

Streszczenie

Lactobacillus helveticus wyróżnia się spośród wszystkich dotychczas poznanych gatunków bakterii kwasu mlekowego (ang. LAB, lactic acid bacteria) wysoką aktywnością proteolityczną. Ponadto, głównie ze względu na wysoką tolerancją na niskie pH, szybkość zakwaszania mleka wysoką aktywność enzymów proteolitycznych wiele szczepów tych bakterii jest powszechnie stosowanych jako kultury starterowe w wytwarzaniu produktów mlecznych (Christiansen i in., 2008; Nielsen i in., 2009).

Jednakże, *L. helveticus* wykazuje dużą zmienność wewnątrzgatunkową. Wykazano, że nawet biotypy wyizolowane z tej samej niszy ekologicznej w znacznym stopniu różnią się między sobą, dodatkowo udowodniono, iż duża część cech technologicznych jest uzależniona od szczepu (Griffiths i Tellez, 2013; Gatti i in., 2014). Rodzime szczepy bakterii są często źródłem wielu właściwości przydatnych w przemyśle mleczarskim. Dlatego też, fenotypowa i genotypowa zmienność gatunkowa bakterii *L. helveticus* są obecnie przedmiotem wielu badań naukowych (Sadat-Mekmene i in., 2011a; Broadbent i in., 2011; Cremonesi i in., 2012; Jingjing i in., 2015). Ta różnorodność biologiczna wydaje się być powiązana ze specyfiką nisz ekosystemów, które są głównymi czynnikami wpływającymi na tworzenie się unikalnych cech serów produkowanych w określonych regionach (Gatti i in., 2003).

Lactobacillus helveticus jest gatunkiem dominującym w naturalnych kulturach serowarskich (przygotowywanych na bazie serwatki) stosowanych w produkcji tradycyjnych serów. Ponadto, niektóre szczepy należące do tych bakterii wykazują szereg właściwości prozdrowotnych, które przyczyniają się do wzrastającego znaczenia *L. helveticus* w produkcji funkcjonalnych produktów spożywczych oraz nutraceutyków (Taverniti i Guglielmetti, 2012; Giraffa, 2014).

System proteolityczny omawianych bakterii składa się z trzech podstawowych składników: proteaz serynowych związanych z powierzchnią komórek bakterii (ang. CEPs, cell envelope-associated serine proteinases), które inicjują hydrolizę kazeiny do oligopeptydów; systemu transportującego, który przenosi oligopeptydy przez błonę do wnętrza komórki bakterii, ostatni element stanowią wewnątrzkomórkowe peptydazy (o bardzo zróżnicowanej specyficy substratowej), które przyczyniają się do zwiększenia puli wolnych aminokwasów we wnętrzu komórek bakterii (Savijoki i in., 2006).

Występująca wśród szczepów *L. helveticus* różnorodność genów kodujących białka CEP może wpływać na niektóre parametry technologiczne takie jak np.: teksturę i zapach fermentowanych produktów mlecznych, jak również na tempo wzrostu bakterii w mleku, ilość

wytwarzanego kwasu mlekowego, zdolność do uwalniania z natywnej struktury białek mleka biologicznie aktywnych peptydów (Genay i in., 2009).

W związku z powyższym, badania koncentrujące się na analizie fenotypowych i genotypowych cech *L. helveticus* w nawiązaniu do technologicznych właściwości reprezentowanych przez rodzime szczepy może poprawić właściwości powszechnie stosowany kultur startowych lub przyczynić się do powstania nowych szczepionek serowarskich pozwalających otrzymywanie wysokiej jakości mlecznych produktów fermentowanych.

Dlatego też, w niniejszej pracy podjęto badania koncentrujące się na ocenie przydatności technologicznej *L. helveticus* z uwzględnieniem niektórych czynników genetycznych determinujących aktywność proteolityczną szczepów bakterii. Wyniki tego typu badań posiadają wymiar praktyczny i mogą determinować przyszłe zastosowania szczepów bakterii w produkcji serów dojrzewających lub innych fermentowanych produktów spożywczych.

Realizowane badania były skupione na analizie rodzimych szczepów *L. helveticus* 80, B734, T15, T80, T103, T104, T105, T159, T199, 141, które zostały wyizolowane z tradycyjnych fermentowanych produktów mlecznych i otrzymane dzięki uprzejmości prof. dr hab. Łucji Łaniewskiej - Trokenheim (Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska). Wymienione mikroorganizmy nie były dotychczas wykorzystane przemysłowo. Ponadto, w badaniach wykorzystano także *L. helveticus* K1 (szczep wyizolowany pochodzącego z Kanady fermentowanego produktu mlecznego), który otrzymano z Wydziału Nauk o Żywności Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie oraz *Lactobacillus rhamnosus* E/N (Biomed, Lublin). Jako szczep referencyjny wykorzystano szczep *L. helveticus* DSMZ 20075 (DSMRZ, Niemcy).

W niniejszej pracy postawiono następujące cele badawcze:

- Weryfikacja przynależności analizowanych szczepów do gatunku *L. helveticus*,
- Porównanie wybranych właściwości technologicznych wykazywanych przez badane szczepy oraz wyodrębnienie spośród nich mikroorganizmów charakteryzujących się największym potencjałem aplikacyjnym w produkcji serów dojrzewających typu szwajcarskiego,
- Opracowanie technologii serów dojrzewających typu szwajcarskiego w skali laboratoryjnej z udziałem wybranych rodzimych szczepów *L. helveticus*,
- Analiza biochemiczna i fizykochemiczna serów dojrzewających otrzymanych przy wykorzystaniu wybranych szczepów *L. helveticus*.

W ramach niniejszej dysertacji podjęto następujące problemy badawcze:

- Określenie dynamiki wzrostu hodowli komórek szczepów *L. helveticus*,

- Określenie wewnątrzgatunkowych różnic profili białkowych oraz analiza porównawcza frakcji białek powierzchniowych szczepów *L. helveticus*,
- Identyfikację genów kodujących proteazy związane z powierzchnią komórek (białka CEP) wśród analizowanych szczepów bakterii oraz analizy bioinformatyczne wybranych sekwencji nukleotydowych,
- Porównanie ogólnej aktywności proteolitycznej badanych szczepów,
- Określenie dynamiki obniżania wartości pH mleka, szybkości tworzenia się skrzepu kwasowego przy udziale analizowanych szczepów bakterii, a także analiza parametrów tekstury uzyskanych mlecznych żeli kwasowych,
- Wybór rodzimych szczepów *L. helveticus* wykazujących największą przydatność technologiczną i potencjał aplikacyjny w produkcji serów dojrzewających, a także skomponowanie różnych wariantów szczepionek serowarskich z włączeniem wybranych rodzimych szczepów *L. helveticus*,
- Zaprojektowanie modelu procesu produkcji sera w skali laboratoryjnej z uwzględnieniem poszczególnych parametrów technologicznych i warunków dojrzewania oraz produkcja serów dojrzewających typu szwajcarskiego z zastosowaniem wybranych szczepów *L. helveticus*,
- Analizy fizykochemiczne, biochemiczne serów w różnych etapach ich dojrzewania

Przeprowadzone badania analizy obejmowały szeroki zakres analiz mikrobiologicznych, biochemicznych oraz fizykochemicznych. Do realizacji części badań, wykorzystano m. in. metodę absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS) ze wzbudzeniem w płomieniu acetylen-powietrze, technikę chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC-FID), chromatografię jonowymienną, technikę spektrometrii masowej MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), jak również techniki molekularne połączone z analizami bioinformatycznymi.

Analiza sekwencji genu 16S rRNA potwierdziła przynależność wszystkich rodzimych szczepów do gatunku *L. helveticus*. Większość badanych szczepów charakteryzowała się podobnym do referencyjnego szczepu (DSMZ 20075) tempem wzrostu hodowli komórek (w płynnym podłożu de Man, Rogosa and Sharpe o podstawowym składzie). Najwolniejszą dynamiką wzrostu odznaczały się szczepy T105, T104 i T15. Ponadto *L. helveticus*: T104, T103, T199 i T15 wykazywały największe zróżnicowanie pod względem zdolności do fermentacji różnych źródeł węgla w pożywce.

Analiza molekularna wykazała, występowanie wśród analizowanych szczepów zmienności dotyczącej obecności sekwencji genów kodujących proteazy związane z powierzchnią komórek bakterii (białka CEP). Wśród analizowanych szczepów najbardziej rozpowszechnionym genem kodującym CEP był *prfH3*. Ponadto, największą różnorodnością pod względem ilości zidentyfikowanych sekwencji nukleotydowych kodujących CEP wyróżniały się szczepy *L. helveticus* 141, T105 i T104, w których wykryto obecność kombinacji sekwencji *prfH* / *prfH2* / *prfH3*. Interesującym jest fakt iż, T104 i T105 wykazały najwyższą aktywność proteolityczną wśród wszystkich badanych rodzimych szczepów. Poza tym, oba szczepy charakteryzowały się największą dynamiką i zdolnością do obniżania wartości pH mleka w procesie fermentacji oraz wykazywały zdolności do szybkiego tworzenia stabilnej struktury mlecznych skrzepów kwasowych wykazujących pożądane właściwości tekstualne.

Uzyskane wyniki mierzonych parametrów wskazują, iż *L. helveticus* T104 i T105 wykazywały największy potencjał technologiczny wśród wszystkich badanych rodzimych szczepów. W związku z tym oba szczepy zostały włączone do kompozycji dwóch oddzielnych wariantów szczepionek które zostały wykorzystane do produkcji serów dojrzewających typu szwajcarskiego.

Wyniki przeprowadzonych analiz biochemicznych i fizykochemicznych wykazały, że produkty otrzymane z wykorzystaniem *L. helveticus* T104 i T105 wykazały podobne do serów kontrolnych właściwości za wyjątkiem efektu procesu oczkowania, który był dużo bardziej intensywne w finalnych produktach kontrolnych. Jednakże, sery wyprodukowane przy zastosowaniu szczepionki zawierającej w składzie *L. helveticus* T104 po zakończeniu całego procesu dojrzewania wykazywały większe podobieństwo do produktów finalnych z kontrolnego wariantu pod względem wartości takich parametrów jak: sucha masa, zawartość białka, kwasowość ogólna, zawartość tłuszczu oraz profil kwasów tłuszczowych, niż wyroby finalne uzyskane przy zastosowaniu wariantu szczepionki zawierającej T105. Natomiast, produkty finalne uzyskane przy wykorzystaniu szczepionki zawierającej szczep T105 wyróżniały się największą zawartością wolnych aminokwasów, prekursorów związków o właściwościach aromatyczno-smakowych. Ponadto, wodne ekstrakty pochodzące z tego wariantu serów charakteryzowały się najwyższą aktywnością przeciwutleniającą.

Otrzymane wyniki mają znaczenie praktyczne, wskazują na możliwości dalszego wykorzystania analizowanych rodzimych szczepów *L. helveticus* w przemyśle mleczarskim. Wyniki analiz sugerują, iż zastawanie szczepu T105 może przyczynić się do wzbogacenia składu powszechnie stosowanych szczepionek serowarskich, a także być może pozwoli na stworzenie nowych kultur starterowych o cennych właściwościach reprezentowanych przez ten szczep. Jednakże, obiecujące rezultaty badań niewątpliwie wymagają przeprowadzenia dalszych analiz.

Istnieje bowiem nadal potrzeba ustalenia m.in. optymalnej proporcji analizowanych szczepów *L. helveticus* oraz pozostałych składników tworzących kompozycję szczepionki serowarskiej, co decyduje o możliwości otrzymywania produktów o odpowiednich właściwościach aromatycznych i smakowych.

Słowa kluczowe: *Lactobacillus helveticus*, bakterie kwasu mlekowego (LAB), aktywność proteolityczna, sery dojrzewające typu szwajcarskiego

Literatura:

- [1] Broadbent, J.R., Cai, H., Larsen R.L., Hughes, J.E., Welker, D.L., de Carvalho, V.G., Tompkins, T. A., Ardö, Y., Vogensen, F., de Lorentiis, A., Gatti, M., Neviani, E. & Steele, J. L. (2011). Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Science*, 94, 4313 – 4328.
- [2] Christiansen, J.K., Hughes, J.E., Welker, D.L., Rodríguez, B.T., Steele, J.L., & Broadbent, J.R. (2008). Phenotypic and genotypic analysis of amino acid auxotrophy in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 416 – 423.
- [3] Cremonesi, P., Chessa, S., & Castiglioni, B. (2013). Genome sequence and analysis of *Lactobacillus helveticus*. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1 – 13.
- [4] Gatti, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E. & Mucchetti, G. (2014). Microbial evolution in raw- milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of Dairy Science*, 97, 573 – 591.
- [5] Gatti, M., Lazzi, C., Rossetti, L., Mucchetti, G. & Neviani, E. (2003). Biodiversity in *Lactobacillus helveticus* strains present in natural whey starter used for Parmigiano Reggiano Cheese, *Journal of Applied Microbiology*, 95, 463 – 470.
- [6] Genay, M., Sadat, L., Gagnaire, V. & Lortal, S. (2009). prtH2, not prtH, is the Ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3238 – 3249.
- [7] Giraffa, G. (2014). *Lactobacillus helveticus*: importance in food and health. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1 – 2.
- [8] Griffiths M.W. & Tellez, A.M. (2013). *Lactobacillus helveticus*: The proteolytic system. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1 – 9.
- [9] Jingjing, R., Houfeng, Z., Ming, L., Xu, H., Tao, W., Xingwei, Z., Feng, J. & Li, W. (2015). Probiotic and anti-inflammatory attributes of an isolate

Lactobacillus helveticus NS8 from Mongolian fermented koumiss. BMC Microbiology, 196, 1 – 11.

- [10] Nielsen, M.S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K.I. & Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation PH, and storage time. International Dairy Journal, 19, 155 – 165.
- [11] Sadat-Mekmene, L., Jardin, J., Corre, C., Mollé, D., Richoux, R., Delage, M.M., Lortal, S. & Gagnaire, V. (2011a). Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* strains improves breakdown of the pure α_{s1} -Casein. Applied and Environmental Microbiology, 77, 179 – 186.
- [12] Savijoki, K., Ingmer, H. & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 71, 394 – 406.
- [13] Taverniti, V. & Guglielmetti, S. (2012). Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*. Fronteries in. Microbiology, 3, 1 – 13.