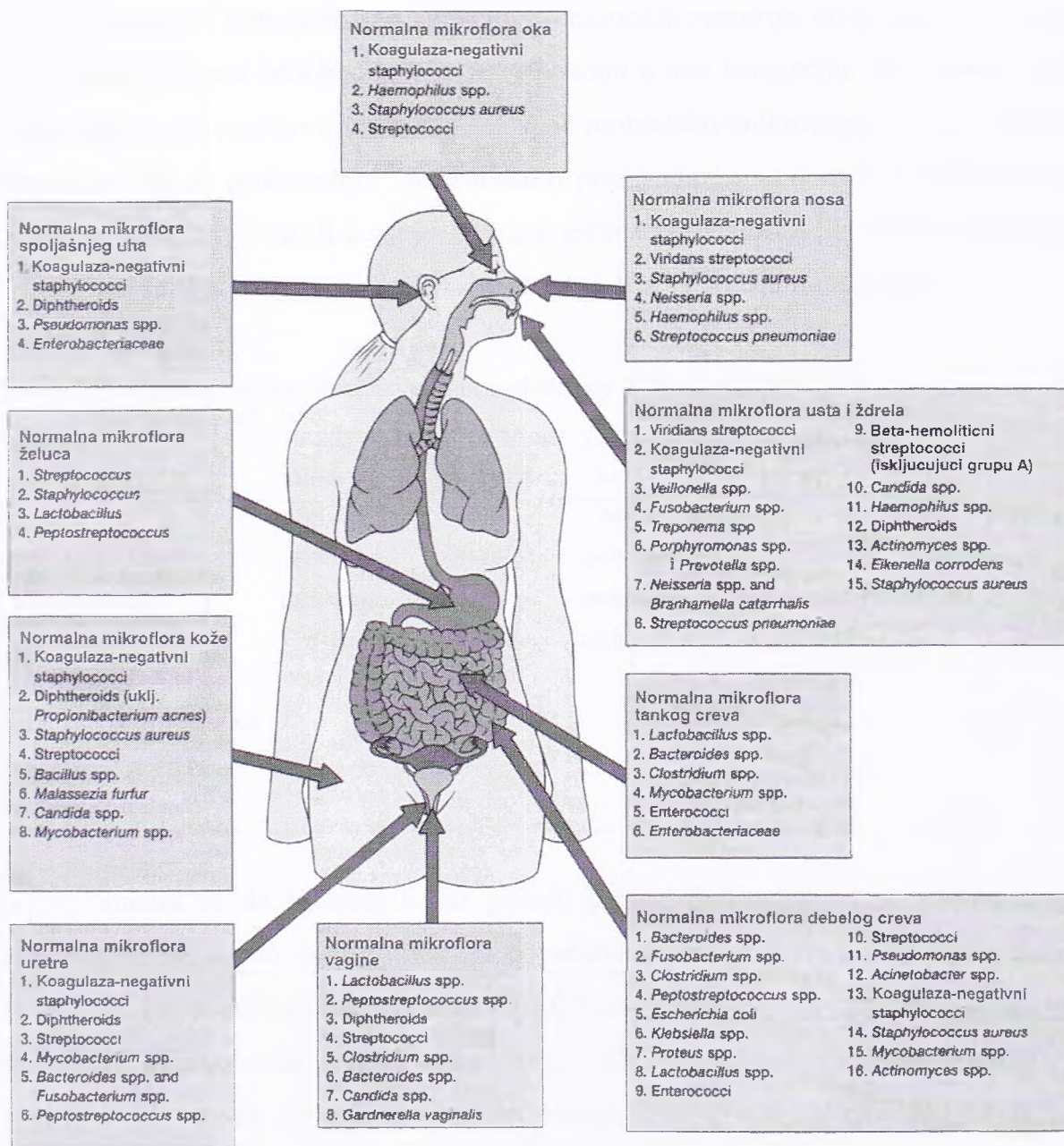
u ispitivanja na humanoj populaciji, koja treba da bude izabrana slučajno, uz neophodnost *placebo* kontrole.

Pored toga što se u organizam mogu unositi kao živi mikroorganizmi, broj probiotičkih bakterija u gastrointestinalnom traktu može se povećati i konzumiranjem selektivno izabranih jedinjenja (namenski proizvedenih ili kao sastojci hrane), kao što su laktuloza, inulin i različite vrste oligo i polisaharida. Ova ali i druga jedinjenja, koja selektivno stimulišu rast i aktivnost probiotskih bakterija u GI traktu nazivaju se prebiotici.

## 5. 1. Prisustvo mikroflore u živim organizmima - laktoflora

Na koži i u organima čoveka, egzistira otprilike  $10^{13}$ - $10^{14}$  mikroorganizama, kao normalna mikroflora, što umnogome prevazilazi ukupan broj ćelija od kojih je ljudski organizam sačinjen. Zajedno sa čovekom ova populacija mikroorganizama daje jedan dinamičan ekosistem unutar koga se formiraju relativno stabilne interakcije. Najveći broj mikroorganizama kod čoveka nalazimo u gastrointestinalnom (GI) i urogenitalnom (UGI) traktu, nosu, ustima, ždrelu i na celoj površini kože (Slika 5).

Laktobacili zajedno sa bifidobakterijama (laktoflora), čine grupu mikroorganizama koja od dana rođenja nastanjuje ljudski organizam i koja će u različitim odnosima biti prisutna tokom celog života. Laktoflora egzistira u različitim kombinacijama, karakterističnim za svaku individuu ponaosob, a njen odnos i broj je relativno stabilan tokom dužeg vremenskog perioda (Mikelsaar *et al.*, 1998). Za ove bakterije ni u jednom slučaju nije zabeleženo da izazivaju bilo kakve bolesti kod ljudi i tretiraju se kao GRAS (Generally Regarded As Safe). Poslednjih godina sve je veći broj navoda o tome da pojedine vrste laktobacila i bifidobakterija, pod određenim uslovima i mehanizmima ostvaruju pozitivan efekat na zdravlje ljudi.



Slika 5. Prirodna mikroflora koja egzistira kod čoveka (Prescott *et al.*, 1999).

## 5. 2. Probiotici medju bakterijama iz roda *Lactobacillus*

Na osnovu kriterijuma za selekciju probiotičkih bakterija, do danas je izdvojeno više desetina sojeva laktobacila koji se svrstavaju u ovu kategoriju. Selektirani sojevi laktobacila imaju prednost, u odnosu na ostale probiotičke mikroorganizme, zato što se mogu koristiti za proizvodnju fermentisanih proizvoda i na taj način se jednostavno uneti u organizam. U tabeli 2 dat je pregled nekih sojeva laktobacila koji su zadovoljili kriterijume selekcije kao probiotički sojevi i uspešno se koriste u industriji.

Tabela 2. Poredjenje nekih probiotički važnih osobina kod četiri soja laktobacila (Salminen *et al.*, 1998).

osobine	<i>Lb. casei</i> Shirota	<i>Lb. sp.</i> ATCC53103	<i>Lb. jonsoni</i> LA1	<i>Lb. acidophilus</i> NFCB1748
izvor	čovjek	čovjek	čovjek	?
sigurnost	potvrđena	potvrđena	potvrđena	potvrđena
pH rezistencija	rezistentan	rezistentan	rezistentan	rezistentan
rez. na žučne soli	rezistentan	rezistentan	rezistentan	rezistentan
kolonizacija	-	+	+	-
produkcija bakteriocina	-	+	+	-
adhezija (Caco-2)	-	+	+	-
adhezija (mukoza)	?	+	+	+

Smatra se da laktobacili, uz pomoć primarnih i sekundarnih metabolita ili komponentama samih ćelija, utiču na povećanje nutritivnih vrednosti fermentisanih proizvoda. Ispitivanje nutritivnih vrednosti fermentisanog povrća i žitarica su pokazala povećanje koncentracije lizina i drugih esencijalnih aminokiselina, kao i vitamina B grupe u odnosu na nefermentisane proizvode. Takodje se smatra da sekundarni metaboliti ovih bakterija doprinose boljoj iskoristljivosti minerala iz fermentisanih namirnica (Gilliland, 1990).

Prema nekim autorima (Klaenhammer, 1982), preživljavanje i održavanje aktivnosti selektiranih sojeva tokom procesa pripreme i distribucije proizvoda od presudnog su značaja za njihovo uspešno delovanje. Ispitivanja broja aktivnih ćelija u komercijalnim proizvodima ("funkcionalna" hrana, farmaceutski proizvodi), su pokazala postojanje znatno manjeg broja živih ćelija u odnosu na deklarirani. Razlog tome je izloženost ćelija liofilizaciji, sušenju i skladištenju u toku dužeg vremenskog perioda. Mnoge od preživelih ćelija mogu biti oštećene tokom ovih procesa što smanjuje njihovu otpornost na uslove GI trakta (nizak pH, žučne soli, lizozim). Da bi ovi preparati održali zadovoljavajući broj aktivnih ćelija, neophodno je odabrati soj koji bi pokazao određenu stabilnost u uslovima pripreme (Ray, 1996).

Veliki broj istraživanja je posvećen ispitivanju rezistentnosti probiotika na uslove humanog GI trakta, kao što su niske vrednosti pH i prisustvo žučnih soli. Ustanovljeno je da rezistencija na žučne soli (0.05-0.3%) varira medju različitim sojevima laktobacila, a u *in vivo* eksperimentima je potvrđeno da se korišćenjem rezistentnih sojeva povećava broj živih ćelija u distalnim delovima GI trakta (Gilliland *et al.*, 1984; Conway, 1987; Gilliland and Walker, 1990). Za intestinalnu laktofloru je utvrđeno da reguliše nivo populacije bakterija *E. coli* i *Enterococcus*, naročito kod beba hranjenih majčinim mlekom (Benno *et al.*, 1984). Razlog tome može biti produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i mlečne kiseline, koji suprimiraju rast ovih intestinalnih patogena. Produkcijom navedenih i drugih antimikrobijalnih jedinjenja, laktobacili pokazuju širok spektar delovanja na različite sojeve *E. coli*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Staphilococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* i druge.

Sposobnost adhezije probiotičkih bakterija za crevni epitel u mnogome doprinosi njihovom zadržavanju u GI traktu, čime se produžava efekat njihovog delovanja. Ustanovljeno je da adhezija može biti specifična i nespecifična za određene sojeve (Kleeman and Klaenhammer, 1981). Ispitivanjem sposobnosti adhezije različitih sojeva laktobacila (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* i *Lactobacillus rhamnosus* GG) za epitelijalne HT29 i Caco-2 ćelije, detektovan je

proteinski kompleks bogat lipoteihoičnom kiselinom, odgovoran za asocijaciju sa crevnim epitelom (Sherman and Savage, 1986; Greene and Klaenhammer, 1994). Smatra se da laktobacili na ovaj način kompetiraju za mesta za vezivanje smanjujući broj potencijalno vezanih patogena. Interesantna su zapažanja da, u toku rasta nekih sojeva *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus fermentum*, dolazi do morfoloških promena ćelija i kolonija. Nakon izolovanja iz GI čoveka ćelije ovih bakterija su pojedinačne, hrapave površine, tanke i filamentozne. U određenim uslovima gajenja (dodatak  $\text{CaCl}_2$ ), transformišu se u jako kratke i glatke ćelije, rasporedjene u vidu lanaca. Ustanovljeno je da ćelije koje poseduju ovaj drugi fenotip pokazuju znatno veću otpornost i prijemčivost za crevni epitel (Henriksson *et al.*, 1991).

Klinička ispitivanja su pokazala da probiotičke bakterije mogu pozitivno delovati u regulaciji poremećene mikroflore UGI i GI nakon terapije antibioticima. Nakon dugotrajnog tretmana antibioticima često dolazi do sekundarnih infekcija izazvanih rezistentnim patogenim bakterijama. Laktobacili, koji imaju adhezijska svojstva, kompetiraju sa adhezivnim patogenima titrirajući ih iz sredine. Novija imunološka ispitivanja pokazuju da se probiotički efekat nekih sojeva može pripisati i stimulaciji produkcije  $\gamma$ -interferona (Marteau and Rambaud, 1993) kao i učestvovanju u modulaciji imunog odgovora. Potvrđeno je da laktobacili mogu doprineti povećanju titra antitela IgG, ali je, u isto vreme, odbrambeni odgovor na njihovo prisustvo (produkcija IgA), smanjen ili ga nema. Koncentracija limfocita u krvi, sa receptorima za ove vrste bakterija je takodje mala (pretpostavlja se da se ovo dešava zbog antigene sličnosti sa svojim domaćinom). Studije uradjene sa 28 volontera pokazuju da je nakon unošenja nekoliko probiotičkih sojeva u organizam došlo do porasta koncentracije interleukina IL-10 i IL-6 kao i TNF- $\alpha$  tj. do stimulacije nespecifičnog imunog odgovora. U drugom slučaju unošenjem *Lactobacillus acidophilus* LA1, došlo je do povećane fagocitoze *E. coli* prisutne u medijumu (Isolauri *et al.*, 1998).

Veliki je broj navoda koji govore o pozitivnom efektu u lečenju akutnih diarea, raznih enterokolitisa, Kron-ove bolesti, kao i alergija na hranu praćenih intestinalnom

inflamacijom ili atipičnih dermatitisa kod dece i odojčadi. Takodje ovi sojevi su opisani i kao potentni antikancerogeni, a njihova aktivnost se povezuje sa produkcijom određenih jedinjenja tokom rasta. Njihovo antikancerogeno delovanje se ogleda i u eliminaciji prokancerogena - neki sojevi *Lactobacillus acidophilus* iskorišćavaju nitrite što smanjuje njihovu konverziju u nitrozoamine, za koje se smatra da su potentni kancerogeni (Fernandes *et al.*, 1987). Eksperimenti na životinjama su pokazali da su neki probiotički sojevi sposobni da smanje nivo enzima odgovornih za aktivaciju prokancerogena kao što su  $\beta$ -glukuronidaza, azoreduktaza ili nitroreduktaza. Smatra se da su ovi enzimi produkti metabolizma pojedinih anaerobnih i fakultativno anaerobnih intestinalnih bakterija (*Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Stapyilococcus* i dr.) i da se redukcijom njihovog broja smanjuje i nivo njihovih štetnih enzima. Supresija tumora, kod nekih životinja, pospešena je povećanjem aktivnosti makrofaga domaćina, a ispitivanja su pokazala da su za to odgovorne žive i mrtve ćelije laktobacila kao i delovi njihovih ćelijskih zidova (Salminen *et al.*, 1998).

Smanjenje nivoa holesterola u organizmu može se detektovati u eksperimentima *in vivo* pri konzumiranju fermentisanih mlečnih proizvoda. Utvrđeno je da probiotičke bakterije vrše asimilaciju holesterola u anaerobnim uslovima i u prisustvu žučnih soli. U drugom slučaju, probiotičke bakterije mogu da vrše dekonjugaciju žučnih soli, što za posledicu ima smanjenje njihovog delovanja u apsorpciji lipida (i holesterola) u GI traktu i povećanje ekskrecije žučnih soli iz GI trakta. Ovakva eliminacija žučnih soli stvara potrebu za sintezom novih količina u organizmu za šta je neophodan holesterol kao prekursor (Usman, 1999; Pereira and Gibson, 2002).

U tabeli 3 dat je spisak pozitivnih efekata koje ostvaruju okarakterisani probiotički sojevi laktobacila.

Tabela 3. Ustanovljeni efekti nekih probiotičkih laktobacila (Lee and Salminen, 1995).

vrsta probiotika	probiotički efekat
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pojačanje imunog odgovora</li> <li>- visok stepen adhezije na intestinalne ćelije</li> <li>- uspešno balansiranje sastava intestinalne mikroflore</li> </ul>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFB1748	<ul style="list-style-type: none"> <li>- smanjenje aktivnosti fekalnih enzima</li> <li>- smanjenje mutagenih sastojaka fecesa</li> <li>- sprečavanje <i>diaree</i> izazvane radioterapijom</li> <li>- tretman i sprečavanje konstipacije</li> </ul>
<i>Lactobacillus</i> GG ATCC53013	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sprečavanje <i>diaree</i> izazvane antibioticima</li> <li>- tretman i sprečavanje <i>diaree</i> izazvane rotavirusima</li> <li>- tretman povratne <i>diaree</i> izazvane <i>Clostridium difficile</i></li> <li>- pozitivni efekti u tretmanu Kron-ove bolesti</li> <li>- razgradnja antigena u otvorenim ranama - smanjenje njihove imunoaktivnosti</li> <li>- nosači antigena za vakcine</li> </ul>
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sprečavanje intestinalnih smetnji</li> <li>- tretman <i>diaree</i> izazvane rotavirusima</li> <li>- uspešno balansiranje sastava intestinalne mikroflore</li> <li>- smanjenje aktivnosti fekalnih enzima</li> <li>- pozitivni efekti u tretmanu površinskog kancera mokraćne bešike</li> <li>- povećanje imuniteta u raznim fazama kancera kolona</li> <li>- povećanje imunog statusa</li> </ul>
<i>Lactobacillus gasseri</i> (ADH)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- smanjenje aktivnosti fekalnih enzima</li> <li>- visok stepen preživljavanja u intestinalnom traktu</li> </ul>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- efikasna kolonizacija intestinalnog trakta, uglavnom testirana na animalnim sistemima</li> </ul>



## CILJ RADA

Istraživanja koja se sprovode na sojevima laktobacila izolovanim iz čoveka, poslednjih desetak godina doživela su značajnu ekspanziju. Do danas je okarakterisan manji broj probiotičkih sojeva za koje je utvrđeno da imaju pozitivan efekt na zdravstveno stanje ljudi. Da bi humani izolat BGRA43 mogao da bude svrstan u grupu probiotika bilo je neophodno da se što bolje istraže i okarakterišu osobine koje predstavljaju osnovne kriterijume za svrstavanje u probiotičku grupu. Zbog toga je cilj ovog rada bio da se:

- izvrši determinacija prirodnog izolata BGRA43, izolovanog iz intestinalnog trakta čoveka, i odrede njegove mikrobiološko-biohemijske karakteristike,
- utvrdi pripadnost određenoj vrsti,
- izvrši transformacija soja radi olakšavanja genetičkih manipulacija,
- ispita potencijalna antimikrobijalna aktivnost,
- ispita sposobnost preživljavanja u uslovima niske pH vrednosti kao i u prisustvu žučnih soli što je jedan od osnovnih zahteva za nesmetani prolazak kroz želudac i *duodenum*,
- biohemijski i genetički okarakteriše proteinaza koju soj BGRA43 sintetiše, da se utvrdi njena specifičnost prema različitim supstratima, kao i da se odredi optimalna vrednost pH i temperature za njenu aktivnost, u cilju eventualne biotehnološke primene,
- na maloj skali testira kao starter kultura za proizvodnju jogurta i kiselog mleka.

## II MATERIJAL I METODE

### 1. BAKTERIJSKI SOJEVI

Bakterijski sojevi korišćeni u ovom radu predstavljeni su u Tabeli 4.

Tabela 4.

Bakterijski soj	Relevantne karakteristike	Izvor ili referenca
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
NP45	Soj koji proizvodi nizin	Kozak <i>et al.</i> , 1974.
NCDO712	Prt <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Bac <sup>s</sup>	Gasson, 1983.
MG1363	Derivat soja NCDO712, bez plazmida, Prt <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Bac <sup>s</sup>	Gasson, 1983.
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		
NS1		lab. kolekcija
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
ATCC4356		American Type Culture Collection
ATCC4357		
ATCC33200		
<i>Lactobacillus helveticus</i>		
BGRA43	Prirodni humani izolat, Prt <sup>-</sup>	Banina <i>et al.</i> , 1998.
BGRA433	Derivat soja BGRA43, Prt <sup>-</sup>	ovaj rad
CNRZ32	Prt <sup>-</sup>	Pederson <i>et al.</i> , 1999.
Cu90	Prt <sup>+</sup>	Miteva, 1999.
<i>Lactobacillus casei</i>		
ATCC 393	soj očišćen od plazmida pL215, Lac <sup>-</sup>	Chassy and Flickinger, 1987.
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
A112		Sakellaris, 1988.
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	(F <sup>-</sup> , $\Delta$ lac, U169( $\Phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15), supE44, hsdR17recA1, gyrA96, endA1, thi-1, relA1)	Woodcock <i>et al.</i> , 1989.
C600	(F <sup>-</sup> , thr-1, leuB6, lacY1, supE44, rfbD1, thi-1, tonA21, $\lambda$ <sup>-</sup> )	Bachmann, 1987.
<i>Clostridium sporogenes</i>		
		TMF, Beograd

Pored nabrojanih sojeva bakterija, u ovom radu su korišćene i sledeće bakterijske vrste: *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus* ATCC Met<sup>f</sup>, *Streptococcus pneumoniae* ATCC496, *Streptococcus pneumoniae* ATCC276, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis* ATCC8, *Bacillus cereus* ATCC11778, *Micrococcus flavus* ATCC10240, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp. Sve gore navedene bakterije su dobijene iz Instituta za imunologiju i virusologiju "Torlak".

## 2. KORIŠĆENI PLAZMIDI

Plazmidi korišćeni u ovom radu predstavljani su u Tabeli 5.

Tabela 5.

Plazmidi	Relevantne karakteristike	Izvor ili referenca
pUC19	Amp <sup>R</sup> , <i>lacZ</i>	Yanish-Perron <i>et. al.</i> , 1984.
pBluescriptII SK	<i>P<sub>lac</sub>-lacZ<math>\alpha</math></i> , CoE1 replicon	Stratagene
pBluescriptII KS	<i>P<sub>lac</sub>-lacZ<math>\alpha</math></i> , CoE1 replicon	Stratagene
pA1-6	Em <sup>R</sup>	Vujcic <i>et. al.</i> , 1994.

## 3. MEDIJUMI ZA KULTIVISANJE BAKTERIJA

Za rast bakterija *E. coli* korišćen je LB tečni medijum (tripton 10 g/l, ekstrakt kvasca 5 g/l, NaCl 5 g/l) (Lennox, 1955), ili LB čvrsta podloga koja se dobija dodavanjem agara u LB tečni medijum u finalnoj koncentraciji od 1.5%. Temperatura kultivacije je 37°C.

Za rast laktokoka je korišćen GM17 tečni medijum (Merck GmbH Darmstadt, Germany) koji sadrži: polipepton 5 g/l, fitopepton 5 g/l, mesni ekstrakt 5 g/l, ekstrakt kvasca 2.5 g/l, L-askorbinska kiselina 0.5 g/l, magnezijum-sulfat 0.25 g/l, Na- $\beta$ -glicerofosfat 19 g/l, i 5 g/l glukoze; pH 6.8). Čvrsta podloga za rast je dobijena dodavanjem 1.5% agara. Temperatura kultivacije je bila 30°C.

Za gajenje laktobacila korišćen je MRS medijum (Merck GmbH Darmstadt, Germany) koji sadrži: bakto-proteinazni pepton 10 g/l, mesni ekstrakt 8 g/l, ekstrakt kvasca 4 g/l, Tween80 1 g/l, amonijum-citrat 2 g/l, natrijum-acetat 5 g/l, magnezijum-sulfat 0.2 g/l, mangan-sulfat 0.04 g/l, natrijum-fosfat 2 g/l i glukoze 20 g/l. Čvrsta podloga za rast je dobijena dodavanjem 1.5% agara. Bakterije su gajene na 37°C, u mikroaerofilnim ili anaerobnim uslovima.

Za testiranje proteolitičke aktivnosti, u soju *Lactobacillus* bakterije su gajene na MCA čvrstoj podlozi koja sadrži: mleko u prahu 44 g/l, Na-citrat 8 g/l, glukoza 5 g/l, ekstrakt kvasca 4 g/l. Čvrsta podloga je dobijana dodavanjem 2% agara. Temperatura kultivacije je bila 37°C.

#### 4. METODE IZOLOVANJA I DETERMINACIJE SOJA

Fenotipske i biohemijske karakteristike praćene u cilju determinacije prirodnog izolata BGRA43 bile su: bojenje po Gramu (ćelije se boje rastvorom koji sadrži gencijana violet, kalijum jodid po Lugolu, 95% etil alkohol i fuksin), sposobnost hidrolize arginina (o/n kultura, rasla u medijumu koji sadrži arginin, prelivana je fenol red-om i praćena je promena boje; bazna reakcija od prisutnog amonijaka dovodi do pojave crvene boje medijuma, dok je test negativan ukoliko do promene boje ne dodje), sposobnost sinteze diacetila (u 1ml o/n kulture, koja je formirala homogeni gruš, dodavan je 1 ml 40% KOH i nekoliko kristala kreatinina; u slučaju sinteze diacetila dolazi do formiranja crvenog prstena na površini epruvete), aktivnost u mleku (merenje promene pH inokulisanog mleka nakon 6, 12 i 24 sata inkubacije), katalaza test (prelivanje kolonija, raslih na čvrstoj podlozi, rastvorom 30% vodonik-peroksida i praćenje pojave penušanja), rast u aerobnim i anaerobnim uslovima, rast na različitim temperaturama, proizvodnja egzopolisaharida (formiranje sluzavih kolonija nakon rasta na čvrstim podlogama), analiza proteolitičke aktivnosti (videti Materijal i Metode,

Ispitivanje proteolitičke aktivnosti), antimikrobijalna aktivnost (videti Materijal i Metode, Antimikrobijalni eseji), kao i sposobnost fermentacije različitih šećera [korišćenje API 50-CH-L (API System S. A; Montelieu-Vercieu, France)] (Sharpe, 1979).

## 5. METODE IZOLACIJE DNK

### 5. 1. Mini-metoda izolacije plazmida iz *E. coli*

Za izolaciju plazmida iz *E. coli* korišćena je metoda alkalne lize (Birnboim and Doly, 1979). Talog iz 5 ml noćne kulture je pran u TEN puferu (50mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA pH8.0, 50mM NaCl) i resuspendovan u 100  $\mu$ l STE pufera (20% saharoza, 0.1M Tris-HCl pH8.0, 2mM EDTA) sa lizozimom (2 mg/ml). Posle inkubacije 5 min na sobnoj temperaturi dodavano je 200  $\mu$ l sveže pripremljene smeše 1% SDS-a i 0.2N NaOH. Posle laganog mešanja dodavano je 150  $\mu$ l 3M Na-acetata pH 4.5. Smeša je inkubirana 10 min na -20°C, a zatim centrifugirana 20 min na 13000 rpm na 4°C u BiofugiA. Dobijeni supernatant je prebacivan u čiste mikrotube, dodavano je 2 zapremine etanola (96%, -20°C) i posle centrifugiranja (20 min na 13000 rpm na 4°C u BiofugiA) talog je ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C) i centrifugiran (5 min na 13000 rpm na 4°C u BiofugiA). Talog je sušen i resuspendovan u 50  $\mu$ l vode. RNK je odstranjivana inkubacijom uzoraka sa RNK-azom (1  $\mu$ l, 10 mg/ml). Da bi ovako dobijena plazmidna DNK mogla da se seče restrikcionim enzimima bilo je potrebno prečistiti je fenolom (PCI).

### 5. 2. Prečišćavanje DNK fenolom (PCI procedura)

Uzorak DNK je razblaživan vodom do finalne zapremine od 200  $\mu$ l, u koji je dodavano 200  $\mu$ l PCI smeše (fenol, hloroform, izoamil alkohol, u zapreminskom

odnosu 10:9:1), dobro promešano i centrifugirano 7 min na 13000 rpm u BiofugiA. Vodena faza je pažljivo prebacivana u čiste mikrotube i u njih je dodavano 200  $\mu$ l hloroforma. Posle mešanja i centrifugiranja (1-2 min na 13000 rpm u BiofugiA), odstranjivana je gornja faza i u donju fazu je dodavan Na-acetat (finalno 0.3M) i 2.5 zapremine hladnog etanola (96%, -20°C). Posle inkubacije na -80°C (20 min) i centrifugiranja (20 min na 13000 rpm na 4°C u BiofugiA), dobijeni talog je ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiran (5 min na 13000 rpm na 4°C u BiofugiA) sušen i resuspendovan u vodi. Na ovaj način prečišćena DNK može da se koristi za digestije restrikcionim enzimima, ligacije, transformacije itd.

### 5. 3. Mini-metoda izolacije plazmida za sekvenciranje iz *E. coli*

Velika količina plazmidne DNK iz *E. coli* izolovana je po proceduri za "JETSTAR Plasmid Kit". Talog iz 25 ml (midi-prep) prekonoćne kulture bakterija je resuspendovan u 4 ml rastvora E1 (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8.0), a potom je dodavano 4 ml rastvora za lizu ćelija (200mM NaOH i 1% SDS). Dobijeni homogeni lizat je inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi. Neutralizacija rastvora je vršena dodavanjem 4 ml 3M K-acetata pH 5.5, a zatim je smeša centrifugirana 20 min na 20°C na 10000 rpm u Sorvall centrifugi. Supernatant je zatim propuštan kroz JETSTAR kolonu za midi-prep izolaciju plazmida u kojoj dolazi do vezivanja plazmidne DNK za matriks. Prečišćavanje DNK u koloni je vršeno dodavanjem 10 ml rastvora za pranje (800mM NaCl, 100mM Na-acetat, pH 5.0). Elucija DNK sa kolone je vršena dodavanjem 5.0 ml rastvora za eluciju (1.25M NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.5). Ovako dobijena DNK je precipitirana dodavanjem 0.7 zapremine izopropanola. Precipitirana DNK je centrifugirana 20 min na 4°C na 10000 rpm u Sorvall centrifugi. Nakon centrifugiranja supernatant je odlivan, a talog pran sa 20 ml 75% etanola, centrifugiran

5 min na 4°C na 10000 rpm u Sorvall centrifugi. Nakon odlivanja 75% etanola talog je sušen na vazduhu i resuspendovan u 100 µl vode.

#### **5. 4. Mini-metoda izolacije plazmida iz laktobacila**

Za izolaciju plazmida iz laktobacila korišćena je modifikovana metoda alkalne lize (Birboim and Doly, 1979). Talog iz 5 ml logaritamske kulture bakterija ( $OD_{600}=0.6-0.8$ ) je pran u TEN puferu (50 mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 50mM NaCl, pH 8) i resuspendovan u 100 µl PP pufera (0.5M saharoza, 40mM  $NH_4$ -acetat, 10mM Mg-acetat, pH 7) sa lizozimom (7 mg/ml). Posle inkubacije od 15 min na temperaturi od 37°C, dodavano je 200 µl sveže pripremljene smeše 1% SDS-a u TE1 puferu (100mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 12). Nakon laganog mešanja dodavano je 150µl 3M Na-acetata pH 4.5, inkubirano 20 min na temperaturi -20°C, a zatim smeša centrifugirana 20 min na 13000 rpm i temperaturi od 4°C u BiofugiA. Dobijeni supernatant je prebacivan je u čiste mikrotube nakon čega su dodavane 2 zapremine apsolutnog etanola, a nakon centrifugiranja (20 min na 13000rpm i 4°C u BiofugiA) talog je ispiran hladnim 75% etanolom. Talog je sušen i resuspendovan u 20µl vode. RNK je odstranjivana inkubacijom uzoraka sa RNK-azom (1 µl, 10 mg/ml) 30 min na 37°C.

#### **5. 5. Mini-metoda izolacije velikih plazmida iz laktobacila**

Plazmidi iz laktobacila su izolovani i po proceduri koju su opisali O'Sullivan i Klaenhammer (1993). Talog prekonoćne kulture bakterija je resuspendovan u 25% saharozi koja sadrži 30 mg/ml lizozima (200 µl). Smeša je inkubirana 15 min na 37°C, a zatim je dodavano 400 µl alkalnog rastvora SDS-a (3% SDS, 0.2N NaOH) i

inkubirano 7 min na sobnoj temperaturi. Posle dodavanja 3M Na-acetata, pH 4.8, ohladjenog na ledu (300  $\mu$ l), uzorci su centrifugirani 15 min na 4°C (13000 rpm u BiofugiA). Supernatant je prebacivan u čiste mikrotube uz dodavanje 650  $\mu$ l izopropanola i centrifugiran 15 min na 1300rpm i temperaturi od 4°C u BiofugiA. Dobijeni talog je resuspendovan u 320  $\mu$ l vode i 200  $\mu$ l 7.5M NH<sub>4</sub>-acetata sa 0.5 mg/ml etidijum bromida. Smeši je dodavano 350  $\mu$ l fenol-hloroforma i nakon laganog mešanja smeša je centrifugirana na sobnoj temperaturi 5 min. Gornja (vodena) faza je prebacivana u nove mikrotube i DNK iz rastvora je precipitirana hladnim etanolom (96%, -20°C) preko noći na -20°C. Posle centrifugiranja 15 min na 4°C (13000 rpm u BiofugiA) talog je ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiran 5 min na 4°C (13000 rpm u BiofugiA), sušen i resuspendovan u 40  $\mu$ l vode. RNK je odstranjivana inkubacijom uzoraka sa RNK-azom (1  $\mu$ l, 10 mg/ml), 30 min na 37°C.

## 5. 6. Izolacija velikih količina DNK iz laktobacila

Ukupna DNK iz laktobacila izolovana je prema metodi koju su opisali Anderson i McKay (1983). Talog iz 500 ml logaritamske kulture bakterija ( $OD_{600}=0.6-0.8$ ) je pran vodom, resuspendovan u 12.5 ml STE pufera (6.7% saharoza, 50mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH 8.0) i zagrevan na 37°C. Dodavan je lizozim u koncentraciji od 7 mg/ml i smeša je inkubirana 5-10 min na 37°C. Zatim je dodavano 3.15 ml rastvora 0.25M EDTA i 50mM Tris-HCl pH 8.0, a potom i 0.9 ml 20% SDS. Nakon toga vršeno je intenzivno mešanje na vorteksu u trajanju od 1 min ili dok viskozitet rastvora nije postao приметно manji. Posle ovog koraka smeša je inkubirana 5-10 min na 37°C, a nakon toga je dodavan 1 ml 3M NaOH. Posle blagog mešanja u lizat je dodavan i 1.65 ml 2M Tris-HCl pH 7.0. Kad je smeša dobro izmešana dodavano je 2.4 ml 5M NaCl. Smeša je centrifugirana 30 min na 4°C pri brzini od 18000 rpm (Sorvall centrifuga).



Dobijeni supernatant je prebacivan u čiste epruvete, dodavana je jedna zapremina fenol-hloroforma i centrifugirano je 15 min na 4°C pri brzini od 7000 rpm (SS34 rotor, Sorvall centrifuga). Dobijeni supernatant je prebacivan u čiste epruvete i precipitiran sa 2.5 volumena etanola (96%, -20°C) preko noći na -20°C. Nakon centrifugiranja 20 min pri brzini od 10000 rpm (Sorvall centrifuga) talog je ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C, 20ml), sušen i resuspendovan u TE puferu. RNK je odstranjivana inkubacijom sa RNK-azom (100 µl, 10 mg/ml) 60 min na 37°C.

### 5. 7. Brza izolacija ukupne DNK

Ukupna DNK iz laktokoka i laktobacila je izolovana po modifikovanoj metodi koju su opisali Hopwood i autori 1985. Talog dobijen centrifugiranjem bakterija iz 3 ml logaritamske kulture pran je u TEN puferu (50 mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 50mM NaCl, pH 8), a zatim resuspendovan u 0.5 ml PP pufera (0.5M saharoza, 40mM NH<sub>4</sub>-acetat, 10mM Mg-acetat, pH 7) koji je sadržavao 4mg/ml lizozima, za laktokoke, ili 7 mg/ml lizozima za laktobacile i 50 mg/ml RNK-aze. Zatim je vršena inkubacija na 37°C u trajanju od 30 min dok ćelije nisu postale translucetne, nakon čega je dodavano 250 µl 2% SDS-a i suspenzija intenzivno izmešana na vorteksu u trajanju od 1 min ili dok viskozitet nije postao primetno manji. Posle ovog koraka vršeno je odstranjivanje proteina višestrukom fenolskom ekstrakcijom pri čemu je svaki put dodavano 250 µl neutralnog fenol-hloroforma, rastvor intenzivno mešan u trajanju od 30 sec i centrifugiran 2 min na 13000rpm u BiofugiA. Pažljivo sakupljenom supernatantu dodavana je 1/10 volumena izopropanola, a zatim je smeša lagano izmešana i inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Ukupna DNK je taložena centrifugiranjem 2 min na 13000 rpm u BiofugiA, a talog je rastvaran u 0.5 ml TE pufera. Nakon dodavanja 25 µl 100mM Spermin-HCl-a rastvor je inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi i centrifugiran kao u predhodnom slučaju. Dobijeni talog je

resuspendovan u 300  $\mu$ l 0.3M Na-acetata i 10mM  $MgCl_2$ , a zatim je rastvoru dodavano 700  $\mu$ l 96% etanola, uzorak je lagano mešan i inkubiran 60 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja (2 min na 13000rpm u BiofugiA) supernatant je potpuno odstranjen, a talog je sušen i resuspendovan u 100  $\mu$ l TE pufera.

## 5. 8. Prečišćavanje DNK u gradijentu CsCl

Na mililitar rastvora DNK, dobijenog u procesu izolacije, dodavan je 1g čvrstog CsCl i rastvor etidijum bromida (0.4 ml, koncentracije 10 mg/ml). Ovaj rastvor je prenošen u epruvete za Beckman Ti50 rotor. Izopikničko razdvajanje plazmidne i hromozomalne DNK je vršeno centrifugiranjem 36h na 20°C pri brzini od 45000 rpm (Ti50 rotor, Beckman ultracentrifuga). Posle centrifugiranja pri UV svetlu mogle su se videti dve fluorescirajuće trake: gornja, koja sadrži hromozomalnu DNK i donja, u kojoj se nalazi kovalentno zatvorena, cirkularna forma plazmidne DNK. Da bi se izolovale željene trake hromozomalne i plazmidne DNK zid epruvete je bušen nešto ispod nivoa trake, sadržaj trake je izvlačen špricom i prebacivan u čiste mikrotube. Iz ovako dobijenog rastvora DNK etidijum bromid je ekstrahovan izoamil alkoholom (u odnosu zapremina 1:1), a CsCl dijaliziranjem prema TE puferu pH 7.5 velike zapremine.

## 6. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK

### 6. 1. Sečenje DNK restrikcionim enzimima

Sečenje restrikcionim enzimima je radjeno u komercijalno proizvedenim puferima u zavisnosti od vrste korišćenih enzima. Uslovi za sečenje DNK restrikcionim

enzimima kao što su količina enzima, pufer i temperatura inkubacije, određivani su prema uputstvu proizvođača. Količina DNK je bila 1 µg na 10 µl reakcione smeše.

## 6. 2. Ligacija DNK fragmenata

Ligacija fragmenata DNK (Maniatis *et al.*, 1982), je radjena tako što su DNK fragmenti sa komplementarnim lepljivim krajevima, u finalnoj količini od 0.5-1µg, u ligacionom puferu (50mM Tris-HCl pH7.4, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM ditiotreitrol, 1mM spermidin, 1mM ATP, 100 µg/ml BSA) i sa jednom jedinicom T4 DNK ligaze, spojeni u finalnoj zapremini od 10µl. Inkubacija ligacione smeše je trajala 16 sati na 16°C.

## 6. 3. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom (“Polymerase chain Reaction”)

Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom je vršeno tako što su totalnoj DNK (0.1-1 µg) u 1x reakcionom puferu (RP: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100 finalno pH 9.0 na 25°C) dodavani MgCl<sub>2</sub> u finalnoj koncentraciji 2.5mM, dNTP smeša (svaki dNTP po 200µM), prajmeri (svaki po 2.5µM) i DNK *Taq* polimeraza (1U). U smešu je dodavano pola zapremine parafinskog ulja. PCR je radjen po sledećem programu: ciklus 1: denaturacija 5 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 50°C ili 55°C (zavisno od nukleotidnog sastava prajmera), polimerizacija 1 min na 72°C; ciklusi 2-29: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 55°C (u slučaju prajmera P1<sub>16S</sub> i P2<sub>16S</sub>, 16-01 i 16-02) ili 53°C (u slučaju prajmera Jp23, Jp25, HW1, HW2 i HW3), polimerizacija 1 min na 72°C; ciklus 30: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 53°C ili 55°C, polimerizacija 5 min na 72°C. Sekvence korišćenih prajmera date su u Tabeli 6.

Tabela 6. Sekvence prajmera korišćenih u ovom radu

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera	Relevantne karakteristike
P1 <sub>16S</sub>	(5'-GGAATCTTCCACAATGGACG-3')	prajmer iz 16S rRNK regiona
P2 <sub>16S</sub>	(5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAG-3')	prajmer iz 16S rRNK regiona
16-01	(5'-AGAGTTTGATCTACTGGCTCAG-3')	prajmer iz 16S rRNK regiona 8-27
16-02	(5'-AAAGGAGGTGAATCC-3')	prajmer iz 16S rRNK regiona 1542-1529
Jp23	(5'-GCTTGGATAGTAGCGTTAGC-3')	prajmer za katalitički region <i>prtH</i> gena
Jp25	(5'-GGTGAACAACTGAAGACG-3')	prajmer za katalitički region <i>prtH</i> gena
HW1	(5'-CCTGCTGAACCAACTATCC-3')	prajmer za W domen <i>prtH</i> gena
HW2	(5'-GATCAACTCTGTTAACATTGACAC-3')	prajmer za W domen <i>prtH</i> gena
HW3	(5'-GCGAAGATAAGGAATTAGCTAAGG-3')	prajmer za C terminalni region <i>prtH</i> gena

## 7. ELEKTROFOREZA DNK

### 7. 1. Horizontalna elektroforeza DNK

Elektroforeza DNK je radjena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u TBE puferu (89mM Tris, 89mM borna kiselina, 2mM EDTA, finalno pH 8.3) i dodavanjem etidijum bromida (0.5 µg/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je TBE pufer sa 0.5 µg/ml etidijum bromida. Agarozni gelovi različitog procenta (0.8%, 1% ili 1.2%) su korišćeni u zavisnosti od veličine DNK

fragmenata koje je trebalo razdvojiti. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela.

Veličine fragmenata DNK dobijenih posle sečenja restrikcionim enzimima određivane su na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine predjenog puta DNK fragmenata koja se ispituje u odnosu na dužinu puta koju su prešli DNK fragmenti poznate veličine. Korišćen je sledeći DNK standard:

-  $\lambda$  DNK sečena *HindIII* i *EcoRI* restrikcionim enzimima pri čemu su dobijani fragmenti DNK dužine 22400 bp, 5370 bp, 4310 bp, 3530 bp, 2020 bp, 1940 bp, 1610 bp, 1360 bp, 940 bp, 860 bp, 580 bp, 150 bp.

## 8. ELUCIJA DNK FRAGMENTA

### 8. 1. Elucija DNK fragmenata iz agaroze niske tačke topljenja

Izolacija restrikcionih fragmenata je vršena na sledeći način: nakon preparativne elektroforeze isecan je deo agaroznog gela u okviru koga se nalazio fragment DNK, željene dužine. Gel sa fragmentom je otapan u mikrotubi 20 min na 70°C. U otopljenu agarozu je dodavan isti volumen 0.5% rastvora cetilmetil-amonijum bromida (CTAB) u vodi, predhodno saturisanog butanolom, i isti volumen 0.5% CTAB-a rastvorenog u butanolu, predhodno saturisanog vodom. Nakon intenzivnog mešanja rastvor je centrifugiran 1 min na 13000rpm. Gornja faza, koja sadrži DNK, prenošena je u nove mikrotube i rastvoru je dodavan 0.3M Na-acetat pH 7 (1/4 volumena). Nakon mešanja i centrifugiranja od 1 min na 13000 rpm uzimana je donja faza i prebacivana u nove mikrotube. DNK je dalje prečišćavana PCI metodom. Na ovakav način izolovani i prečišćeni DNK restrikcioni fragmenti su korišćeni za ligacije ili kao probe za hibridizaciju.

## 9. "SOUTHERN" HIBRIDIZACIJA

### 9. 1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane

Po završenoj elektroforezi DNK je prenošena na najlonske membrane po metodi Southern-a (1975). Da bi se olakšao prenos i velikih DNK fragmenata, po završetku elektroforeze, agarozni gel je tretiran 0.25M HCl tokom 15 min, da bi se ostvarilo delimično cepanje DNK uzrokovano depurinacijom. Gel je zatim ispiran u destilovanoj vodi, a denaturacija DNK je vršena potapanjem gela 2 puta po 15 min u rastvor koji sadrži 0.5M NaOH i 1.5M NaCl (denaturacioni rastvor). Najlonska membrana (Gene screen filter) na koju će DNK biti prenet, je potapana na kratko u vodu, a zatim u denaturacioni rastvor. Pre transfera gel je neutralisan u neutralizacionom puferu (1.5M NaCl, 1M Tris-HCl pH7.5) 2 puta po 20 min. Pripremani su listovi Whatman 3MM filter papira. Dva lista 3MM papira, većeg od gela, su potapani u 10xSSC pufer (1.5M NaCl, 0.15M Na-citrat) i slagani jedan na drugi. Na njih je stavljan tretiran gel, tako da mu je strana sa DNK bila okrenuta na gore, a oko gela su stavljeni graničnici. Na njega je stavljana najlonska membrana dimenzija kao i sam gel i preko nje još dva navlažena 3MM papira. Pri stavljanju papira vodjeno je računa da ne ostanu mehurići vazduha zarobljeni medju njima. Preko svega je stavljan 10 cm debeo sloj upijajućeg papira i sve je ravnomerno opterećeno tegom od 1 kg. Transfer je vršen preko noći u 10xSSC puferu (1.5M NaCl, 0.15M Na-citrat).

Posle završenog transfera najlonska membrana je skidana i potapana u 5 x SSC 2 puta po 15 min. Prosušena membrana je stavljana izmedju dva 3MM papira i pečena 2h na 80°C.

## 9. 2. Obeležavanje DNK metodom "Nick-Translacije"

Za obeležavanje DNK probe je korišćen Gibco BRL "Bio Nick Labeling System". U 1  $\mu\text{g}$  probe su dodavani dNTP smeša i DNK polimeraza I. Dobijena smeša je inkubirana 1h na 16°C. U cilju uklanjanja neugradjenih obeleženih nukleotida DNK je precipitirana etanolom. Proba je resuspendovana u sterilisanoj bidestilovanoj vodi. Pre hibridizacije proba je denaturisana kuvanjem 10 min na 100°C.

## 9. 3. Hibridizacija DNK

Hibridizacija DNK sa neradioaktivno obeleženim probama je vršena na sledeći način: filteri su pakovani u kesice i inkubirani 1-2h na 65°C u 10 ml hibridizacionog pufera (0.1% N-lauril sarkozil, 0.02% SDS, 1% "bloking" reagens). Nakon toga, u kesice je sipano po 0.1 ml svežeg hibridizacionog pufera na  $\text{cm}^2$  membrane i prethodno obeležena i denaturisana proba. Hibridizacija je radjena 16h na 65°C. Pranje probe sa filtera je radjeno takodje na 65°C.

Za detekciju hibrida korišćen je Gibco BRL "PhotoGene Detection System". Proces detekcije uključuje tri osnovna koraka: 1. hibridizacija biotinom obeležene probe sa DNK imobilisanom na membrani; 2. vezivanje streptavidin alkalne fosfataze konjugata (SA-AP) za biotinske grupe; 3. inkubiranje membrane sa supstratom za alkalnu fosfatazu koji daje luminescenciju kada se defosforiliše.

Pranje filtera i detekcija hibrida su vršeni po uputstvu proizvođača (Gibco BRL).

## 10. TRANSFORMACIJA ĆELIJA SA DNK

### 10. 1. Transformacija *E. coli* elektroporacijom

Za dobijanje ćelija spremnih za elektroporaciju noćna kultura bakterija je razblažena 100 puta u LB medijumu i inkubirana na 37°C uz aeraciju do logaritamske faze rasta ( $OD_{600}=0.5-0.8$ ). Talog bakterija je dva puta ispiran u sterilnoj bidestilovanoj vodi i resuspendovan u 200  $\mu$ l vode (takodje sterilne i bidestilovane). Ovako pripremljenim ćelijama dodavano je 0.1-1  $\mu$ g plazmidne DNK ili PCI procedurom prečišćene ligacione smeše, suspenzija je mešana i prebacivana u kivete za elektroporaciju dijametra 0.2 cm. Električni puls je radjen u GENE PULSER aparatu (Eppendorf, Electropotator 2510) sa podešenim uslovima od 12.5 kV/cm, 25  $\mu$ F i 200  $\Omega$ . Odmah zatim pulsirana suspenzija ćelija je prebacivana u epruvete i dodavan joj je medijum za regeneraciju (2% tripton, 0.5% ekstrakt kvasca, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM glukoza). Nakon toga smeša je inkubirana 1 sat na 37°C uz aeraciju, posle čega je regenerisana transformaciona smeša razmazivana na selektivnu čvrstu podlogu.

### 10. 2. Transformacija laktibacila elektroporacijom

Transformacija soja BGRA43 radjena je po modifikovanoj metodi koju su opisali Topisirović i autori (1991). Iz prekonocne kulture, rasle u MRS medijumu, zasejan je 1% inokulum bakterija u 10 ml svežeg MRS medijuma sa 2% glicinom. Kultura je inkubirana na 37°C do dostizanja logaritamske faze rasta ( $OD_{600}=0.5-0.8$ ). Bakterije su nakon toga obarane centrifugiranjem 10 min na 7000 rpm i temperaturi od 4°C u Sorvall centrifugi. Od ovog momenta svi dalji koraci radjeni su na ledu. Talog



bakterija je dva puta ispiran istim volumenom sterilnog rastvora HEB-a (272mM saharoza, 8mM Hepes-KOH, pH 7.4) i resuspendovan finalno u 100  $\mu$ l HEB pufera (takodje sterilnog i ohladjenog). U ovako pripremljene ćelije dodavan je 1  $\mu$ g plazmidne DNK, suspenzija je mešana lagano, a zatim prebacivana u kivete za elektroporaciju dijametra 0.2 cm. Električni puls je radjen u GENE PULSER aparatu (Bio-Rad Laboratories) sa podešenim uslovima od 6.25kV/cm, 25  $\mu$ F i 200  $\Omega$ . Odmah zatim pulsirana suspenzija ćelija je prebacivana u epruvete i dodavan joj je medijum za regeneraciju (MRS medijum koji sadrži 10mM MgCl<sub>2</sub> i 20mM saharozu). Nakon 5 sati regeneracije, transformaciona smeša je razmazivana na selektivne čvrste podloge koje su inkubirane na 37°C u anaerobnim uslovima, do pojave transformanata.

## 11. SEKVENCIRANJE DVOLANČANE DNK

Redosled nukleotida u DNK je odredjivan po metodi koju su opisali Sanger i autori (1977). Metoda se zasniva na sposobnosti Klenow fragmenta polimeraze I, odnosno T7 polimeraze, da nadovezujući se na prajmer sintetiše komplementarni lanac DNK koristeći jednolančanu hibridnu DNK kao matricu. Reakcija sinteze komplementarnog lanca se zaustavlja ugradjivanjem ddNTP koji nemaju 3'-OH grupu neophodnu za izduživanje lanca. Protokol i reagensi za sekvenciranje su korišćeni po preporuci proizvođača (USB, Lucern, Švajcarska). Sekvenciranje je radjeno sa denaturisanim plazmidima kao matricom.

### 11. 1. Denaturisanje plazmidne DNK

Plazmidna DNK (3-5  $\mu$ g) rastvarana je u 20  $\mu$ l vode. Dodavano je 2  $\mu$ l 2M NaOH, 2mM EDTA i inkubirano 30 min na 37°C. Rastvor je neutralisan sa 3  $\mu$ l 3M Na-acetata pH 4.5. Posle dodavanje 7  $\mu$ l vode DNK je precipitirana sa 75  $\mu$ l hladnog

etanola (96%, -20°C), inkubacijom 15 min na -70°C i centrifugiranjem 20 min na 4°C (13000 rpm, BiofugaA). Denaturisana plazmidna DNK je resuspendovana u 7 µl vode.

### 11. 1. 1. Vezivanje matrice i prajmera i reakcije sekvenciranja

Na ovaj način pripremljena DNK je ulazila u reakciju sparivanja sa odgovarajućim oligonukleotidnim prajmerom koji je komplementaran određenoj sekvenci na vektorskoj DNK. Oko 1 µg DNK je pomešano sa 2-5 ng prajmera u odgovarajućem puferu i inkubirano 30 min na 37°C. U reakciju je zatim dodata smeša nukleotida i 0.5 µl  $\alpha$ -<sup>35</sup>S tio-dATP (Amersham) (spec. akt. >1000Ci/mmol) i Sequenase (1U, USB). Reakciona smeša je zatim podeljena u 4 mikrotube u koje su prethodno dodati različiti dideoksinukleotidi. Reakcije su zaustavljane dodavanjem pufera za nanošenje na akrilamidnu gel elektroforezu (formamid, EDTA, bromfenol plavo i ksilen cijanol). Uzorci su kuvani 2 min na 75°C i čuvani na -20°C do nanošenja na gel.

Za analizu reakcija je korišćen denaturišući 6%, urea poliakrilamidni gel.

### 11. 2. Sekvenciranje DNK na “ALF-express”

Metoda se zasniva na automatskom sekvenciranju pri čemu je DNK obeležena Cy5 bojom koja se laserski detektuje na “ALF-express” (Amersham Pharmacia). U reakcijama sekvenciranja je korišćen Cy5-obeleženi prajmer ili Cy5-obeleženi dATP (Cy5-dATP labelling mix, Amersham Pharmacia). Protokol i reagensi za sekvenciranje su korišćeni po preporuci proizvođača (AutoRead 200 sequencing kit, Amersham Pharmacia). Produkti reakcija sekvenciranja su nanošeni na komercijalni gel - Repro Gel Long Read (Amersham Pharmacia). Korišćeni su uslovi elektroforeze po savetu proizvođača (1500 V, 55°C, 750 min). Po završenoj elektroforezi sekvenca je analizirana programom “ALFwin Sequence Analyser”.

### 11. 2. 1. Reakcije sekvenciranja pomoću Cy5-obebeženog prajmera

Plazmidnoj DNK (1.5 µg/1000 bp) rastvorenoj u 10 µl vode je dodato 2 µl Cy5-obebeženog prajmera (4-6 pmol, 20 ng). Denaturacija je izvršena dodavanjem 1.5 µl 1M NaOH i inkubiranjem 5 min na 65°C. Odmah nakon denaturacije je dodavano 1.5 µl 1M HCl i 2 µl "annealing" pufera i dobijena smeša je inkubirana najmanje 1 min na 37°C. Nakon inkubacije je dodavano 1 µl "Extension" pufera, 3.5 µl DMSO (35 % rastvor) i 2 µl T7 polimeraze (6-8 jedinica/2 µl). Reakciona smeša je zatim podeljena u 4 mikrotube u koje su prethodno dodati i preinkubirani na 37°C različiti dideoksinukleotidi. Nakon inkubacije na 37°C, u trajanju od 5 min, reakcije su zaustavljane dodavanjem "Stop" pufera za nanošenje na akrilamidnu gel elektroforezu. Neposredno pre nanošenja na gel uzorci su denaturisani 2-3 min na 90°C.

## 12. ISPITIVANJE PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI

### 12. 1. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti celih ćelija prirodnih izolata

Analiza proteolitičke aktivnosti celih ćelija prirodnih izolata u odnosu na proteinske supstrate je vršena modifikovanom metodom koju su razvili Hill i Gasson (1986). Soj je zasejavan na petri šolje sa mlečno-citratnim agarom (MCA) tako da se na površini podloge dobije ravnomeran bakterijski film. Posle inkubacije od 48 sati na 37°C ćelije su sakupljane ezom i prenošene u mikrotube, a zatim resuspendovane u 0.1M Na-fosfatnom puferu pH 7.2 pri čemu je na 1 mg ćelija dodavano 15 µl pufera. Kao supstrati u digestijama korišćeni su  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazein. Svi proteinski supstrati su bili rastvoreni u puferu u koncentraciji od 5 mg/ml. Digestija supstrata je vršena na

40°C, pri čemu su suspenzija ćelija i rastvor supstrata mešani u odnosu 1:1. Po isteku predviđenog vremena ćelije su odstranjivane centrifugiranjem 5 min na 13000 rpm u BiofugiA na sobnoj temperaturi. Supernatantu je zatim dodavan isti volumen 2 x koncentrovanog pufera za uzorak (125mM Tris pH 6.8, 10mM EDTA, 4% SDS, 25% glicerol, 5%  $\beta$ -merkaptotanol i 0.07% bromfenol plavo). Uzorci su inkubirani 3 min na 100°C i analizirani na SDS-polikrilamidnoj gel elektroforezi.

Prilikom ispitivanja uticaja pH vrednosti na proteolitičku aktivnost, suspenzije ćelija su pravljene u 0.1M Na-fosfatnom puferu različitih pH (pH 5.4, 5.7, 6.5 i 7.2) kao i u 0.1M Tris-HCl puferu pH 8 i 8.7. Rastvori supstrata za digestije ( $\beta$ -kazein) su pravljene u istim puferima, u koncentraciji od 5 mg/ml. U digestionim smesama, suspenzije ćelija (1 mg ćelija na 10  $\mu$ l pufera) su pomešane sa rastvorima supstrata odgovarajućih pH vrednosti u zapreminskom odnosu 1:3. Digestije supstrata su vršene na 40°C, a po završenoj digestiji uzorci su centrifugirani 5 min na 13000 rpm u BiofugiA na sobnoj temperaturi. Proteini u dobijenom supernatantu su zatim precipitirani dodavanjem 1/2 volumena 50% trihlorsirćetne kiseline pri čemu je precipitacija vršena 30 min na ledu (0°C). Istaloženi proteini su odstranjivani centrifugiranjem 10 min na 13000 rpm u BiofugiA na 4°C, a koncentracija produkata hidrolize supstrata, odnosno TCA solubilnih oligopeptida je u supernatantu određivana Lowry-jevom metodom (1951). Za određivanje koncentracija u uzorcima korišćena je standardna kriva napravljena na osnovu merenja vrednosti apsorpcije svetlosti u seriji rastvora BSA poznatih koncentracija. Za arbitrarnu jedinicu (AU) proteolitičke aktivnosti uzeta je količina enzima koja u reakciji oslobodi 1 $\mu$ g TCA-solubilnih fragmenata za 1 sat, a proteolitička aktivnost je izračunavana iz razlike koncentracija ovih produkata u uzorku pre i posle završene digestije. Utvrđivanje optimalnih temperatura za aktivnost celih ćelija je vršeno na isti način, s tim što su suspenzije ćelija pravljene u 0.1M Na-fosfatnom puferu pH 7.2 a digestije supstrata vršene na 25, 30, 37, 42, 50 i 60°C.

Za ispitivanje uticaja inhibitora na aktivnost proteinaza reakcionoj smeši su dodavani inhibitori sledećih koncentracija: pepstatin (0.2mM), kao inhibitor aspartičnih proteinaza, PMSF (10mM) kao inhibitor serinskih proteinaza i 1,10 fenantrolin (2mM) kao inhibitor metaloproteinaza (koje poseduju  $Zn^{++}$  u katalitičkom centru ).

## 12. 2. Dobijanje aktivnog proteinaznog ekstrakta

Aktivan proteinazni ekstrakt je dobijen ispiranjem ćelija koje su rasle na MCA podlozi, ili taloženjem  $NH_4$ -sulfatom iz supernatanta tečnih kultura.

Ćelije sa MCA podloge su sakupljane ezom u mikrotube (100 do 200 mg) i resuspendovane u 0.1M Na-fosfatnom puferu pH 6.5 ili u Tris- $Ca^{++}$  puferu (50mM Tris, 25mM  $CaCl_2$ , pH 6.5) u odnosu 1 $\mu$ l pufera na 1mg/ćelija. Suspenzija ćelija je inkubirana 30 min na 40°C, a zatim centrifugirana 5 min na 13000 rpm u BiofugiA na sobnoj temperaturi. Supernatant je prebačen u nove epruvete, a postupak pranja ćelija je ponovljen još jednom i dobijeni supernatant je spojen sa prethodnim. Ovako dobijen proteinazni ekstrakt je korišćen za testiranje proteolitičke aktivnosti.

### 12. 2. 1. Ispitivanje aktivnosti proteinaznih ekstrakata

Aktivnost proteinaznih ekstrakata testirana je na sličan način kao proteolitička aktivnost celih ćelija. Dobijeni proteinazni ekstrakti su pomešani sa supstratom ( $\beta$ -kazein, 5 mg/ml, u 0.1M Na-fosfatnom puferu pH 6.5 ili u 50mM Tris, 25mM  $CaCl_2$ , pH 6.5) i inkubirani na 40°C. Zapreminski odnosi enzimskog ekstrakta i rastvora supstrata su određivani u odnosu na proteolitičku aktivnost testiranog soja. Iz reakcione smese su u određenim vremenskim intervalima uzimani uzorci u kojima je reakcija zaustavljena dodavanjem iste zapremine 2x koncentrovanog pufera za uzorak. Posle

inkubacije od 3 minuta na 100°C, uzorci su analizirani na SDS - poliakrilamidnoj gel elektroforezi.

### 12. 3. Elektroforeza na SDS - poliakrilamidnom gelu

Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu je korišćena za razdvajanje proteina i produkata njihove hidrolize. Elektroforeza je rađena prema metodi koju je opisao Laemmli (1970). Na aparaturi za vertikalnu elektroforezu (Gibco BRL) korišćen je diksontinuirani sistem gela, koji se sastojao od gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje. Debljina gela je iznosila 1.5 mm. Gel za koncentrovanje sadrži 6% akrilamid, 0.2 % bisakrilamid, 0.125M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% temed i 0.005% amonijum persulfat. U sastav gela za razdvajanje ulaze akrilamid i bisakrilamid u odnosima 15% prema 0.5% ili 10% prema 0.33%, zatim 0.375M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% temed i 0.05% amonijum persulfat. Gel za razdvajanje zauzima oko 4/5 ukupne zapremine i polimerizovan je 2 sata pre elektroforeze, dok je gel za koncentrovanje nalivan 30 min pre elektroforeze. U sastav pufera za elektroforezu ulaze 0.025M Tris baza, 0.192M glicin i 0.1% SDS, a finalna pH vrednost iznosi 8.3. Elektroforeza se odvijala pri konstantnoj jačini struje od 15 mA kroz gel za koncentrovanje i 30 mA kroz gel za razdvajanje. Po završenoj elektroforezi, kada indikatorska boja (bromfenol plvo) dođe do 0.5 cm od donje ivice gela, sa ploče za elektroforezu je odstranjivan gel za koncentrovanje. Fiksiranje i bojenje gelova za razdvajanje je vršeno u rastvoru koji sadrži 45% metanola, 47% vode, 8% sirćetne kiseline i 0.5% Coomassie brilliant blue R250. Bojenje gelova je vršeno u trajanju od 3 do 4 sata ili preko noći, uz mešanje. Odbojavanje gelova je vršeno u rastvoru koji sadrži 10% metanola, 82% vode i 8% sirćetne kiseline uz mešanje i promenu rastvora za odbojavanje na 2 do 3 sata. Regeneracija rastvora za odbojavanje vršena je njegovim

propuštanjem kroz aktivni ugalj koji za sebe vezuje Coomassie brilliant blue R250. Po završenom odbojvanju u gelovi su čuvani u rastvoru sirćetne kiseline (8%).

### 13. ANTIMIKROBIJALNI ESEJI

Za detekciju sinteze antimikrobijalnih supstanci korišćen je difuzioni metod u bunarčićima. Eksperiment je radjen teko što su petri šolje sa čvrstom MRS podlogom prelivane sa 5 ml soft (0.7%) GM17 ili MRS agara, u kome je inokulisano oko  $10^5$  ćelija indikatorskog soja/ml medijuma. U soft agaru su pravljene bunarčiči prečnika 5 mm u koje je sipano 100  $\mu$ l 9, 12 ili 16 sati stare O/N kulture potencijalnog producenta bakteriocina. Osim sa punom O/N kulturom eksperiment je radjen i sa 100  $\mu$ l supernatanta (oslobodjenog od ćelija centrifugiranjem), a uzorci su takodje testirani nakon 9, 12 i 16 sati rasta bakterija na temperaturi od 37°C. Prisustvo antimikrobijalnih supstanci je detektovano na osnovu pojave svetle zone oko bunarčića, kao posledice inhibicije rasta senzitivnog bakterijskog soja.

Za ispitivanje bakteriocinske aktivnosti na samu ivicu bunarčića dodavan je kristal pronaze E. Da bi eliminisali potencijalni inhibicioni efekat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uzorci su tretirani katalazom. Inhibicioni efekat na rast bakterije *Clostridium sporogenes* je praćen tako što je sulfitni agar inokulisan sa 1% kulture *Clostridium sporogenes* (48 h). Na površinu sulfitnog agara dodavano je 4 ml soft MRS agara koji je sadržao oko  $10^5$  ćelija bakterijskog soja čija se antimikrobijalna aktivnost ispituje, a rezultati su očitavani nakon 48 sati gajenja na temperaturi od 37°C.

## 14. ISPITIVANJE PROBIOTIČKIH SVOJSTAVA

### 14. 1. Preživljavanje u uslovima niske pH vrednosti

Sposobnost preživljavanja bakterijskog soja u uslovima niske pH vrednosti radjena je po metodi koju je predložilo Conway (1996). U 9 ml fiziološkog rastvora, sa podešenim pH vrednostima (pH 1.5, 2 i 3) dodavan je 1 ml prekonoćne kulture ispitivanog soja. Određivan je broj ćelija, titriranjem na petri šolji, u momentu kada je kultura dodata i nakon 30 minuta, 1, 2 i 3 sata inkubacije na 37°C. Kao kontrola u svim slučajevima korišćen je fiziološki rastvor pH 6.5.

### 14. 2. Preživljavanje u prisustvu različitih koncentracija žučnih soli

U ovom eksperimentu praćeno je preživljavanje bakterija u MRS-u koji sadrži 0.3%, govedje žuči (Torlak). U MRS medijum sa 0.3% žučnih soli zasejavan je 2%, 5% i 10% inokulum prekonoćne kulture bakterija. Kao kontrola korišćen je MRS medijum bez govedje žuči. Broj preživelih bakterija je određivan nakon 16 i 32 sata od inokulisanja, titriranjem na petri šoljama.



### III REZULTATI

#### 1. Izolacija, karakterizacija i identifikacija prirodnog izolata BGRA43

Soj BGRA43 je prirodni izolat poreklom iz intestinalnog trakta čoveka. Izolovan je klasičnim mikrobiološkim metodama za izolaciju laktobacila (MRS i Rogoza medijum). To je Gram-pozitivna, nesporogena bakterija ćelija izduženih, pojedinačnih ili povezanih u lance. Osnovne fiziološke i biohemijske karakteristike prirodnog izolata BGRA43 sumirane su u tabeli 7.

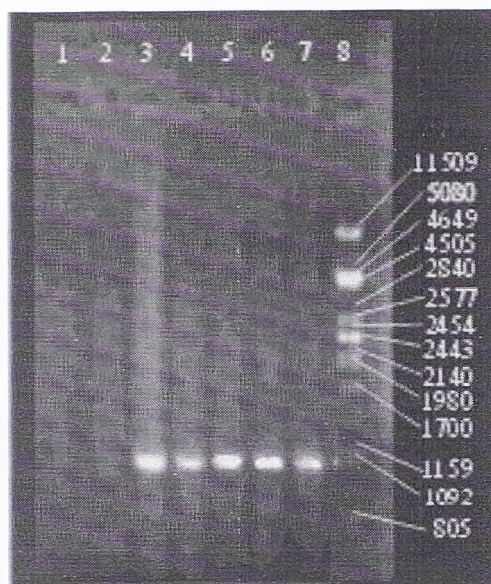
Tabela 7. Fiziološke i biohemijske karakteristike prirodnog izolata BGRA43.

soj	pasaj	rast u medijumu sa 6,5% NaCl	rast u medijumu sa 4% NaCl	rast u medijumu sa 2% NaCl	rast na 15°C	rast na 45°C	katalaza test	rast u aerobnim uslovima	rast u anaerobnim uslovima	spособnost produkcije amonijaka iz arginina
BGRA43	1.	-	-	+	-	+	-	-	+	-
	2.	-	-	+	-	+	-	-	+	-
	3.	-	-	+	-	+	-	-	+	-
soj	antimikrobijalna aktivnost	proteinska aktivnost	sinteza egzopolisaharida	spособnost formiranja gruša	sinteza diacetila	samoadgregacija (tokom rasta u tečnom medijumu)				
BGRA43	+	+	-	+	-	+				

Iz tabele se može videti da prirodni izolat BGRA43 raste u MRS medijumu koji sadrži 2% soli, ali ne i sa 6.5% i 4% što je jedna od osnovnih karakteristika sojeva

*Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus helveticus*. Izolat nema sposobnost rasta na 15°C, dok na temperaturama od 37°C i 45°C raste dobro i nakon tri sukcesivna presejavanja. Najbolji rast bakterije ovog soja postižu u anaerobnim uslovima pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od oko 10%, dok u aerobnim uslovima uopšte ne rastu. Veoma brzo rastu u mleku dajući homogen grušu, pri čemu pH mleka obaraju na 4.5 nakon samo 6 sati od inokulacije. Preliminarni rezultati su pokazali da je proteinazna aktivnost ovog soja pozitivna što verovatno doprinosi ovako brzom rastu i obaranju pH. Preliminarnim analizama, takodje je potvrđeno da bakterije ovog soja pokazuju i antimikrobijalnu aktivnost, što će detaljnije biti opisano kasnije u rezultatima. U cilju potpunije karakterizacije ovog soja analiziran je njegov plazmidni sastav. Klasičnom metodom za izolaciju plazmida iz laktobacila ustanovljeno je postojanje jednog plazmida veličine oko 2.4 kb (pRA1). U ponovljenom postupku izolacije plazmidne DNK, pri kojem je korišćena metoda za izolaciju velikih plazmida sa malim brojem kopija, dobijen je isti rezultat, tako da se može zaključiti da soj poseduje samo plazmid pRA1, koji se stabilno replikuje i zadržava u ćeliji i nakon 10 sukcesivnih presejavanja.

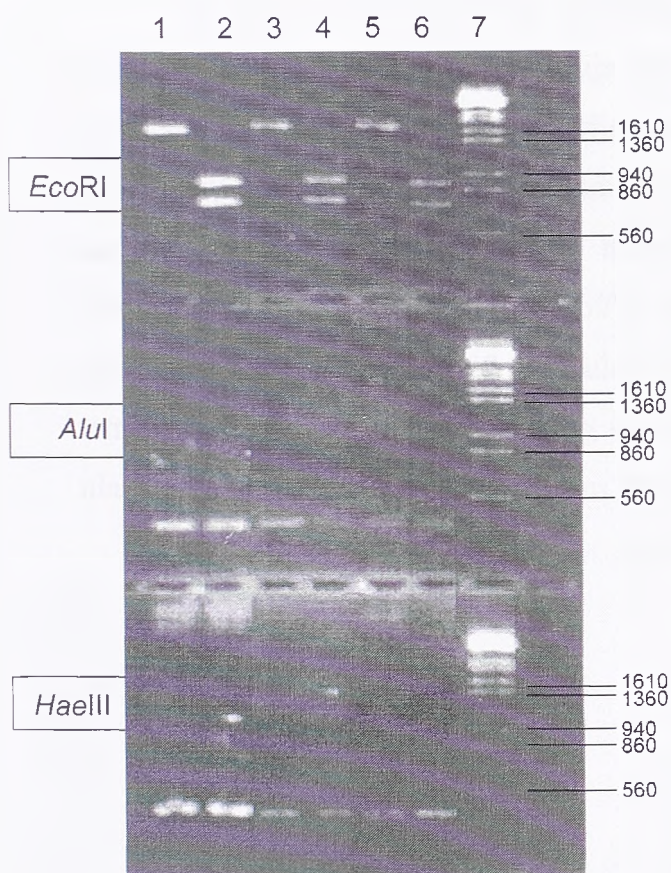
U cilju potvrđivanja da izolat BGRA43 pripada rodu *Lactobacillus* uradjena je PCR reakcija sa prajmerima P1<sub>16S</sub> i P2<sub>16S</sub>, koji su dizajnirani na osnovu sekvence gena za 16S rRNK, a koji su visoko specifični za rod *Lactobacillus*. Kao pozitivne kontrole u eksperimentu korišćene su DNK vrsta *Lactobacillus paracasei* BGHN14, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, ATCC4357, *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 kao i negativna kontrola *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363 (Slika 6).



Slika 6. PCR produkti dobijeni umnožavanjem pomoću prajmera P1<sub>16S</sub> i P2<sub>16S</sub>. 1. PCR smeša bez DNK, 8. standard  $\lambda$ PstI. Kao matrice u PCR smeši korišćene su totalne DNK izolovane iz sledećih sojeva: 2. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363, 3. prirodni izolat BGRA43, 4. *Lactobacillus paracasei* BGHN14, 5. *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, 6. *Lactobacillus acidophilus* ATCC4357, 7. *Lactobacillus helveticus* CNRZ32.

Identifikacija prirodnog izolata BGRA43 do nivoa vrste je preliminarno izvršena na osnovu analize sposobnosti fermentacije različitih šećera korišćenjem API 50-CH-L sistema (Materijal i metode). Na osnovu dobijenih rezultata izolat je prvobitno okarakterisan do nivoa vrste kao *Lactobacillus acidophilus*. Jedina razlika između ove vrste i prirodnog izolata BGRA43 je u tome što prirodni izolat BGRA43 nije pokazivao sposobnost fermentacije fruktoze. Da bi se potvrdila definitivna pripadnost određenoj vrsti moralo se pristupiti molekularno genetičkoj determinaciji soja. U tu svrhu su fragmenti, dobijeni u PCR reakciji umnožavanjem 16S rRNK regiona uz pomoć prajmera 16-01 i 16-02, isečeni uz pomoć restrikcionih enzima *EcoRI*, *AluI* i *HaeIII*. Upoređivanjem restrikcionog obrasca produkata dobijenih nakon digestije PCR fragmenata kod izolata koji se ispituje, sa restrikcionim mapama referentnih

sojeva, pokušala se dodatno utvrditi njegova pripadnost određenoj vrsti. Na slici 7 prikazani su rezultati dobijeni nakon ARDRA analize.



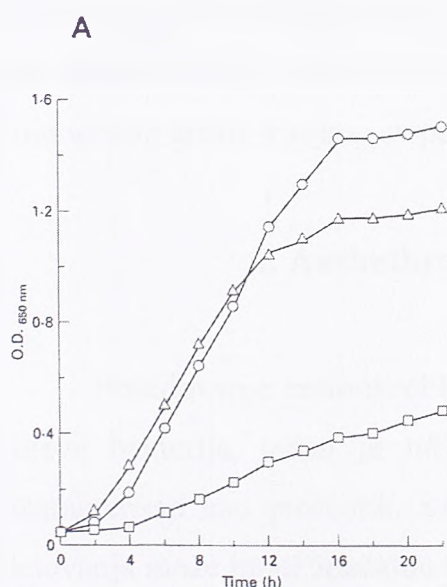
Slika 7. Analiza DNK fragmenata dobijenih nakon ampifikacije dela 16S rRNK pomoću prajmera 16-01 i 16-02 i restrikcije enzimima *EcoRI*, *AluI* i *HaeIII* enzima (ARDRA) kod prirodnog izolata BGRA43 i referentnih sojeva.

1. prirodni izolat BGRA43,
2. *Lactobacillus helveticus* CNRZ32,
3. *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356,
4. *Lactobacillus acidophilus* ATCC4357,
5. *Lactobacillus acidophilus* ATCC33200,
6. *Lactobacillus helveticus* Cu 40,
7. standard  $\lambda$  H/E.

S obzirom da rezultati ovog eksperimenta nisu rešili nedoumicu da li se radi vrsti *Lactobacillus acidophilus* ili *Lactobacillus helveticus* definitivna determinacija soja je utvrđena nakon RAPD analize koja je uradjena u mikrobiološkoj laboratoriji za identifikaciju bakterija (BCMM/LMG Bacteria Collection, University of Gent), gde je potvrđeno da prirodni izolat BGRA43 pripada vrsti *Lactobacillus helveticus*.

## 1. 1. Utvrđivanje optimalne temperature rasta

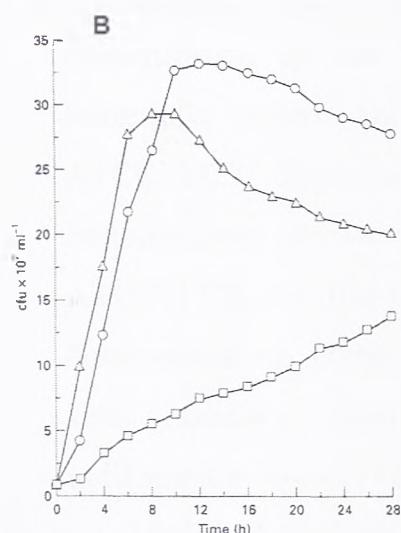
Prvi preliminarni rezultati ispitivanja rasta soja BGRA43 pokazali su da je on termofilni izolat. U cilju utvrđivanja optimalne temperature za rast ovog soja, 0.1% inokulum prekončne kulture bakterija zasejavan je u svež MRS medijum, nakon čega su bakterije gajene na temperaturama od 30°C, 37°C i 42°C. Rast bakterija je praćen narednih 24 sata, merenjem OD<sub>650</sub> na svaka 2 sata (Slika 8). Utvrđeno je da soj u MRS medijumu na temperaturi od 37°C najbrže ulazi u log fazu, ima najkraće vreme generacije (1.72) i nakon 12 sati ulazi u stacionarnu fazu rasta (OD<sub>650</sub> - 1.2). Na temperaturi od 42°C, bakterije ovog soja imaju duži log period i nakon 14 sati rasta ulaze u stacionarnu fazu rasta, s tim što postižu nešto veću brojnost po ml kulture u odnosu na rast na 37°C.



Slika 8. Kriva rasta soja *Lactobacillus helveticus* BGRA43 u MRS medijumu.  
□ - 30°C, Δ - 37°C, ○ - 42°C.

Na sličan način je praćen rast ovog soja i u 10% obranom mleku. Iz prekončne kulture bakterija rasle u MRS-u, zasejan je 0.1% inokulum u 10% sterilno obrano mleko. Rast bakterija praćen je svaka 2 sata, narednih 28 sati, a broj bakterija određivan titiranjem odgovarajućih razblaženja na petri šolje (Slika 9). Utvrđeno je

da prirodni izolat BGRA43 u mleku najbolje raste na temperaturi od 42°C, kao i da broj bakterija nakon samo 6 sati rasta na ovoj temperaturi iznosi  $3 \times 10^8$  cfu/ml<sup>1</sup>.



Slika 9. Kriva rasta soja *Lactobacillus helveticus* BGRA43 u 10% obranom mleku.  
 □ - 30°C, Δ - 37°C, o - 42°C.

U isto vreme praćena je i brzina obaranja pH vrednosti tokom rasta u 10% obranom mleku na temperaturi od 42 °C. Utvrđeno je da, nakon 6 sati rasta u mleku, pH vrednost mleka opada sa 6.62 na 4.53 pri čemu, za isto vreme, dolazi do formiranja homogenog gruša, visokog stepena viskoznosti.

## 2. Antimikrobijalno delovanje soja BGRA43

Posedovanje antimikrobijalne aktivnosti nekog soja, naročito protiv patogenih sojeva bakterija, jedan je od kriterijuma koji soj treba da zadovolji da bi bio okarakterisan kao probiotik. Sa druge strane, utvrđivanje spektra antimikrobijalnog delovanja može imati značajnu ulogu ukoliko se potencijalni probiotik želi iskoristiti u procesima proizvodnje u prehrambenoj industriji. Antimikrobijalno delovanje prirodnog izolata BGRA43 testirano je nalivanjem 100μl pune bakterijske kulture, stare 9, 12 i 16 h, u predhobno pripremljene bunarčice oko kojih se već nalazio nanešen indikator soj. Testiranje je preliminarno izvršeno na nekoliko srodnih

indikatorskih sojeva - *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NS1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NP45, *Lactobacillus casei* ATCC393, *Lactobacillus plantarum* A112 i u svim slučajevima je utvrđeno da soj BGRA43 inhibira rast ovih sojeva. Nakon ovog eksperimenta, na isti način, testirana je i antimikrobijalna aktivnost na druge bakterijske sojeve kao što su: *Escherichia coli* C600, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus* ATCC Met<sup>f</sup>, *Streptococcus pneumoniae* ATCC496, *Streptococcus pneumoniae* ATCC276, *Bacillus subtilis* ATCC8, *Bacillus cereus* ATCC11778, *Bacillus mycoides*, *Micrococcus flavus* ATCC10240, *Pseudomonas* sp. i *Salmonellae* sp. Torlak. Inhibitorni efekat soja BGRA43 se ogledao u pojavi svetlih zona različitog dijametra oko bunarčića, kao posledice nemogućnosti rasta indikatorskih sojeva (Tabela 8).

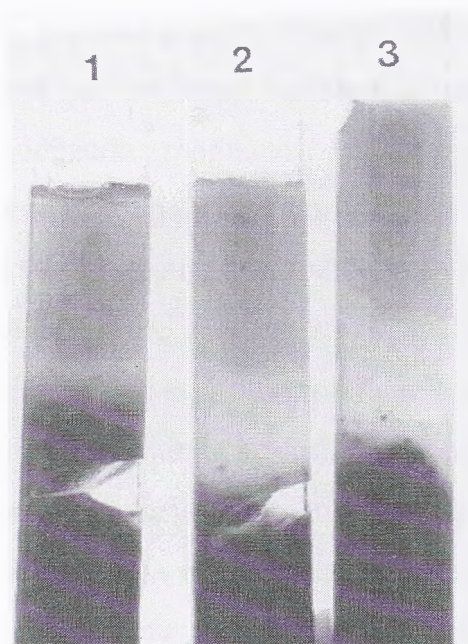
Tabela 8. Antimikrobijalna aktivnost soja *Lactobacillus helveticus* BGRA43.

Indikator soj	BGRA43
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NS1	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NP45,	+
<i>Lactobacillus casei</i> NCDO393	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> A112	+
<i>Escherichia coli</i> C600	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	+++
<i>Staphylococcus</i> ATCC Met <sup>f</sup>	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC496	+++
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC276	+++
<i>Pseudomonas</i> sp.	+++
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC8	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	+
<i>Bacillus mycoides</i>	+++
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC10240	-
<i>Salmonellae</i> sp. Torlak kol.	-

dijametar zone inhibicije - + do 2 mm, ++ do 4 mm, +++ preko 4 mm

Prikazani rezultati su dobijeni iz tri nezavisno ponovljena eksperimenta.

U eksperimentima koji su uradjeni na sulfitnom agaru je pokazano da soj BGRA43 ispoljava inhibitorni efekat i na rast bakterije *Clostridium sporogenes*. Utvrđeno je da, u prisustvu bakterijske kulture BGRA43 dolazi do potpune inhibicije rasta klostridija (Slika 10).



Slika 10. Inhibicija rasta bakterije *Clostridium sporogenes*. 1. Sulfitni agar koji sadrži kulturu klostridija, preliven MRS-top agarom, 2. Sulfitni agar koji sadrži kulturu klostridija, preliven BGRA43 kulturom u MRS-top agaru, 3. Sulfitni agar koji sadrži kulturu klostridija, preliven BGRA43 kulturom u MRS-top agaru, tretiran katalazom.

Iz tabele 8 se može videti da soj BGRA43 ispoljava inhibitorno delovanje na veliki broj vrsta bakterija i da njegovo antimikrobijalno delovanje nije ograničeno na uzak spektar srodnih vrsta. On deluje na nekoliko vrsta iz rodova *Lactococcus* i *Lactobacillus*, ali mnogo jaču inhibitornu aktivnost ispoljava upravo prema nesrodnim vrstama iz različitih rodova.

U cilju utvrđivanja hemijske prirode jedinjenja koja dovodi do inhibicije rasta ispitivanih sojeva uradjeno je nekoliko dodatnih eksperimenata. Za testiranje da li je



inhibitorna supstanca proteinske prirode urađjen je eksperiment tretmana proteazom tako što je na ivicu bunarčića, nanešen kristal pronaze E. S obzirom da, nakon pojave svetle zone inhibicije, nije došlo i do pojave karakteristične polumesečaste zone u blizini nanošenja kristala isključena je mogućnost da se radi o molekulu proteinske prirode odnosno bakteriocinu. Isti rezultati dobijeni su i kada su kao proteolitički enzimi korišćeni proteinaza K, tripsin i pepsin. Takodje, antimikrobijalna aktivnost je zadržana i u slučajevima kada su kao inhibitori korišćeni lizozim, katalaza, DNK-aza I i RNK-aza I. Da bi se odbacila mogućnost inhibitornog efekta kiseline u eksperimentima je ispitana i antimikrobijalna aktivnost neutralisane pune kulture, stare 9, 12 i 16 sati. Konstatovano je da ne postoji detektabilna razlika u inhibitornom efektu između puferisane i nepuferisane kulture, tj. može se zaključiti da kiselost ili nizak pH nije činilac koji izaziva inhibiciju rasta kod senzitivnih sojeva. Međutim, ukoliko se centrifugiranjem odstrane ćelije iz prekončne kulture, dolazi do potpunog gubitka antimikrobijalne aktivnosti, kako nepuferisanog tako i supernatanta čija je pH vrednost podešena na 7.0. Na osnovu većeg broja eksperimenata ustanovljeno je da samo puna kultura soja BGRA43, bez obzira na svoju starost ispoljava antimikrobijalnu aktivnost.

### 3. Transformacija soja BGRA43

Plazmidom pA1-6 koji, kao selektivni marker nosi gen koji obezbeđuje rezistenciju na eritromicin, transformisan je soj BGRA43. Nakon elektrotransformacije ovim plazmidom, potencijalni transformanti su selektovani na MRS podlozi sa 2.5 µg/ml eritromicina. Dobijeni su transformanti, nakon 48 sati inkubacije, a efikasnost transformacije je iznosila 15 transformanata/µg DNK. Izolovanjem plazmidne DNK iz transformanata potvrđeno je prisustvo plazmida, a restrikcionom analizom proverena je njihova strukturna intaktnost.

## 4. Proteolitička aktivnost soja BGRA43

Eksperimenti u kojima je izučavana brzina rasta soja BGRA43 u obranom mleku pokazala su da on dobro raste u mleku i da je sposoban da za svega 6 sati izazove koagulaciju mleka formirajući homogeni gruš uz izdvajanje bistrog seruma pri čemu dolazi do obaranja pH vrednosti u uzorku koagulisanog mleka na 4.5. Ova pH vrednost poklapa se sa izoelektričnom tačkom na kojoj dolazi do razgradnje kazeinskih micela i koagulacije mleka. Da bi se utvrdilo da soj BGRA43 sintetise ekstracelularnu proteinazu uradjeni su dodatni eksperimenti opisani u narednom poglavlju.

### 4. 1. Utvrđivanje proteolitičke aktivnosti

Prvi test sposobnosti hidrolize proteina mleka soja BGRA43, odnosno utvrđivanja sposobnosti sinteze ekstracelularnih proteinaza, je uradjena analiziranjem sposobnosti hidrolize  $\beta$ -kazeina. Indukcija sinteze eventualno prisutne proteinaze vršena je sukcesivnim gajenjem soja BGRA43 na MCA podlozi, koja sadrži malu količinu slobodnih aminokiselina, i za koju je utvrđeno da ima sposobnost indukcije ovog sistema. Test hidrolize  $\beta$ -kazeina radjen je (preliminarno), sa celim ćelijama u Na-fosfatnom puferu pH 7.2, u trajanju od 5 sati na temperaturi od 40°C, pri čemu je degradacija supstrata uzimana kao pokazatelj prisustva aktivnih ekstracelularnih proteinaza. Produkti hidrolize  $\beta$ -kazeina su analizirani razdvajanjem na 15% SDS-poliakrilamidnom gelu. Na gelu je konstatovano, da je u gore navedenim uslovima, došlo do totalne degradacije  $\beta$ -kazeinske frakcije (Slika 11). Kao pozitivna kontrola u eksperimentu korišćen je soj *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* HN14, dok je Pr<sup>-</sup> soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363 poslužio kao negativna kontrola. Iz

navedenog eksperimenta se može zaključiti da soj BGRA43 poseduje jaku proteolitičku aktivnost celih ćelija koja je najverovatnije posledica sinteze ekstracelularne proteinaze.



Slika 11. SDS-PAGE analiza sposobnosti hidrolize  $\beta$ -kazeinske frakcije uz pomoć celih ćelija. 1.  $\beta$ -kazein, 2. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363, 3. *Lactobacillus helveticus* BGRA43, 4. *Lactobacillus paracasei* HN14.

#### 4. 2. Utvrđivanje supstratne specifičnosti

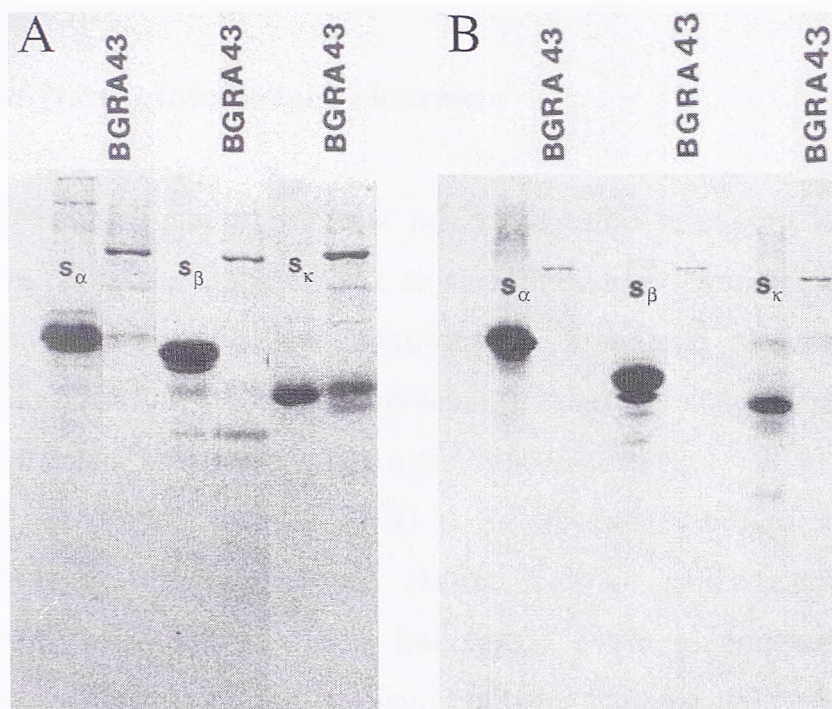
Analiza supstratne specifičnosti proteinaze soja BGRA43 je radjena na isti način kao i u eksperimentu utvrđivanja proteolitičke aktivnosti, sa celim ćelijama, u Na-fosfatnom puferu pH 7.2, u trajanju od 5 sati na temperaturi od 40°C, a kao supstrati korišćene su sve tri kazeinske frakcije pojedinačno. Produkti hidrolize kazeinskih frakcija su i u ovom eksperimentu analizirani razdvajanjem na 15% SDS-poliakrilamidnom gelu. Utvrđeno je da u Na- fosfatnom puferu pH 7.2, nakon 5 sati

inkubacije na temperaturi od 40°C, dolazi do potpune hidrolize  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ - kazeinske frakcije, dok je hidroliza  $\kappa$ - kazeina bila delimična (Slika 12A). Da bi se utvrdilo da li, i pod kojim uslovima, proteinaza soja BGRA43 može efikasnije hidrolizovati i  $\kappa$ - kazeinsku frakciju, pristupilo se utvrđivanju optimalnih uslova (optimalne pH vrednosti i optimalne temperature) za delovanje ove proteinaze.

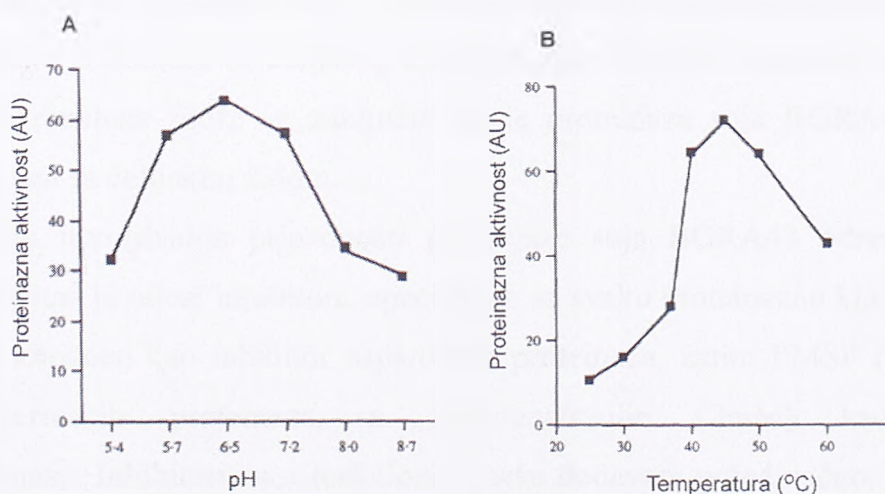
#### **4. 3. Utvrđivanje optimalne pH vrednosti i temperature za delovanja proteinaze**

Za determinaciju pH optimuma za kazeinsku hidrolizu, cele ćelije soja BGRA43 inkubirane su 2 sata na temperaturi od 40°C u Na-fosfatnom puferu pH 5.4, 5.7, 6.5 i 7.2 kao i u Tris- HCl puferu pH 8 i 8.7 (Slika 13A). U paralelnom eksperimentu determinisana je takodje i optimalna temperatura za aktivnost ove proteinaze (inkubacijom u Na - fosfatnom puferu pH 7.2, u trajanju od 2 sata na različitim temperaturama) (Slika 13B). Kao supstrat za proteinazu u ovim eksperimentima korišćena je  $\beta$ - kazeinska frakcija. Proteinazna aktivnost, u ovom testu, izražena je u arbitrarnim jedinicama (AU), što je detaljno opisano u poglavlju Materijal i metode. Nakon preliminarnih eksperimenata za utvrđivanje optimuma proteolitičkih aktivnosti proteinaza soja BGRA43 sa  $\beta$  - kazeinskom frakcijom, ponovljeni su i eksperimenti sa sve tri glavne kazeinske frakcije ( $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ - i  $\kappa$ - kazein).

Rezultati pokazuju da se optimalna aktivnost proteinaze soja BGRA43 ostvaruje na temperaturi od 45°C, u Na - fosfatnom puferu pH 6.5 pri čemu za samo 2 sata dolazi do potpune degradacije sve tri kazeinske frakcije (Slika 12B).



Slika 12. SDS-PAGE nakon hidrolize  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ - kazeinskih frakcija ekstraktom celih ćelija soja BGRA43 u neoptimizovanim uslovima (A) i na optimalnom pH 6.5 i temperaturi 42°C (B). ( $S_{\alpha}$ ) -  $\alpha_{S1}$ - kazein, ( $S_{\beta}$ ) -  $\beta$ - kazein, ( $S_{\kappa}$ ) -  $\kappa$ - kazein.



Slika 13. Aktivnost proteinaze soja BGRA43 u funkciji pH vrednosti (A) i temperature (B).

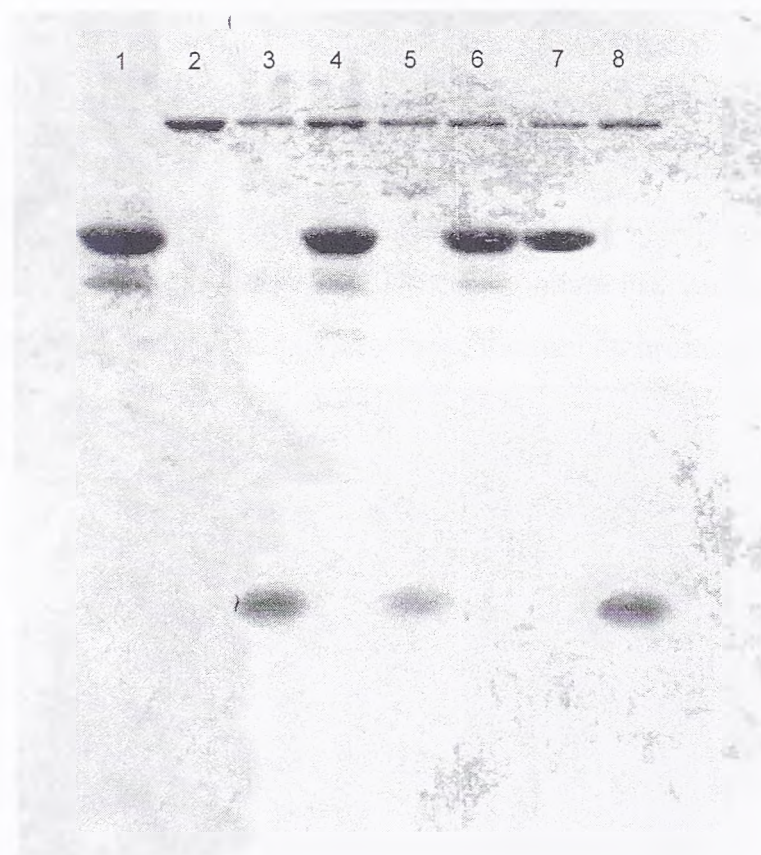
#### 4. 4. Aktivnost proteinaznog ekstrakta

Većina proteinaza bakterija mlečne kiseline je svojim karboksilnim krajem vezana za ćelijsku membranu dok se slobodni amino terminus sa aktivnim centrom nalazi izvan ćelije. Ovakvu konformaciju proteinaze stabilizuju joni  $\text{Ca}^{++}$ . U nedostatku jona  $\text{Ca}^{++}$ , kod nekih proteinaza, dolazi do autodegradacije i oslobađanja aktivne enzimske forme proteinaze u medijum za rast.

Pranjem ćelija soja BGRA43 u Na- fosfatnom puferu sa i bez  $\text{Ca}^{++}$  jona dobijeni su bezćelijski enzimski ekstrati koji su dalje testirani da li poseduju sposobnost proteolize kazeinskih frakcija. U ovom eksperimentu utvrđeno je da bezćelijski enzimski ekstrakt dobijen pranjem ćelija soja BGRA43 u puferu bez jona  $\text{Ca}^{++}$ , pod optimalnim uslovima hidrolize, zadržava sposobnost hidrolize  $\beta$ - kazeinske frakcije, dok je hidroliza  $\alpha_{S1}$ - kazeina znatno manja nego u slučaju kada se koriste cele ćelije. Sposobnost hidrolize  $\kappa$ - kazeinske frakcije se gubi u potpunosti. Isti rezultati su dobijeni i u eksperimentu kada je aktivni proteinazni ekstrakt dobijen pranjem ćelija u Na-fosfatnom puferu sa jonima  $\text{Ca}^{++}$ . Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da oslobađanje proteinaze sa ćelijskog zida kod soja BGRA43 nije  $\text{Ca}^{++}$  zavisno. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je proteinaza soja BGRA43 relativno čvrsto asocirana sa ćelijskim zidom.

U cilju utvrđivanja pripadnosti proteinaze soja BGRA43 određenoj klasi proteinaza ispitan je uticaj inhibitora, specifičnih za svaku proteinaznu klasu. Pepstatin (0.2mM) je korišćen kao inhibitor aspartičnih proteinaza, zatim PMSF (10mM) kao inhibitor serinskih proteinaza, a 1,10-fenantrolin (2mM) kao inhibitor metaloproteinaza. Inhibitori su u reakcionu smešu dodavani pojedinačno, ili po dva u kombinaciji. U eksperimentu inhibicije proteinaznim inhibitorima, za hidrolizu  $\beta$ - kazeina korišćen je ekstrakt celih ćelija soja BGRA43 u Na-fosfatnom puferu pH 6.5, a

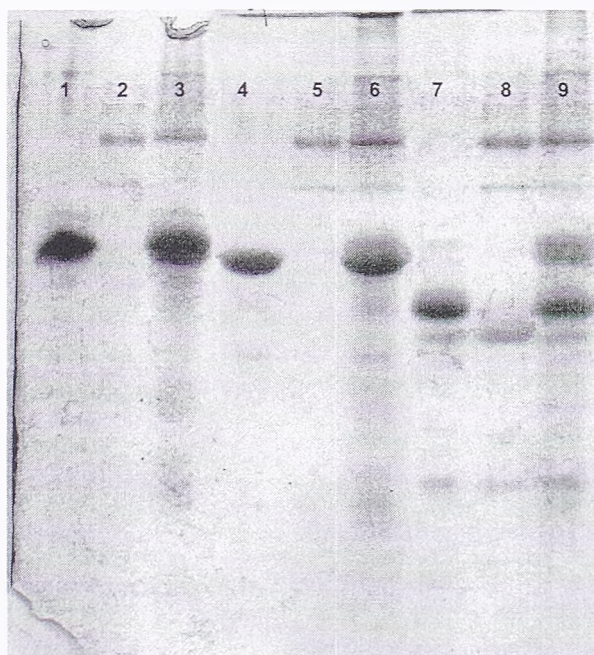
reakcija se odvijala dva sata na temperaturi od 42°C (Slika 14). Ovim eksperimentom je pokazano da proteinaza soja BGRA43 najverovatnije pripada serinskoj klasi proteinaza pošto u prisustvu PMSF-a nije dolazilo do hidrolize, dok ostali inhibitori nemaju značajnog uticaja na stepen degradacije  $\beta$ -kazeina.



Slika 14. SDS-PAGE nakon degradacija  $\beta$ -kazeina ekstraktom celih ćelija soja BGRA43 u prisustvu različitih inhibitora proteinaza. 1.  $\beta$ -kazein, 2. digestija  $\beta$ -kazeina bez prisustva inhibitora, 3. digestija  $\beta$ -kazeina u prisustvu pepstatina, 4. digestija  $\beta$ -kazeina u prisustvu PMSF-a, 5. digestija  $\beta$ -kazeina u prisustvu 1,10 fenantrolina, 6. digestija  $\beta$ -kazeina u prisustvu PMSF-a i pepstatina, 7. digestija  $\beta$ -kazeina u prisustvu PMSF-a i 1,10-fenantrolina 8. digestija  $\beta$ -kazeina u prisustvu 1,10 fenantrolina i pepstatina.

#### 4. 5. Analiza BGRA433 - derivata soja BGRA43

U toku rada sa sojem BGRA43 spontano je, na petri šolji nakon niza presejavanja, dobijen derivat označen kao BGRA433 koji, za razliku od ishodnog soja, nije pokazivao proteolitičku aktivnost. U proteinaznim esejima gde su, kao supstrati, korišćene sve tri kazeinske frakcije pojedinačno, utvrđeno je da derivat BGRA433 nema sposobnost hidrolize ni jedne kazeinske frakcije (Slika 15). Morfološki izgled kolonija derivata BGRA433 na Petri šolji nije se razlikovao od ishodnog soja, a analizom njegovog plazmidnog sastava utvrđeno je da sadrži plazmid pRA1, čime je dodatno potvrđeno da je derivat BGRA433 spontana Prt<sup>r</sup> varijanta soja BGRA43 i da su proteinazni geni ovog soja najverovatnije locirani na hromozomu.

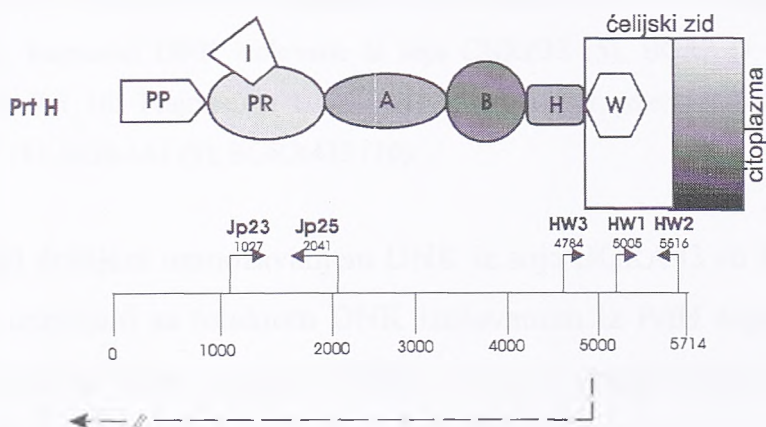


Slika 15. SDS-PAGE nakon hidrolize  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ - kazeinskih frakcija ekstraktom celih ćelija soja BGRA43 i derivata BGRA433. 1.  $\alpha_{s1}$ - kazein, 2. digestija  $\alpha_{s1}$ -kazeina sojem BGRA43, 3. digestija  $\alpha_{s1}$ -kazeina derivatom BGRA433, 4.  $\beta$ - kazein, 5. digestija  $\beta$ -kazeina sojem BGRA43, 6. digestija  $\beta$ -kazeina derivatom BGRA433, 7.  $\kappa$ - kazein, 8. digestija  $\kappa$ -kazeina sojem BGRA43, 9. digestija  $\kappa$ -kazeina derivatom BGRA433.



#### 4. 6. Utvrđivanje homologije proteinaznog gena PCR metodom

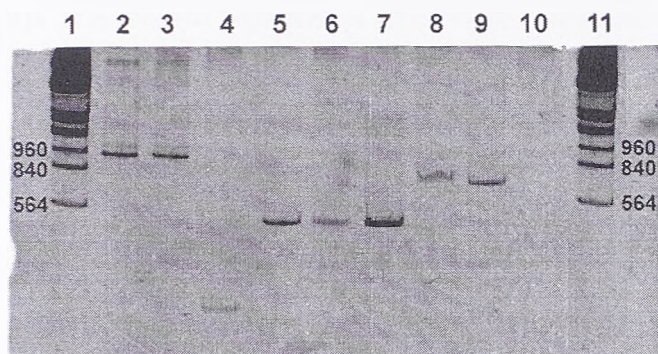
Za utvrđivanje homologije sa do sada poznatim proteinazama BMK radjeni su eksperimenti hibridizacije. U eksperimentima hibridizacije, sa totalnom DNK izolovanom iz soja BGRA43, kao proba su korišćeni fragmenti DNK iz katalitičkog regiona do sada kloniranih proteinaza. Pozitivan signal je dobijen sa probom veličine 879 bp, koja odgovara katalitičkom domenu PrtH proteinaze klonirane iz soja *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. U cilju dodatnog utvrđivanja stepena sličnosti proteinaza sojeva BGRA43 i CNRZ32, dizajnirani su setovi prajmera, Jp23 i Jp25 koji uokviruju katalitički domen PrtH proteinaze soja CNRZ32, kao i prajmeri HW1, HW2 i HW3 koji se nalaze u okviru domena odgovornog za vezivanje za ćelijski zid (Slika16).



Slika 16. Šematski prikaz pozicija sintetisanih prajmera u okviru *prtH* gena. Ispekidana strelica označava pretpostavljeno mesto početka delecije kod derivata BGRA433.

U PCR reakcijama pored totalne DNK izolovane iz soja BGRA43 korišćena je i totalna DNK izolovana iz derivata BGRA433. Umnožavanje je vršeno sa sledećim parovima prajmera: Jp23 - Jp25, HW1 - HW2 kao i HW3 - HW2, da bi se utvrdilo iz kojih razloga derivat BGRA433 ne poseduje proteolitičku aktivnost (delecija ili

tačkasta mutacija). Radi lakšeg poredjenja dobijenih rezultata sa istim parovima prajmera umnožena je i totalna DNK izolovana iz soja CNRZ32.



Slika 17. Elektroforeza DNK fragmenata dobijenih nakon PCR amplifikacije. Kolone 1 i 11: standard H/E. Kolone 2, 3 i 4: Prajmerima Jp23-Jp25 umnoženi fragmenti DNK izolovane iz soja CNRZ32 (2), BGRA43 (3), BGRA433 (4), kolone 5, 6 i 7: Prajmerima HW1-HW2 umnoženi fragmenti DNK izolovane iz soja CNRZ32 (5), BGRA43 (6), BGRA433 (7), kolone 8, 9 i 10: Prajmerima HW3-HW2 umnoženi fragmenti DNK izolovane iz soja CNRZ32 (8), BGRA43 (9), BGRA433 (10).

Fragmenti dobijeni umnožavanjem DNK iz soja BGRA43 su identične veličine kao fragmenti umnoženi sa totalnom DNK izolovanom iz PrtH soja CNRZ32 i to u reakcijama sa sva tri para prajmera (Slika 17). U slučaju kada je totalna DNK izolovana iz derivata BGRA433, nakon amplifikacije, dobijena je traka identične veličine samo sa setom prajmera HW1-HW2 (koji uokviruju region proteinaznog gena odgovornog za vezivanje za ćelijski zid) (Slika 17, kolona 7). Sa setom prajmera HW3-HW2 uopšte nije detektovan fragment na gelu (Slika 17, kolona 10), dok se sa setom prajmera Jp23-Jp25 nakon amplifikacije dobijao fragment veličine 350 bp (Slika 17, kolona 4).

Da bi se ustanovilo zašto postoji razlika u veličini fragmenata amplifikovanih setom prajmera Jp23-Jp25, između soja BGRA43 i Prt<sup>-</sup> derivata BGRA433, uradjeno

je kloniranje i sekvenciranje dobijenih PCR fragmenata. Za potrebe sekvenciranja, uz pomoć seta prajmera Jp23-Jp25 umnoženi su fragmenti korišćenjem totalne DNK izolovane iz sojeva BGRA43 i derivata BGRA433, a zatim klonirani u pBluescriptII SK i pBluescriptII KS vektor (fragment poreklom iz BGRA43), odnosno u vektor pUC19 (fragment poreklom iz derivata BGRA433). Uporednom analizom sekvenci pokazao je da je nivo identičnosti katalitičkih regiona *priH* gena iz soja CNRZ32 (AF133727) i soja BGRA43 98.9% tj. da se razlika, u delu sekvence koja potiče iz katalitičkog regiona, svodi na 15 baznih zamena( Slika 18).

```

BGRA43 ctgcagctgtaattttctgocggtaacccggcacttcaaattcagaaaatgaaggtgta
CRNZ32 ctgcagctgtaattttctgocggtaacccggcacttcaaattcagaaaatgaaggtgta

BGRA43 ataaagcttattacgggaatcctgatatggaaacttaggtaatccaggcactgcaagaa
CRNZ32 ataaagcttattacgggaatcctgatatggaaacttaggtaatccaggcactgcaagaa

BGRA43 gtgcaacaaactgttgocctctgctgaaaaactaaggctactacagatggagtaactatta
CRNZ32 gtgcaacaaactgttgocctctgctgaaaaactaaggctactacagatggagtaactatta

BGRA43 catctgctgatggaaaaactactatcgcaggccagaagctactcagctttcagaaggta
CRNZ32 catctgctgatggaaaaactactatcgcaggccagaagctactcagctttcagaaggta

BGRA43 ctgaccgtgctttctttaatgataaaaaattctacgctgtaaaagataagaatggcaatt
CRNZ32 ctgaccgtgctttctttaatgataaaaaattctacgctgtaaaagataagaatggcaatt

BGRA43 taggcacaggtttctgccaagcaatatacttctgctgtaaaaggtaaaattgcaattgtca
CRNZ32 taggcacaggtttctgccaagcaatatacttctgctgtaaaaggtaaaattgcaattgtca

BGRA43 agcgtggtgaacttactttcactgataaaacaaaaatagcccaagaagctggtgccgctg
CRNZ32 agcgtggtgaacttactttcactgataaaacaaaaatagcccaagaagctggtgccgctg

BGRA43 gtttaatcattgttaacaacaaagccggcgatataactggccatgttaacttaacgctggct
CRNZ32 gtttaatcattgttaacaacaaagccggcgatataactggccatgttaacttaacgctggct

BGRA43 tccctactcttggtttatcagctacatcaggagaaaaaattagtaaaatattgtgaaagccc
CRNZ32 tccctactcttggtttatcagctacatcaggagaaaaaattagtaaaatattgtgaaagccc

BGRA43 catcctgatgaagcattgaaggaagtaagtattgtgtccaaaccttaataaattctgctc
CRNZ32 catcctgatgaagcattgaaggaagtaagtattgtgtccaaaccttaataaattctgctc

BGRA43 gtcaaacagacttaatgtctgatttcacctcatacgggcccaacttctagcttggcattta
CRNZ32 gtcaaacagacttaatgtctgatttcacctcatacgggcccaacttctagcttggcattta

BGRA43 agccagatatactcagcaccctggggaacatatttggtcaactcaaaaataacaatggctata
CRNZ32 agccagatatactcagcaccctggggaacatatttggtcaactcaaaaataacaatggctata

BGRA43 ctaacatgtctggtacttcaatggcttctccatttattgctggtaccaagcacttgta
CRNZ32 ctaacatgtctggtacttcaatggcttctccatttattgctggtaccaagcacttgta

BGRA43 gtcaaacaaatgaacgacaagaatggtgctttctacgcaacttatcaaaagatgagcgcag
CRNZ32 gtcaaacaaatgaacgacaagaatggtgctttctacgcaacttatcaaaagatgagcgcag

BGRA43 aagaagaacggcattgatcaagactctaga
CRNZ32 aagaagaacggcattgatcaagactctaga

```

Slika 18. Poredjene sekvence koja potiče iz soja BGRA43, sa sekvencom dela *prtH* gena koji potiče iz soja CNRZ32. Pravougaonicima su označene baze zamene.

Nakon sekvenciranja fragmenta od 350 bp, poreklom iz derivata BGRA433, pretraživanjem banke podataka, utvrđeno je da fragment pokazuje visok stepen homologije sa alkoholnim dehidrogenazama poreklom iz različitih bakterijskih vrsta, na osnovu čega zaključujemo da je zbog nepostojanja originalne sekvence iz proteinaznog gena za koju bi se prajmeri vezali, došlo do nespecifičnog vezivanja i umnožavanja.

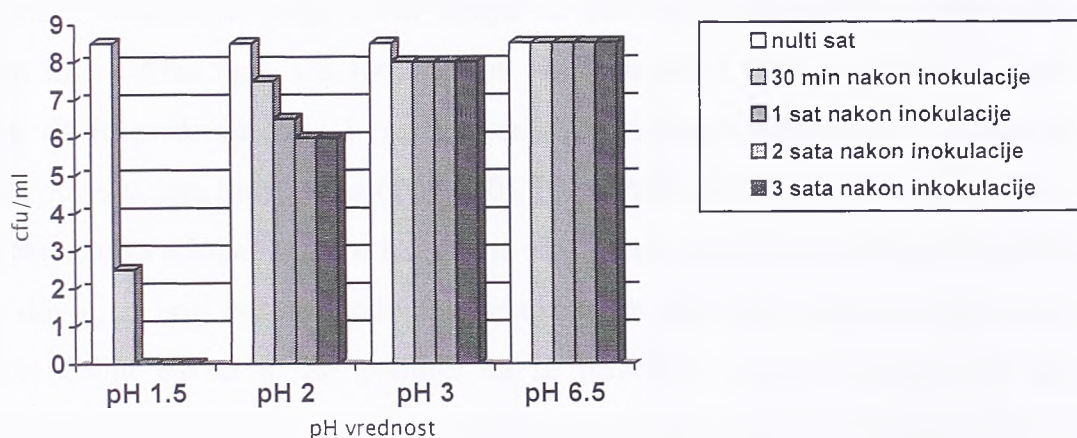
Na osnovu PCR analize i rezultata dobijenih nakon sekvenciranja može se samo pretpostaviti da je kod derivata BGRA433 došlo do delecije DNK regiona koji obuhvata i deo *prtH* gena. Jedan kraj delecije se nalazi u regionu *prtH* gena odgovornom za vezivanje za ćelijski zid (što potvrđuje odsustvo sekvence za koju bi se vezao prajmer HW3) i prostire se uzvodno zahvatajući početak *prtH* gena, dok kraj delecije, na osnovu ovih rezultata nije moguće precizno utvrditi (Slika 16).

## **5. Preživljavanje soja BGRA43 u uslovima niske pH vrednosti i u prisustvu žučnih soli**

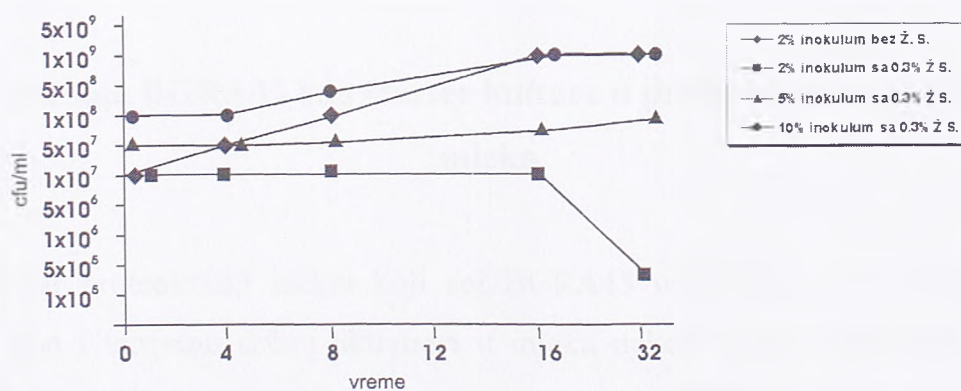
Soj BGRA43 poseduje veći broj karaktera na osnovu kojih bi se mogao uvrstiti u grupu probiotičkih sojeva. Da bi soj BGRA43 mogao svrstati u red potencijalnih probiotika, dodatno su ispitane još dve karakteristike koje se često navode kao kriterijumi za selekciju probiotičkih bakterija, a to su preživljavanje u uslovima niskog pH i u prisustvu žučnih soli. Testiranje preživljavanja, u oba slučaja, radjeno je u uslovima veoma sličnim onima koji vladaju u gornjem delu intestinalnog trakta, u onim vremenskim intervalima koji bi odgovarali njihovom realnom zadržavanju pri prolasku do *colona*.

Testiranje preživljavanja bakterija u uslovima niske pH vrednosti radjeno je tako što je u 9 ml fiziološkog rastvora, sa podešenim pH vrednostima (pH 1.5, 2, 3 i 6.5) dodavan 1 ml prekonoćne kulture bakterija, a broj preživelih ćelija odredjivan je u

momentu dodavanja kulture, nakon 30 minuta, 1, 2 i 3 sata inkubacije na 37°C, titiranjem na Petri šolji (Slika 19). Testiranje preživljavanja bakterija u prisustvu žučnih soli radjeno je tako što je 2%, 5% i 10% inokulum prekonocne kulture bakterija zasejavan u MRS medijum (kontrola) i MRS medijum sa 0.3% govedje žuči. Broj preživelih bakterija je odredjivan nakon 4, 8, 16 i 32 sata od inokulisanja, titiranjem na Petri šoljama (Slika 20).



Slika 19. Preživljavanje soja BGRA43 u uslovima niske pH vrednosti.



Slika 20. Preživljavanje soja BGRA43 u prisustvu 0.3% žučnih soli.

Rezultati ispitivanja preživljavanja soja BGRA43 u uslovima niske pH vrednosti pokazuju da se broj ćelija u fiziološkom rastvoru pH 1.5 drastično smanjuje već nakon 30 min inkubacije na 37°C i da nakon sat vremena nije konstatovano prisustvo živih ćelija u rastvoru. U fiziološkom rastvoru pH 2 dolazi do smanjenja broja živih ćelija u toku prvih 3 sata inkubacije na 37°C, mada i nakon 3 sata inkubacije ostaje zadovoljavajući broj preživelih ćelija u rastvoru ( $2 \times 10^6$  živih ćelija nakon 3 sata). Smanjenje broja živih ćelija na pH 3 je neznatno, u ispitivanim vremenskim intervalima (kao i u fiziološkom rastvoru pH 6.5). Iz rezultata se dalje može videti da je preživljavanje i rast bakterija u prisustvu žučnih soli u direktnoj korelaciji sa povećanjem inokuluma (Slika 20). Prisustvo žučnih soli prolongira vreme adaptacije pre ulaska u logaritamsku fazu rasta i u slučaju kada se u medijum doda oko  $10^8$  ćelija, dovoljan broj ćelija preživi i u adaptiranim uslovima nastavlja sa svojim rastom. Broj ćelija nakon 8 sati počinje da se povećava da bi se nakon 32 sata inkubacije ukupan broj ćelija povećao za 1.5 logaritamskih jedinica. U slučaju kada se u medijum doda  $10^7$  ćelija nakon 16 sati inkubacije ukupan broj ćelija približan je onom sa početka eksperimenta, a nakon 32 sata taj broj opada tako da u medijumu preživi oko  $10^5$  ćelija.

## **6. Primena soja BGRA43 kao starter kulture u proizvodnji jogurta i kiselog mleka**

Dobar proteolitički efekat koji soj BGRA43 ostvaruje na sve tri kazeinske frakcije, kao i izuzetno dobra aktivnost u mleku nakon 6 sati inkubacije na 42°C, nametnuo je potrebu za testiranjem ovog soja kao monokulture u proizvodnji jogurta i kiselog mleka. U tu svrhu je u 5 l mleka, predhodno pasterizovanog 30 min u Kohovom loncu na 100°C, zasejan 2% inokulum sveže prekonoćne kulture bakterija. Inkubacija je radjena na temperaturi od 42°C gde je polovina zasejanog mleka

pripremana kao jogurt, a druga polovina kao kiselo mleko. Ukupno vreme inkubacije je iznosilo 4 sata i 50 min za jogurt i 4 sata za kiselo mleko. Jogurt je nakon inkubacije dvostepeno hladjen, u toku 20 min, do temperature od 11°C, a nakon toga dobro promućkan da bi došlo do razbijanja nastalog homogenog gruša. Dalje čuvanje dobijenog proizvoda odvijalo se u frižideru na temperaturi od 4 - 8°C. Kiselo mleko je nakon inkubacije čuvano u frižideru na temperaturi od 4 - 8°C. Praćene karakteristike tokom određenog vremenskog perioda odnosile su se na povećanje stepena kiselosti tokom fermentacije i u narednih 17 dana čuvanja u frižideru, kao i na ukupan broj bakterija po ml proizvoda tokom istog vremenskog perioda. Rezultati analize proizvoda dati su u tabeli 9.

Tabela 9. Promena pH i ukupnog broja ćelija tokom i nakon fermentacije jogurta i kiselog mleka proizvedenih korišćenjem soja BGRA43 kao starter kulture.

vreme analize	jogurt		kiselo mleko	
	pH	ukupan broj ćelija/ml	pH	ukupan broj ćelija/ml
2 h nakon inokulacije	5.66	$3 \times 10^8$	5.66	$3 \times 10^8$
2 h 30 min nakon inokulacije	5.20		5.20	
4 h nakon inokulacije	4.6	$3 \times 10^8$		
4 h 50 min nakon inokulacije			4.56	$2.7 \times 10^8$
2. dan	4.00	$2.7 \times 10^8$	3.86	$9.5 \times 10^7$
6. dan	3.85		3.79	
8. dan	3.85	$1.9 \times 10^7$	3.96	$2.8 \times 10^7$
13. dan	3.82		3.76	
17. dan	3.69	$1 \times 10^7$	3.73	$7 \times 10^6$



Mlečno kiselinski proizvodi dobijeni na gore opisani način zadovoljavali su osnovne tehnološke kriterijume tokom procesa fermentacije. Vrednost pH, jogurta i kiselog mleka, ostaje u dozvoljenim granicama i nakon 17 dana čuvanja u frižideru. Broj živih ćelija nakon 17 dana opada za samo 1 logaritamsku jedinicu, u slučaju jogurta, odnosno 1.5 logaritamskih jedinica, u slučaju kiselog mleka, što u potpunosti zadovoljava tehnološke standarde. Zahvaljujući dvostepenom hladjenju, koji je primenjen u procesu pravljenja jogurta, postignut je visok stepen viskoznosti što se direktno odrazilo na kvalitet samog proizvoda. Ni kod jednog proizvoda nije zapažena pojava gorčine, što takodje značajno utiče na tehnološke karakteristike jogurta i kiselog mleka.

## IV DISKUSIJA

U ovom radu okarakterisan je humani intestinalni izolat *Lactobacillus helveticus* BGRA43 i utvrđena su osnovna svojstva koja on mora da poseduje da bi bio svrstan u red probiotičkih sojeva. Istovremeno, ispitana su njegova proteolitička svojstva koja omogućavaju korišćenje u procesu proizvodnje mlečno-kiselinskih proizvoda, na prvom mestu jogurta i kiselog mleka, čime se umnogome olakšava unošenje aktivnih ćelija u organizam čoveka.

Važni faktori za opredeljivanje nekog soja u grupu probiotičkih sojeva su njegova detaljna karakterizacija i determinacija do nivoa vrste. Primenom klasičnih biohemijskih i fizioloških testova za identifikaciju BMK kao i korišćenjem identifikacionih šema sposobnosti fermentacije različitih šećera, izolat je prvobitno determinisan kao vrsta *L. acidophilus* (Banina *et al.*, 1998). U poslednjih nekoliko godina razvijen je niz molekularno genetičkih metoda uz pomoć kojih se jednostavnije i preciznije determinišu nove vrste i vrši reklasifikacija postojećih. Primenom Dot-hibridizacije, RAPD i RFLP analize ustanovljeno je da grupa *L. acidophilus* sadrži najmanje 6 različitih vrsta koje se fiziološkim testovima ne mogu razlikovati (Ray, 1996). U skladu sa ovim saznanjem izolat je ponovo determinisan do nivoa vrste, korišćenjem prajmera dizajniranih na osnovu sekvence koja potiče iz gena za 16S rRNK čime je dodatno potvrđena pripadnost rodu *Lactobacillus*. ARDRA analiza, uz pomoć koje je trebalo determinisati izolat do nivoa vrste samo je još jednom ukazala

na izuzetno blisku filogenetsku povezanost izmedju vrsta *L. acidophilus* i *L. helveticus*, ali nije razrešila dilemu kojoj vrsti pripada izolat BGRA43. Sledeći korak podrazumevao je analizu broja i rasporeda DNK fragmenata dobijenih nakon nasumičnog umnožavanja polimorfnih sekvenci u genomu (RAPD analiza), nakon čega je, na osnovu rezultata ove analize, izvršena reklasifikacija i izolat BGRA43 pridružen vrsti *L. helveticus*.

Optimalna temperatura za rast soja BGRA43, u zavisnosti od medijuma u kome se gaji, iznosi izmedju 37°C (MRS medijum) i 42°C (10% obrano mleko), a pun rast kulture se može dobiti samo ukoliko se ona gaji u anaerobnim uslovima. Imajući u vidu telesnu temperaturu čoveka kao i uslove koji vladaju i distalnim delovima GI trakta soj BGRA43 je bio ozbiljan kandidat za ispitivanje ostalih svojstava koja bi ga svrstala u red probiotika. U tom cilju uradjeni su eksperimenti koji su se odnosili na ispitivanje antimikrobijalnog delovanja soja BGRA43, prvenstveno na sporogene i patogene bakterije. Inhibitorno delovanje ovog soja ustanovljeno je, kako protiv nepatogenih, srodnih vrsta bakterija iz rodova *Lactococcus* i *Lactobacillus*, tako i protiv većeg broja patogenih bakterija iz rodova *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella* i sporogenih iz rodova *Bacillus* i *Clostridium*. Snažna antimikrobijalna aktivnost ne može se neutralisati dejstvom proteolitičkih enzima što ukazuje da se ne radi o supstanci proteinske prirode tj. bakteriocinu. Katalaza testovi su odbacili mogućnost da se inhibicija rasta postiže dejstvom vodonik-peroksida. Dodatnim eksperimentima je potvrđeno da niska pH vrednost pune kulture takodje nije uzrok inhibicije rasta senzitivnih sojeva. Iz literature je poznato da mlečna i sirćetna kiselina, u kombinaciji, mogu redukovati rast nekih bakterija, a jaka antimikrobijalna aktivnost se povezuje sa sniženim stepenom disocijacije mlečne i sirćetne kiseline u uslovima

pH 4 - 4.6 (Ouweland, 1998). Činjenica da se inhibitorno delovanje soja BGRA43 gubi, kada u medijumu nisu prisutne ćelije koje se kontinuirano dele, nameću zaključak da se u slučaju soja BGRA43 antimikrobijalna aktivnost ostvaruje uz pomoć nekog kratkoživećeg jedinjenja ili uz pomoć organske/ih kiseline/a koja relativno brzo disociraju. Nije isključeno ni sinergističko delovanje mlečne i sirćetne kiseline, sa još nekim za sada nepoznatim jedinjenjima, pogotovu ako se zna da puna kultura soja BGRA43, gajena 16 sati u tečnom MRS medijumu, dostiže pH 4.5.

Dalja ispitivanja potencijala soja BGRA43 kao probiotika obuhvatala su utvrđivanje sposobnosti preživljavanja u uslovima niske pH vrednosti i u prisustvu žučnih soli. Da bi ćelije nekog bakterijskog soja u dovoljnom broju dospele do distalnog dela GI trakta moraju da prevaziđu nepovoljne uslove koji vladaju u želucu i *duodenumu*. Vreme potrebno da hrana udje u duodenum iznosi 3 - 4 sata, dok je za izbacivanje u spoljašnju sredinu potrebno 24 - 72 sata. Uslovi u kojima su eksperimenti radjeni ne imitiraju u potpunosti uslove koji vladaju u ovim organima, pogotovu ako se ima u vidu činjenica o specifičnostima svake individue, ali nam rezultati dobijeni testiranjem soja BGRA43 u tim uslovima mogu dati okvirnu sliku o ponašanju ovog soja u sličnoj sredini. U uslovima sličnim onima koji vladaju u želucu (pH 2), nakon 3 sata broj ćelija opada za 2 logaritamske jedinice, što odgovara kriterijumima pri selekciji probiotika. Ova pH vrednost ujedno je i najniža pH u kojoj bakterije mogu da prežive. U medijumu čija pH vrednost iznosi 3, tokom 3 sata nema smanjenja ukupnog broja bakterija što se i očekivalo, imajući u vidu da soj BGRA43 nakon 16 sati rasta u tečnom MRS medijumu obara pH na 4.5, a nakon 48 sati rasta u mleku obara pH mleka na 3.7. Soj BGRA43 pokazuje izrazitu tolerantnost kada je u pitanju prisustvo 0.3% žučnih soli. Ukoliko se u medijum ćelije unesu u dovoljnom broju ( $10^8$  ćelija/ml),

u početku dolazi do prilagodjavanja novonastalim nepovoljnim uslovima sredine (što se ogleda u produženom vremenu adaptacije pre ulaska u logaritamsku fazu rasta), a nakon 32 sata od inokulisanja dolazi do povećanja njihovog ukupanog broja. Ukoliko se startuje sa manjim inokulumom ( $10^7$  ćelija/ml), nakon 16 sati broj preživelih ćelija se ne menja, dok nakon 32 sata broj ćelija opada za 2 logaritamske jedinice, što takodje zadovoljava standarde pri selekciji probiotika (Dunne *et al.*, 1999). Ukoliko bi se podaci iz gore navedenih rezultata mogli preneti na *in vivo* uslove, od  $10^9$  ćelija/ml unetih bakterija soja BGRA43, u distalni deo GI trakta bi trebalo očekivati da se detektuje oko  $10^6$  preživelih ćelija.

Izrazita samoagregacija ćelija soja BGRA43 tokom rasta u MRS medijumu još jedna je karakteristika uočena u radu sa ovim sojem. Već je pokazano da ćelije koje samoagregiraju pokazuju i povećan afinitet za vezivanje za ćelije vaginalnog i GI epitela, što doprinosi lakšoj kolonizaciji GI i UGI trakta (Salminen *et al.*, 1998). U skladu sa ovim saznanjima, u toku daljih istraživanja neophodno je detaljno utvrditi poreklo ovog fenomena kao i potencijal ćelija soja BGRA43 za kolonizaciju GI trakta.

Soj BGRA43 pokazuje sposobnost hidrolize šećera laktoze. Njegovo probiotičko delovanje može se sa te stane primeniti kod osoba koje su netolerantne na laktozu.

Imajući u vidu podatke iz literature (Salminen *et al.*, 1998; Prescott *et al.*, 1999; Dunne *et al.*, 1999) i dobijene rezultate ovih istraživanja može se zaključiti da soj BGRA43 možemo svrstati u red probiotičkih sojeva.

Laktobacili su višestruki aminokiselinski auksotrofi. Količina slobodnih aminokiselina i peptida u mleku nije dovoljna da obezbedi normalan rast ovih bakterija tako da su prinudjene da kao izvor azota koriste protein mleka kazein. Zahvaljujući

dobro razvijenom proteolitičkom sistemu, koga u nekim slučajevima čini preko trideset različitih enzima i transportni sistem, kazein mleka se prevodi do oligopeptida i slobodnih aminokiselina (Prichard and Coolbear, 1993). Ključni enzim u proteolitičkom sistemu je proteinaza, ekstracelularni protein vezan za ćelijski zid bakterija (Chopin, 1993). U cilju utvrđivanja prisustva ekstracelularnih proteinaza u soju BGRA43, uz pomoć celih ćelija, analizirana je sposobnost hidrolize  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazeinske frakcije u Na-fosfatnom puferu pH 7.2 na temperaturi od 40°C u trajanju od 5 sati. U navedenim eksperimentalnim uslovima došlo je do totalne degradacije  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ - kazeinske frakcije kao i delimične degradacije  $\kappa$ - kazeinske frakcije. Pored supstratne specifičnosti određene su i optimalne vrednosti pH i temperature za aktivnost ovog enzima. U Na-fosfatnom puferu pH 6.5 i temperaturi od 45°C dolazilo je do potpune degradacije sve tri glavne kazeinske frakcije. U pogledu sposobnosti hidrolize kazeinskih frakcija ovaj enzim se može samo uslovno svrstati u proteinaze slične PIII - tipu laktokokalnih proteinaza, s obzirom da ne postoji specifična podela na tipove proteinaza, formirana na osnovu podataka dobijenih sa do sada analiziranim proteinazama različitih sojeva laktobacila. U budućnosti, klasifikacija u okviru pojedinih klasa, pored supstratne specifičnosti, morala bi da uključi i druge biohemijske i genetičke karakteristike proteinaza laktokoka i laktobacila.

Zajednička osobina proteinaza laktobacila je da su vezane za ćelijski zid. Kod pojedinih sojeva laktobacila prisustvo jona  $Ca^{++}$  ima značajnu ulogu u stabilizaciji aktivne forme enzima. Povećana koncentracija ovih jona smanjuje enzimsku aktivnost, dok u njihovom odsustvu dolazi do odvajanja aktivne proteinaze sa površine ćelije (Ezzat *et al.*, 1985; Zevaco and Gripon, 1988; Pitchard and Coolbear, 1993). S druge strane, proteinaze soja *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ397 i *L. divergens* 742

vezane su za ćelijski zid, ali se tokom ispiranja ćelija u odgovarajućim puferima odvaja od zida nezavisno od prisustva jona  $\text{Ca}^{++}$  (Ezzat *et al.*, 1987; Fira, 1998). U slučaju proteinaze soja *L. rhamnosus* BGEN1 tokom ispiranja ćelija u puferu bez jona  $\text{Ca}^{++}$  nije moguće dobiti aktivan proteinazni ekstrakt (Fira, 1998). Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu utvrđeno je da je proteinaza soja BGRA43 vezana za ćelijski zid i da je njeno odvajanje od zida nezavisno od prisustva jona  $\text{Ca}^{++}$ . Vezanost za ćelijski zid potvrđena je i činjenicom da sa bezćelijskim ekstraktom, dobijenim pranjem ćelija u puferu sa i bez jona  $\text{Ca}^{++}$ , dolazi do identičnog smanjenja enzimske aktivnosti koja se ogleda u gubljenju sposobnosti hidrolize  $\kappa$ - kazeinske frakcije i delimično  $\alpha_{s1}$ - kazeinske frakcije.

U odnosu na strukturu bočnih grupa aminokiselina koje sačinjavaju katalitički centar proteinaze utvrđena su četiri tipa proteinaza: serinske, cisteinske, aspartične i metaloproteinaze (Barrett and Rawings, 1991). Korišćenjem specifičnih inhibitora za svaki tip proteinaze utvrđeno je da je proteinaza soja BGRA43 serinskog tipa (inhibirana je PMSF-om, specifičnim inhibitorom serinskih proteinaza), dok ostali specifični inhibitori nisu imali uticaja na aktivnost ove proteinaze. U slučaju soja *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACADC 235 (Stefanitsi and Garel, 1997) kao i *L. helveticus* CNRZ32 (Pederson *et al.*, 1999) utvrđeno je da ovi sojevi sintetišu po dve različite proteinaze. U oba slučaja, jedna proteinaza pripada serinskoj klasi dok druga pripada klasi metaloproteinaza. U eksperimentima inhibicije, u kojima su korišćene različite kombinacije specifičnih inhibitora, pokušalo se dodatno utvrditi eventualno prisustvo još jedne proteinaze u soju BGRA43. Na osnovu rezultata, dobijenih razdvajanjem produkata degradacije  $\beta$ - kazeinske frakcije od strane celih ćelija u prisustvu dva različita inhibitora po reakciji, nije došlo ni do kakvog smanjenja ili

povećanja efekta inhibicije koji bi se razlikovao od stepena inhibicije dobijenog sa PMSF-om, na osnovu čega se može zaključiti da soj BGRA43 sintetiše samo jednu proteinazu serinskog tipa. U toku daljih istraživanja bilo bi interesantno analizirati broj i veličinu peptida dobijenih u procesu degradacije kazeina, kako su opisali Pederson i autori 1999, čime bi se definitivno potvrdilo postojanje jedne ili dve proteinaze u ćeliji.

U hibridizacionim eksperimentima, gde su, kao probe korišćeni delovi proteinaznih gena do sada kloniranih proteinaza laktobacila (*prtP*, *prtB*, *prtH*), utvrđeno je da totalna DNK izolovana iz soja BGRA43 hibridizuje samo sa proteinaznom probom poreklom iz soja *L. helveticus* CNRZ32 (Pederson *et al.*, 1999). Dodatno, u PCR analizi uradjenoj sa totalnom DNK izolovanom uz soj BGRA43, korišćenjem tri seta različitih prajmera dizajniranih na osnovu sekvence poreklom iz katalitičkog i W domena *prtH* gena, dobijeni fragmenti identične veličine kao fragmenti umnoženi sa totalne DNK izolovane iz soja CNRZ32. PCR fragment, dobijen umnožavanjem sa totalne DNK soja BGRA43, uz pomoć prajmera koji uokviruju katalitički region *prtH* gena kloniran je i sekvenciran. Upoređivanjem dobijene sekvence sa sekvencom katalitičkog regiona PrtH proteinaze ustanovljeno je da su ove dve proteinaze u okviru katalitičkog regiona gotovo identične tako da se može tvrditi da soj BGRA43 poseduje PrtH proteinazu.

U ovom radu okarakterisan je i spontani Prt<sup>-</sup> derivat soja BGRA43, označen kao BGRA433. Zaključak da ovaj derivat ne poseduje proteinaznu aktivnost donet je nakon neuspelog pokušaja da se celim ćelijama ovog derivata, u optimalnim uslovima, hidrolizuju tri glavne kazeinske frakcije. Rezultati dobijeni na osnovu dalje analize (eksperimenti hibridizacije i PCR) potvrdili su postojanje delecije koja pada u okvir proteinaznog gena derivata BGRA433. Delecija zahvata deo katalitičkog regiona, a s



obzirom da je Prt<sup>r</sup> mutant dobijen spontano, za sada nije poznato koji su faktori indukovali nastanak delecije i koji mehanizmi su bili uključeni u ovaj proces.

Degradacija kazeina koja dovodi do stvaranja peptida jedinstvene strukture kao i sposobnost proizvodnje mlečne kiseline ključni su faktori koji utiču na selekciju određenih sojeva za industrijsku primenu. Slaba aktivnost u mleku u početnim fazama fermentacije se detektuje kod velikog broja laktobacila. Zato se na početku mlečno-kiselinske fermentacije kao starteri obično koriste dobri proteoliti, iz rodova *Lactococcus* i *Streptococcus*, koji za kratko vreme snižavaju pH sredine ustupajući mesto vrstama iz roda *Lactobacillus* koji tek onda postaju predominantna vrsta formirajući konačnu teksturu, ukus i aromu proizvoda. U ovom radu je utvrđeno da se soj BGRA43, zahvaljujući napred opisanim karakteristikama, može vrlo uspešno koristiti kao monokultura u proizvodnji jogurta i kiselog mleka. Ponašanje u samom procesu fermentacije kao i kvalitet finalnog proizvoda zadovoljavaju tehnološke standarde pa se ovaj soj može uvrstiti u grupu starter kultura.

## V ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata iznetih u ovom radu mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Humani intestinalni izolat BGRA43 determinisan je kao vrsta *Lactobacillus helveticus*.

2. Optimalna temperatura za rast soja BGRA43 u MRS medijumu je 37°C, odnosno 42°C u 10% obranom mleku. Tokom rasta u MRS medijumu pokazuje izraziti efekat samoagregacije ćelija. Najbolji rast ovaj soj postiže u anaerobnim uslovima pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 10%. Nakon 6 sati rasta u mleku, obara pH vrednost mleka sa 6.62 na 4.53 pri čemu dolazi do formiranja homogenog gruša visokog stepena viskoznosti.

3. Soj BGRA43 poseduje jedan, najverovatnije kriptični plazmid (pRA1), veličine oko 2.4kb.

4. Soj BGRA43 pokazuje antimikrobijalno delovanje na sledeće sojeve: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NS1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NP45, *Lactobacillus casei* ATCC393, *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli* C600, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus* ATCC Met<sup>r</sup>, *Streptococcus pneumoniae* ATCC496, *Streptococcus pneumoniae* ATCC276, *Bacillus subtilis* ATCC8, *Bacillus cereus* ATCC11778, *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas* sp. i *Clostridium sporogenes*. Antimikrobijalna aktivnost se ispoljava samo u ćelija koje se kontinuirano dele.

5. Broj ćelija koji preživljava nepovoljne uslove niske pH vrednosti i prisustvo žučnih soli u medijumu u potpunosti zadovoljava kriterijume postavljene kod selekcije probiotičkih sojeva.

6. Soj BGRA43 poseduje ekstracelularnu proteinazu. Optimalna pH vrednost za aktivnost proteinaze ovog soja iznosi 6.5 dok je optimalna temperatura 45°C. U optimizovanim uslovima cele ćelije soja BGRA43 za 2 sata dovode do potpune hidrolize sve tri glavne kazeinske frakcije.

7. Oslobađanje proteinaze sa ćelijskog zida nije zavisno od jona  $\text{Ca}^{++}$ .

8. Na osnovu eksperimenata sa specifičnim proteinaznim inhibitorima može se zaključiti sa soj najverovatnije poseduje proteinazu serinskog tipa. Aktivnost proteinaze inhibirana je PMSF-om, specifičnim inhibitorom serinskih proteinaza.

9. U toku rada sa sojem BGRA43 dobijen je spontani Prt<sup>r</sup> derivat, označen kao BGRA433, koji nema sposobnost hidrolize ni jedne kazeinske frakcije.

10. Eksperimentima hibridizacije i PCR analizom, sa totalnom DNK izolovanom iz soja BGRA43, utvrđeno je postojanje sličnosti sa proteinaznim genom poreklom iz soja *Lactobacillus helveticus* CNRZ32.

11. Kloniran je i sekvenciran DNK fragment, poreklom iz soja BGRA43, dobijen uz pomoć prajmera koji uokviruju katalitički region *prtH* gena. Uporednom analizom sekvenci, katalitičkog regiona *prtH* gena iz soja CNRZ32 i soja BGRA43 ustanovljena je sličnost od 98.9%. PCR fragmenti dobijeni umnožavanjem totalne DNK iz soja BGRA43 i soja CNRZ32, uz pomoć prajmera iz regiona odgovornog za vezivanje proteinaze za ćelijski zid, bili su identične veličine.

12. Na osnovu PCR analize i rezultata dobijenih nakon sekvenciranja može se zaključiti da je kod derivata BGRA433 došlo do delecije dela proteinaznog gena.

13. Testiranjem na maloj skali potvrđeno je da soj BGRA43 može biti uspešno iskorišćen kao starter kultura za proizvodnju mlečno-kiselinskih proizvoda - jogurta i kiselog mleka.

## VI LITERATURA

- Altermann, E., Klein, J.R. and Henrich, B. 1999. Primary structure and features of the genome of the *Lactobacillus gasseri* temperate bacteriophage ( $\phi$ ) adh. *Gene*, **236**: 333-346.
- Anderson, D. G. and McKay, L. L. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 549-552.
- Axelsson, L.T., Chung, T. C., Dobrogotsz, W. J and Lindgren, S. E. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **2**: 131-136.
- Bachmann, B. J. 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* – Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C., Vol. **2**: 1190-1219.
- Banina, A., Vukasinovic, M., Brankovic, S., Fira, D., Kojic, M. and Topisirovic, L. 1998. Characterisation of natural isolate *Lactobacillus acidophilus* BGRA43 useful for acidophilus milk production. *J. Appl. Microbiol.*, **84**: 593-599.
- Barrett, A. J. and Rawlings, N. D. 1991. Proteinases. Types and families of endopeptidases. *Biochem. Soc. Trans.*, **19**: 707-714.
- Benno, Y., Sawada, K. and Mitsuoka, T. 1984. The intestinal microflora of infants: composition of faecal flora in the breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol. Immunol.*, **28**: 975.
- Birnboim, A. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**: 1513-1523.
- Breukink, E., van Kraaij, C., van Dalen, A., Demel, R. A., Siezen, R. J., de Kruijff, B and Kuipers, O. P. 1998. The orientation of nisin in membranes. *Biochemistry*, **37**: 8153-8162.
- Chassy, B. M. and Flickinger, L. 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.*, **44**: 173-177.
- Christensen, J. E., Lin, D., Palva, A. and Steele, J. L. 1995. Sequence analysis, distribution and expression of an aminopeptidase N-encoding gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Gene*, **155**: 89-93.

- Clewell, B. D. 1994. Plasmids in Bacteria. Plenum Publishing corp., New York. Plasmid transfer, p:431-432.
- Conway, L. P. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci., **70**: 1-12.
- Conway, L. P. 1996. Selection criteria for probiotics microorganisms. Asia Pacific J. Clin. Nutr., **5**: 10-14.
- Curk, M. C., Hubert, J. C. and Bringel, F. 1996. *Lb. paraplantarum* sp.nov., A New Species Related to *Lactobacillus. plantarum*. International Journal of Systematic Bacteriology, **46**: 595-589.
- Delley, M., Mollet, B. and Hottinger, H. 1990. DNA probe for *Lactobacillus delbrueckii*, Appl. Environ. Microbiol., **56**: 1967-1970.
- Dicks, T. L. M., Du Plessis, M. E., Dellaglio, F. and Lauer, E. 1996. Reclassification of *Lactobacillus casei* ssp. *casei* ATCC393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC334 as the neotype of *Lactobacillus casei* ssp. *casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. International Journal of Systematic Bacteriology, **46**: 337-340.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Holloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, M. M. E., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F. and Collins, J. K. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Kluwer Academic Publishers, Edited by Konings, W. N., Kuipers O. P. and Huis in't Velt, J. H. J. The Netherlands. Antonie van Leeuwenhoek, **76**: 279-292.
- Ezzat, N., El Soda, M., Bouillane, C., Zevaco, C. and Blanchard, P. 1985. Cell wall-associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis*. Milchwissenschaft, **40**: 140-143.
- Ezzat, N., Zevaco, C., El Soda, M. and Gripon, J. C. 1987. Partial purification and characterization of a cell wall-associated proteinase from *Lactobacillus bulgaricus*. Milchwissenschaft, **42**: 95-97.
- Fernandes, F. C., Shanhani, M. K. and Amer, A. M. 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilic fermented dairy products. FEMS Microbiol. Rev., **46**: 343-356.

- Fira, Dj. 1998. Karakterizacija ekstracelularnih proteinaza bakterija iz rodova *Staphylococcus* i *Lactobacillus*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- Ganzle, M. G., Ehmann, M. and Hammes, W. P. 1998. Modelling of growth of *Lactobacillus sanfrancisciensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of the sourdough fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 2616-2623.
- Ganzle, M. G., Holtzel, A., Walter, J., Jung, G. and Hammes, W. P. 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 4325-4333.
- Gasson, M. J. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.*, **154**: 1-9.
- Gasson, J. M. and Dodd, H. M. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *In Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, Gasson, M. and de Vos, W. M. (eds.), Blackie and Professional. London, England, p: 211-250.
- Gilbert, C., Atlan, D., Portalier, R., Germond, G. J., Lapierre, L. and Mollet, B. 1996. A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Bacteriol.*, **78**: 3059-3065.
- Gilliland, E. S. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**: 175-188.
- Gilliland, E. S. and Walker, K. D. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypoholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.*, **73**: 905-911.
- Gilliland, E. S., Staley, E. T. and Bush, J. L. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjuncts. *J. Dairy Sci.*, **67**: 3045-3051.
- Greene, D. J. and Klaenhammer, T. R. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Environm. Microbiol.*, **60**: 4487-4494.
- Guarner, F. and Schaafsma, G. J. 1998. Probiotics: *Int. J. Food Microbiol.*, **39**: 237-238.
- Gurtler, V. and Stanisich, V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol.*, **142**: 3-16.
- Haandrikman, A. J., Meesters, R., Laan, H., Konings, W. N., Kok, J. and Venema, G. 1991. Processing of the lactococcal extracellular serine proteinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 1899-1904.

- Hammes, W. P., Bantleon, A. and Mlin, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**: 165-174.
- Henriksson, A., Szewzyc, R. and Conway, P. L. 1991. Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 449.
- Heinsiek, R., Kruup, G. and Stackebrand, E. 1992. Development of diagnostic oligonucleotide probes for four *Lactobacillus* species occurring in the intestinal tract. *System Appl. Microbiol.*, **15**: 123-128.
- Hertel, C., Ludwig, W., Obst, M., Pot, B., Kersters, K. and Schleifer, H. K. 1993. Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electroforetic protein profiles. *System Appl. Microbiol.*, **16**: 463-467.
- Hill, S. and Gasson, M. J. 1986. A qualitative screening procedure for the detection of casein hydrolysis by bacteria, using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Res.*, **53**: 625-629.
- Holck, A., and Naes, H. 1992. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151. *J. G. Microbiol.*, **138**: 1353-1364
- Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S. E., Aukrust, T. and Blom, H. 1992. Purification and amino acid sequence of sacacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb 706. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 2715-2720.
- Hopwood, D. A., Bib, J. M., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, J. D., Smith, C. P., Ward J. M. and Schempff, H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomices*, a laboratory manual. Norwich, U.K. The John Innes Foundation
- Huehne, K., Holck, A., Axelson, L. and Kroeckel, L. 1996. Analysis of sacacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* LB674 and its expression in sacacin P negative *L. sake* strains. *Microbiology*, **142**: 1437-1448.
- Huttunen, E., Noro, K. and Yang, Z. 1995. Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus* strains. *Int. Dairy J.*, **5**: 503-513.
- Isolauri, E., Salminen, E. and Salminen, S. 1998. Lactic Acid Bacteria and Immune Modulation. *Lactic Acid Bacteria - Microbiology and Functional Aspects*, Edited by Sepo Salminen and Atte von Wright, second ed., rev. and expanded, New York. USA, p:255-2680.

- Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, **59**: 171-200.
- Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 525-532.
- Johansson, M. L., Molin, G., Pettersson, B., Uhlen, M. and Ahrne, S. 1995. Characterization and species recognition of *Lactobacillus plantarum* strains by restriction length polymorphism (RFLP) of the 16S rRNA gene. *J. Appl. Microbiol.*, **79**: 536-541.
- Kamau, D. N., Doores, S. and Pruitt, K. M. 1990. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2711-2716.
- Kanatani, K., Oshimura, M. and Sano, K. 1995. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 1061-1067.
- Kiwaki, M., Ikemura, H., Shimizu-Kadota, M. and Harashima, A. 1989. Molecular characterization of a cell wall-associated proteinase from *Lactococcus lactis* NCDO763. *Molecular Microbiol.*, **3**: 359-369.
- Kleeman, G. E. and Klaenhammer, T. R. 1981. Adherence of *Lactobacillus* species to human fetal intestinal cells. *J. Dairy Sci.*, **65**: 2063-2069.
- Klaenhammer, T. R. 1982. Microbiological consideration in selection and preparation of *Lactobacillus* strain for use as dietary adjuncts. *J. Dairy Sci.*, **65**: 1339-1349.
- Klaenhammer T. R. 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**: 39-86.
- Klaenhammer, T. R., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Bel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. and Siezen, R. 2002. Discovering Lactic Acid Bacteria by Genomics. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Kluwer Academic Publishers, Edited by Siezen, R. J., Kok, J., Abbe, T. and Schafsma. The Netherlands. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**: 29-58.



- Klijn, N., Weerkamp, A. H. and de Vos, W. M. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction - amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 3390-3393.
- Kojic, M., Fira, D., Banina, A and Topisirovic, L. 1991. Characterization of the cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 1753-1757.
- Kok, J. and de Vos, W. M. 1994. The proteolytic system of lactic acid bacteria. *In Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, Gasson, M. and de Vos, W. M. (eds.), Blackie and Professional. London, England, pp. 169-210.
- Kok, J. and Venema, G. 1988. Genetics of proteinases of lactic acid bacteria. *Biochemie*, **70**: 475-488.
- Konings, W. N. 2002. The Cell membrane and the Struggle for Life of Lactic Acid Bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Kluwer Academic Publishers, Edited by Siezen, R. J., Kok, J., Abbe, T. and Schasfsma. The Netherlands. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**: 3-27.
- Kozak, W., Rajchert-Trzpił, M. and Dobzansky, T. 1974. The effect of proflavin, ethidium bromide and an elevated temperature on the appearance of nisin-producing strains of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.*, **83**: 295-302
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-686.
- Laloi, P., Atlan, D., Blanc, B., Gilbert, C. and Portalier, R. 1991. Cell-wall-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ397: differential extraction, purification and properties of the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**: 196-204.
- Larsen, A. G. and Norrung, B. 1993. Inhibition of *Listeria monocitogenes* by bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Lett. Appl. Microbiol.*, **17**: 132-134.
- Lee, Y. K. and Salminen, S. 1995. The coming age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, **6**: 241-245.
- Lennox, E. S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**: 190.
- Lindren, S. E. and Dobrogosz, W. J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**: 149-163.

- Lowry, O. H, Rosebrough, N. J, Farr, A. J. and Randal, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Lücke, F. K. and Ray, B. 1996. Lactic Acid Bacteria Involved in Food Fermentation and Their Present and Future Uses in Food Industry. NATO ASI Series, Vol. H98. Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabilism, Genetics and Applications. Edited by T. Faruk Bozoglu and Bibek Ray, Springer-Verlag Berlin., p: 253-268.
- Maniatis, T. E., Fritsch, F. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Marschall, V. M. E. 1987. Lactic acid bacteria: starters for flavour. *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**:327-336.
- Marteau, P. and Rambaud, J. C. 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and imunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**: 207-220.
- Martin-Hernandez, M. C., Alting, A. C. and Exerkate, F. A. 1994. Purification and characterization of the mature, membrane-associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**: 828-834.
- Mayra-Makinen, A. and Bigret, M. 1998. Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects, second edition. Edited by Salminen, S. and von Wright, A.III Series: Food science and tehnology Marcel Dekker, USA., p: 73-102.
- Mikelsaar, M., Mandar, R. and Sepp, E. 1998. Lactic Acid Microflora in the Human Microbial Ecosystem and Its Development. Lactic Acid Bacteria - Microbiology and Functional Aspects, Edited by Sepo Salminen and Atte von Wright, second ed., rev. and expanded, New York. USA, p:279-343.
- Mortvedt, C.I. and Nes, I. F. 1990. Plasmid associated bacteriocin production by *Lactobacillus sake* strain. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 1601-1607.
- Mortvedt, C. I., Nisen-Meyer, J., Sletten, K. and Nes, I. F. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 1829-1834.
- Neefs, J. M., van de Peer, Y., de Rijk, P., Chapelle, S. and de Wachter, R. 1993. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nuceic Acids Res.*, **21**: 3025-3049.

- O'Sullivan, D. J. and Klaenhammer, T. R. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* ssp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 2730-2733.
- O'Sullivan, D. J. 1998. Lactic acid Bacteria: Classification and Physiology. *Lactic Acid Bacteria - Microbiology and Functional Aspects*, Edited by Sepo Salminen and Atte von Wright, second ed., rev. and expanded, New York. USA, p:6-16.
- O'Sullivan, D. J. 1999. Methods for analysis of the intestinal microflora. *Probiotics: A Critical Review*, Edited by Tannock G. W., Horizon Scientific Press, Wymondham. U. K., p: 23-44.
- Ouwehand, A. C. and Conway, P. L. 1996. Purification and characterization of a component produced by *Lactobacillus fermentum* that inhibits the adhesion of K88 expressing *E. coli* to porcine ileal mucus. *J. Appl. Microbiol.*, **80**: 311-318.
- Ouwehand, A. C. 1998. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*, second edition. Edited by Salminen, S. and von Wright, A. III Series: Food science and technology Marcel Dekker, USA, p:139-160
- Pastar, I. 2003. Molekularna analiza proteinaznog gena humanog izolata *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- Pederson, J. A., Mileski, G. J., Weimer, B. C. and Steele, J. L. 1999. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.*, **181**: 4592-4597.
- Pereira, A. I. D. and Gibson, R. G. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 4689-4693.
- Piard, J. C., Kuipers, O. P., Rollema, H. S., Desmazeaud, M. J. and Vos, W. M. 1993. Structure, organization and expression of the *lct* gene for lactacin 481, a novel lantibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, **268**: 16361-16368.
- Pillound, N. and Mollet, B. 1990. DNA probes for the detection of *Lactobacillus helveticus*, *System Appl. Microbiol.*, **13**: 1967-1970.
- Prescott, M. L., Harley, P. J. and Klein, A. D. 1999. *Microbiology*, fourth edition. WCB/McGraw-Hill Companies. Symbiotic Associations: Commensalism, Mutualism and Normal Microbiota of the Human Body, Chapter 28: 565-579.

- Pritchard, G. G. and Coolbear, T. 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**: 179-206.
- Ray, B. 1996. Probiotics of Lactic Acid Bacteria: Science or Myth? NATO ASI Series. Lactic Acid Bacteria: Current Advances in metabolism, Genetics and Applications. Edited by T. Faruk Bozoglu and Bibek Ray, Springer-Verlag Berlin, Vol. H98: 101-136.
- Ross, K. F., Ronson, C. W. and Tagg, J. R. 1993. Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 2014-2021.
- Roussel, Y., Colmin, C., Simonet, J. M. and Decaris, B. 1993. Strain characterization genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group. *J. Appl. Bacteriol.*, **74**: 549-556.
- Rubin, H. E. 1978. Toxicological model for a two-acid system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**: 623-624.
- Rusell, J. B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**: 363-370.
- Russell, W. M. and Klaenhammer, T. R. 2001. An efficient system for directed integration into the *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri* chromosome via homologous recombination. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 4361-4364.
- Salminen, S., Deigton, A. M., Benno, Y. and Gorbach, L. S. 1998. Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Lactic Acid Bacteria - Microbiology and Functional Aspects, Edited by Sepo Salminen and Atte von Wright, second ed., rev. and expanded, New York, USA, p:211-254.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-termination. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**: 5463-5467.
- Sharpe, M. E. 1979. Identification of Lactic Acid Bacteria. Identification methods for microbiologists-second edition, Academic Press, p:233-259.
- Sherman, L. A. and Savage, D. C. 1986. Lipoteichoic acid in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**: 302.
- Siezen, J. R. 1999. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Kluwer Academic Publishers, Edited by Konings, W. N., Kuipers, O. P. and Huis in't Velt, J. H. J. The Netherlands. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**: 139-155.

- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoreses. *J. Molec. Biol.*, **98**: 503-517.
- Stefanitsi, D. and Garel, J. R. 1997. A zinc-dependent proteinase from the cell wall of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Lett. in Appl. Microbiol.*, **24**: 180-184.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **40**: 722-756.
- Talarico, T. L. and Dobrogosz, W. J. 1989. Chemical characterization of antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, **33**: 674-679.
- Tannock, W. G. 1999. Probiotics: A Critical Review. Horisont Scientific Press, Wymondham, U. K.. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. Chapter 4: 45-56.
- Tannock, W. G., Timisjarvi-Tilsala, A., Rodtong, S., Mundro, K. and Alatossava, T. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage and yoghurt by 16S-23S gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 4264-4267.
- Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F. and Hammes W. P. 1992. Characterization of the bacteriocin curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sacacin from *L. sake* LTH673. *Sys. Appl. Microbiol.*, **15**: 460-468.
- Topisirovic, L., Banina, A., Kojic, M., Fira, D., Vujcic, M., Djordjevic, G., Bojovic, B. and Levata, M. 1991. Posible genetic manipulation in lactobacilli. *Mikrobiologija*, **28**: 73-84.
- Usman, H. A. 1999. Bile tolerance, tauroholate deconjugation, and binding of holesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *J. Dairy Sci.*, **82**: 243-248.
- van der Mer, J. R., Polman, J., Beerthuyzen M. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. and de Vos, W. M. 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine proteinase involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosythesis. *J. Bacteriol.*, **175**: 2578-2588.
- van Kraaij, C., Breukink, E., Noordermeer, M. A., Demel, A. R., Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and de Kruijff, B. 1998. Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane. *Biochemistry*, **37**: 16033-16040.
- Varnam, A. H. and Sutherland, J. P. 1994. Milk and milk products - tehnology, chemistry and microbiology. Chapman and Hall, London.

- Venema, G., Huis, J. H. J. and Hugenholtz, J. 1996. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. Antonie van Leeuwenhoek, **70**: 65-87.
- Visser, S., Exterkate, F. A., Slangan, C. J. and de Veer, G. J. C. M. 1986. Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -casein. Appl. Environ. Microbiol., **52**: 1162-1166.
- Vogel, F. R., Knorr, R., Müller, M. R. A., Steuder, U., Ganzle, M. G. and Ehrmann, M. A. 1999. Non-dairy lactic fermentation: the cereal world. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Kluwer Academic Publishers, Edited by Konings, W. N., Kuipers O. P. and Huis in't Velt, J. H. J. The Netherlands. Antonie van Leeuwenhoek, **76**: 403-411.
- Vos, P. G., Simons, G., Siezen, R. J. and de Vos, W. M. 1989. Primary structure and organization of the gene for a procaryotic, cell-envelope-located serine proteinase. J. Biol. Chem., **171**: 2795-2802.
- Vujcic, M., Stojanovic, I. and Topisirovic, L. 1994. Segregational stability of *Lactobacillus plantarum* A112 plasmid pA1 which replicates rolling-circle mode of replication. Arch. Biol. Sci. **46**: 9-15.
- Welsch, J., and Mc Clelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Res., **18**: 7213-7218.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev., **51**: 221-271.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J. and Graham, M. W. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. Nucleic Acids Res., **17**: 3469-3478.
- Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. 1993. Purification and specificity of a cell-wall associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. J. Biochem., **114**: 740-745.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. 1984. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, **33**: 103-119.
- Zevaco, C. and Gripon, J. C. 1988. Properties and specificity of a cell-wall proteinase from *Lactobacillus helveticus*. Le Lait, **68**: 393-408.







РД 18083



300126340

COBISS

*Lactobacillus sp.* B G R A 4 3

