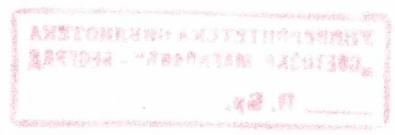


A 16668

ID = 18534159



UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Đorđe A. Fira

KARAKTERIZACIJA EKSTRACELULARNIH PROTEINAZA  
BAKTERIJA IZ RODOVA *Staphylococcus* I *Lactobacillus*

Doktorska disertacija

Beograd, 1998

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

**ČLANOVI KOMISIJE:** dr Ljubiša Topisirović, redovni profesor,  
Biološki fakultet, Beograd.

dr Draga Simić, redovni profesor,  
Biološki fakultet, Beograd.

dr Jelena Knežević, vanredni profesor,  
Biološki fakultet, Beograd.

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

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

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

Ovaj rad je urađen u Institutu za Molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo pod rukovodstvom prof.dr Ljubiše Topisirovića. Koristim ovu priliku da se zahvalim profesoru Topisiroviću na mnogobrojnim idejama, sugestijama i usmeravanju u eksperimentalnom radu, kao i na savetima koji su doprineli tome da ovaj rad dobije svoju konačnu formu.

Zahvaljujem se, takođe, prof. dr Dragi Simić i prof. dr Jeleni Knežević na kritičkoj oceni ovog rada.

Zahvaljujem se i dr Milanu Kojiću na višegodišnjoj saradnji i velikoj pomoći u toku eksperimentalnog dela ovog rada, mr Siniši Đuraševiću na pomoći u obradi finalne verzije teksta, kao i svima koji su na bilo koji način učestvovali u realizaciji ovog rada.

## APSTRAKT

Kolekcija prirodnih izolata bakterija iz rodova *Staphylococcus* i *Lactobacillus* formirana je izolovanjem iz uzoraka prehrambenih proizvoda sa različitih lokacija. Kod svih izolata je testirana sposobnost sinteze ekstracelularnih proteinaza. Od 171 izolata stafilokoka detektovano je 55 proteolitički aktivnih izolata čije kulture izazivaju proteolitičku koagulaciju mleka. Specifičnost ekstracelularnih proteinaza stafilokoka u odnosu na frakcije kazeina je elektroforetski testirana i poređena sa delovanjem himozina na kazein. Proteinaze stafilokoka su tokom koagulacije mleka pored  $\kappa$ -kazeina u visokom stepenu hidrolizovale i  $\alpha_{s1}$ - i  $\beta$ -kazein, na osnovu čega je zaključeno da one ne bi mogle da posluže kao adekvatna zamena za himozin, odnosno za proizvodnju sirila. Proteinaze izolata F22, F86, M104, S2007 i S2105 su detaljnije biohemijski okarakterisane. Utvrđeno je da se radi o proteinazama relativno male molekulske mase (od 20 do 32 kDa) koje spadaju u prave ekstracelularne enzime, pošto se sa površine ćelije odvajaju u medijum za rast. Temperaturni optimumi ovih proteinaza se kreću od 30°C do 37°C, a pH optimumi u opsegu od 6,5 do 8,7. Joni bakra inhibiraju njihovu aktivnost, dok joni kalcijuma stimulišu aktivnost proteinaza iz izolata F22, M104 i S2007. Pored kazeinskih frakcija, proteinaze stafilokoka hidrolizuju i druge proteinske supstrate, kao što su želatin i BSA. U eksperimentima sa proteinaznim inhibitorima utvrđeno je da proteinaze izolata F22 i M104 pripadaju serinskoj klasi, proteinaze S2007 i S2105 klasi metalo-proteinaza, dok proteinazu izolata F86 na ovaj način nije bilo moguće klasifikovati.

Od 75 prirodnih izolata mezofilnih laktobacila detektovano je 17 izolata koji sintetišu ekstracelularne proteinaze. Sve ove proteinaze pripadaju serinskoj klasi i hidrolizuju samo  $\beta$ -kazein, sa izuzetkom proteinaze soja *Lactobacillus divergens* BG742 koja hidrolizuje sve tri kazeinske frakcije, i koja, za razliku od ostalih, najefikasnije vrši hidrolizu supstrata na baznoj pH vrednosti. Totalna DNK sojeva *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGLi17 i BGLi18 hibridizuje sa laktokokalnim proteinaznim probama. Restriktione mape proteinaznih regiona ovih sojeva pokazuju visoku homologiju sa laktokokalnim proteinaznim regionima. Razdvajanje genomske DNK ovih sojeva na PFGE i hibridizacija sa laktokokalnim proteinaznim probama pokazuje da su, za razliku od laktokoka, njihovi proteinazni regioni najverovatnije locirani na hromozomu.

**Ključne reči:** *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, prirodni izolati, ekstracelularne proteinaze, sirilo, kazein, inhibitori, hibridizacija, laktokoške, homologija.

## ABSTRACT

A collection of natural isolates from bacterial genera *Staphylococcus* and *Lactobacillus* is obtained from food samples which originate from different locations. The isolates have been screened for production of extracellular proteinases. Amongst 171 isolate of staphylococci, 55 of them are found to be proteolytically active, since their cultures proteolytically coagulate milk. Specificity of staphylococcal extracellular proteinases towards casein fractions has been analysed by electrophoresis and compared to the action of chymosin on casein. In the process of milk coagulation, staphylococcal proteinases, beside  $\kappa$ -casein, significantly hydrolyzed  $\alpha_{s1}$ - and  $\beta$ -casein, which suggested that they could not be used as a substitute for chymosin in the commercial production of rennet. Biochemical characteristics of proteinases from isolates F22, F86, M104, S2007 and S2105 have been studied more completely. It has been found that these proteinases have relatively low molecular masses (from 20 to 32 kDa), and that they are released from the cell envelope in the growth medium. Their temperature optima are between 30°C and 37°C, since their pH optima ranging from 6,5 to 8,7. Copper ions inhibit their activity, since the presence of calcium ions stimulates the activity of proteinases from isolates F22, M104 and S2007. Beside casein fractions, they also hydrolyze heterologous protein substrates, such as BSA and gelatin. Experiments with specific proteinase inhibitors revealed that proteinases from isolates F22 and M104 belong to the serine group of proteinases, S2007 and S2105 proteinases were classified as metalloproteinases, since the type of F86 proteinase in these experiments could not be determined.

Amongst 75 natural isolates of mesophilic lactobacilli, 17 of them are identified as extracellular proteinase producers. All these proteinases belong to the serine class and hydrolyze  $\beta$ -casein only, except the proteinase from the strain *Lactobacillus divergens* BG742 which hydrolyze all three casein fractions, and which is, in contrast to others, more efficient at basic pH values. Total DNA from strains *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGLi17 and BGLi18 hybridizes with the probes from lactococcal proteinase gene regions. On the basis of PFGE analysis of genomic DNA of these strains and hybridization with lactococcal proteinase probes, it could be suggested that their proteinase gene regions are chromosomally located.

**Keywords:** *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, natural isolates, extracellular proteinases, rennet, casein, inhibitors, hybridization, lactococci, homology.

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	1
1. 1. Bakterije iz familije <i>Micrococcaceae</i> ; rod <i>Staphylococcus</i>	1
1. 2. Bakterije iz roda <i>Lactobacillus</i>	2
1. 3. Klasifikacija proteinaza. Bakterijske proteinaze	3
1. 3. 1. Proteinaze serinskog tipa	3
1. 3. 2. Proteinaze cisteinskog tipa	5
1. 3. 3. Aspartične proteinaze	5
1. 3. 4. Metaloproteinaze	6
1. 3. 5. Proteinaze nedefinisanog tipa	7
1. 4. Proteolitička aktivnost bakterija iz familije <i>Micrococcaceae</i>	7
1. 5. Ekstracelularne proteinaze laktobacila	13
1. 6. Cilj istraživanja	14
<b>2. Materijal i metode</b>	16
2. 1. Bakterijski sojevi	16
2. 2. Podloge za rast bakterija	17
2. 3. Izolovanje i determinacija prirodnih izolata stafilokoka	18
2. 4. Metode za izolovanje DNK	19
2. 4. 1. Mini - metoda izolovanja plazmidne DNK	19
2. 4. 2. Izolovanje ukupne DNK	19
2. 5. Digestija DNK restrikcionim enzimima	20
2. 6. Izolacija DNK <i>in situ</i> iz laktobacila. Digestija DNK restrikcionim enzimima <i>in situ</i> u agaroznim blokovima	20
2. 7. Horizontalna elektroforeza DNK	21
2. 8. Elektroforeza DNK u pulsirajućem polju ( PFGE )	21
2. 9. Obeležavanje DNK metodom " Nick translacije "	21
2. 10. " Southern " hibridizacija	22
2. 10. 1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane	22
2. 10. 2. Hibridizacija	22
2. 11. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti	23
2. 11. 1. Test koagulacije mleka	23
2. 11. 2. Određivanje koncentracije neproteinskog azota po Kjeldahl-u	23
2. 11. 3. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti celih ćelija prirodnih izolata	23
2. 11. 4. Dobijanje aktivnog proteinaznog ekstrakta	24
2. 11. 5. Ispitivanje aktivnosti proteinaznih ekstrakata	25
2. 12. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu	25
2. 13. Elektroforeza na nedenaturišućem SDS-poliakrilamidnom gelu	26

<b>3. Rezultati</b>	28
3. 1. Izolovanje i determinacija prirodnih izolata stafilokoka	28
3. 2. Plazmidni sadržaj izolata	31
3. 3. Proteolitička aktivnost	32
3. 3. 1. Koagulacija mleka i delovanje na frakcije kazeina	32
3. 3. 2. Elektroforetska analiza uzoraka mleka posle koagulacije	33
3. 4. Određivanje supstratne specifičnosti stafilokoknih proteinaza	37
3. 5. Delovanje stafilokoknih proteinaza na heterologe proteinske supstrate	37
3. 6. Optimalne vrednosti pH i temperature za delovanje stafilokoknih proteinaza	40
3. 7. Aktivnost ekstrakata stafilokoknih proteinaza	42
3. 8. Uticaj jona i inhibitora na aktivnost proteinaza	43
3. 9. Određivanje molekulskih masa stafilokoknih proteinaza	45
3. 10. Distribucija stafilokoknih proteinaza u kulturi	46
3. 11. Hibridizacija totalne DNK stafilokoka sa laktokokalnim proteinaznim probama	46
3. 12. Utvrđivanje prisustva ekstracelularnih proteinaza kod prirodnih izolata laktobacila	47
3. 12. 1. Proteolitička aktivnost laktobacila	47
3. 12. 2. Određivanje opsega pH vrednosti za proteolitičku aktivnost	50
3. 12. 3. Hibridizacioni eksperimenti i konstrukcija restrikcionih mapa proteinaznih regiona	51
<b>4. Diskusija</b>	54
<b>5. Zaključci</b>	60
<b>6. Literatura</b>	62

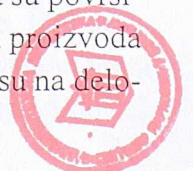
# 1. UVOD

## 1. 1. Bakterije iz familije *Micrococcaceae*; rod *Staphylococcus*

Bakterije iz familije *Micrococcaceae* su Gram - pozitivne nesporogene koke, ćelije su oblika lopte prečnika od 0,5 do 2,5  $\mu\text{m}$ , a na mikroskopskom preparatu se mogu videti kao pojedinačne, u parovima, tetradama ili u obliku nepravilnih grupacija (grozdova). Ove bakterije su aerobne ili fakultativno anaerobne, najčešće katalaza - pozitivne i u najvećem broju slučajeva nepokretne. Svi sojevi rastu u prisustvu 5% NaCl, a veliki broj sojeva raste i na koncentracijama od 10 do 15% NaCl. Familija *Micrococcaceae* obuhvata četiri roda, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus* i *Stomatococcus*. Iako su trenutno grupisani u jednu familiju, za ove rodove se može reći da nisu filogenetski bliski, s obzirom na veoma širok raspon G + C sastava njihove DNK (od 30 do 75 mol%). Ovome u prilog ide i različit sastav ćelijskog zida (Schleifer, 1973), hibridizacioni eksperimenti (Schleifer et al., 1979; Kilpper - Bälz and Schleifer, 1981), kao i uporedna analiza 16S rRNK sekvenci (Stackebrandt and Woese, 1979; Stackebrandt et al., 1983). Ove studije su pokazale da su mikrokoke filogenetski bliske rodu *Arthrobacter* (Stackebrandt et al., 1980), planokoke određenim predstavnicima roda *Bacillus* a stafilokoke velikoj grupi bakterija *Bacillus - Lactobacillus - Streptococcus*. Rod *Stomatococcus* predstavlja nezavisnu liniju koja obuhvata samo jednu vrstu i javlja se kao deo normalne oralne mikroflore čoveka, dok rod *Planococcus* obuhvata dve vrste karakteristične za određena staništa (morska voda, morske ribe i školjke).

Najveći broj vrsta u okviru familije *Micrococcaceae* obuhvataju rodovi *Micrococcus* i *Staphylococcus*. Rod *Micrococcus* obuhvata striktno aerobne bakterije čije je primarno stanište površina kože sisara, mada mogu biti izolovane i iz uzoraka zemljišta, vode i proizvoda od mesa, kao i mleka i mlečnih proizvoda. Mikrokoke se na mikroskopskom preparatu redovno pojavljuju u obliku tetrada, što predstavlja jedan od kriterijuma za njihovo razlikovanje od ostalih rodova iz familije *Micrococcaceae*. Još jedna karakteristika koja razlikuje mikrokoke od ostalih rodova je i njihova sposobnost rasta na podlozi sa furazolidonom (von Rheinbaben and Hadlok, 1981), koji u potpunosti inhibira rast stafilokoka. Optimalna temperatura za rast mikrokoka se kreće u opsegu od 25°C do 37°C, a većina vrsta raste na podlogama sa koncentracijom NaCl od 7,5%. (Kocur, 1986)

Rod *Staphylococcus* obuhvata 19 vrsta i najbrojniji je u familiji *Micrococcaceae*. Ove bakterije su fakultativno anaerobne, i sa izuzetkom jedne anaerobne vrste (*S. sacharolyticus*) ostvaruju bolji rast u aerobnim uslovima. Većina sojeva raste u prisustvu NaCl u koncentraciji od 10% i na temperaturama od 18°C do 40°C. Primarno stanište stafilokoka su površina kože i sluzokože sisara, mada mogu biti izolovane i iz uzoraka mleka, mlečnih proizvoda i mesa, kao i iz zemljišta, vazduha i vode. Za razliku od ostalih rodova rezistentni su na delo-





vanje lizozima, ali liziraju u prisustvu lizostafina. Neke vrste (*S. aureus*, *S. intermedius*) su patogene u odnosu na čoveka ili druge sisare, dok je određen broj vrsta potencijalno patogen, s obzirom na to da se mogu javiti kao izazivači sekundarnih infekcija. S druge strane, *Staphylococcus carnosus* izolovan iz mesnih prerađevina, komercijalno se koristi kao starter kultura za proizvodnju suvih kobasica (Fischer and Schleifer, 1980).

Predstavnici rodova *Micrococcus* i *Staphylococcus* se u velikom broju slučajeva mogu naći u zajedničkim staništima; u uzorcima kravljeg ili ovčijeg sirovog mleka redovno se nalaze mešane populacije mikrokoka i stafilokoka (Bautista et al, 1986). S obzirom na to, prilikom determinacije prirodnih izolata često dolazi do njihove pogrešne klasifikacije u jedan od ova dva roda. U ranijem periodu, najčešće se dešavalo da nepatogene, saprofitske stafilokoke budu svrstavane u rod *Micrococcus*. To je bio slučaj sa anaerobnom vrstom *Staphylococcus sacharolyticus* (ranije *Micrococcus sacharolyticus*), kao i sa vrstom *S. hyicus* (ranije *M. hyicus*) čije je primarno stanište površina kože svinja i goveda. *Staphylococcus caseolyticus* predstavlja vrstu čiji se predstavnici najčešće mogu izolovati iz uzoraka mleka i mlečnih proizvoda (sireva) i za koje je karakteristična proteolitička aktivnost koja se ogleda u sposobnosti hidrolize kazeina. Za neke sojeve, ranije pogrešno svrstavane u mikrokoke (*Micrococcus caseolyticus* ATCC 13548, *M. varians* ATCC 29750), naknadnom determinacijom je utvrđeno da pripadaju vrsti *Staphylococcus caseolyticus* (Kloos and Schleifer, 1986). Do ovih grešaka je najčešće dolazilo zbog korišćenja nedovoljno pouzdanih kriterijuma za determinaciju, kao što su aeroban ili fakultativno anaeroban rast, oblik i boja kolonija, kao i fiziološke i biohemijske karakteristike uglavnom vezivane za patogenost testiranih izolata. Najpouzdaniji kriterijumi za razlikovanje ova dva roda su zastupljenost G+C baznih parova u DNK (30 - 39 G+C mol% za *Staphylococcus*, odnosno 65 - 75 G+C mol% za *Micrococcus*), zatim formiranje tetrada i sposobnost rasta na podlozi sa furazolidonom kod mikrokoka, kao i prisustvo teihoične kiseline u strukturi ćelijskog zida kod stafilokoka (Kloos and Schleifer, 1986; von Rheinbaben and Hadlok, 1981). S obzirom da je cilj ovog rada izučavanje proteinaznog sistema saprofitskih, nepatogenih stafilokoka, u pregled podataka o proteolitičkoj aktivnosti ovih bakterija će biti uključeni i rezultati vezani za bakterije prvobitno svrstane u rod *Micrococcus*, za koje je kasnije pokazano da pripadaju stafilokokama.

## 1. 2. Bakterije iz roda *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* obuhvata Gram-pozitivne, nesporogene bakterije čije su ćelije oblika dužih ili kraćih štapića, često povezanih u lance; ćelije su uglavnom nepokretne, osim u retkim slučajevima kada se pokretljivost ostvaruje pomoću flagela. Laktobacili spadaju u katalaza - negativne, mikroaerofilne bakterije, i najbolji rast na površini čvrstih hranljivih podloga postižu u uslovima redukovano parcijalnog pritiska kiseonika i pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5 do 10%. Imaju fermentativan metabolizam, pri čemu mlečna kiselina predstavlja najmanje polovinu finalnog produkta fermentacije. Pored mlečne kiseline, kao proizvodi fermentacije javljaju se i acetat, etanol, CO<sub>2</sub>, mravlja kiselina ili sukcinat. Svi laktobacili imaju veoma kompleksne nutritivne zahteve, s obzirom da u podlozi za rast, pored ugljenih hidrata i soli, zahtevaju i prisustvo brojnih aminokiselina, vitamina i masnih kiselina. Ove bakterije rastu na temperaturama od 2°C do 53°C, dok se optimalne temperature za većinu vrsta kreću između 30°C i 40°C. Optimalne pH vrednosti za rast laktobacila se kreću od 5,5 do 6,2

iako dobro rastu i kada je pH sredine 5 ili manje. Sastav njihove DNA varira od 32 do 53 G + C mol %. Rod *Lactobacillus* inače obuhvata 44 vrste uz nekoliko podvrsta, a njihovi predstavnici se mogu izolovati iz različitih prirodnih staništa. Sa površine biljnog materijala izolovani su *Lactobacillus plantarum*, *L. coryniformis*, *L. brevis*, *L. sake*, *L. curvatus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* i *L. fermentum* (Sharpe, 1981; Steinkraus, 1983; Kandler, 1984). Za određeni broj vrsta kao što su *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri* i *L. gasseri*, prirodno stanište predstavljaju različiti delovi digestivnog trakta čoveka i drugih sisara (Sharpe, 1981). U proizvodima od mesa prisutni su *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. curvatus* kao i *L. divergens*, koji se koristi kao starter kultura u proizvodnji kobasica, u kombinaciji sa stafilokokama (Holzapfel and Berger, 1983). U mleku i mlečnim proizvodima se, iako mleko ne predstavlja prirodno stanište laktobacila, mogu naći *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. plantarum* i *L. brevis*. Prisustvo *L. helveticus*, koji se koristi kao starter kultura za sireve je karakteristično za mlečne proizvode, kao i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *L. kefir*, vrsta koje su izolovane iz odgovarajućih kiselo-mlečnih proizvoda (jogurt i kefir). S obzirom na to da se laktobacili koriste kao komercijalne starter kulture i da se javljaju kao mikroflora velikog broja fermentisanih prehrambenih proizvoda, izučavanje njihovih fizioloških i genetičkih svojstava ima veliki značaj (Kandler and Weiss, 1986).

### 1. 3. Klasifikacija proteinaza. Bakterijske proteinaze

Proteinaze predstavljaju enzime koji katalizuju hidrolizu peptidnih veza unutar polipeptidnih lanaca. Do sada je okarakterisano nekoliko stotina enzima iz ove grupe, koji se razlikuju kako po specifičnosti za peptidne veze koje grade određene aminokiseline, tako i po strukturi svog katalitičkog centra. U odnosu na to koje bočne grupe aminokiselina sačinjavaju katalitički centar, proteinaze se mogu svrstati u četiri tipa: serinske, cisteinske, aspartične i metaloproteinaze. Pored toga, u petu grupu proteinaza se može svrstati značajan broj enzima čiji mehanizam katalize još uvek nije utvrđen. (Barrett and Rawlings, 1991).

#### 1. 3. 1. Proteinaze serinskog tipa

Proteinaze serinskog tipa predstavljaju najbrojniju i najraznovrsniju grupu prisutnu kod bakterija i viših organizama, na osnovu čega se može zaključiti da je njihov mehanizam hidrolize peptidne veze najefikasniji. Dve glavne grupe enzima u okviru serinskog tipa su proteinaze himotripsinske grupe i proteinaze subtilizinske grupe.

Za proteinaze himotripsinske grupe karakteristična je konzervativnost u strukturi, naročito izražena u aminokiselinskoj sekvenci u okolini bočnih grupa koje čine katalitički centar ("katalitička trijada" - histidin, asparaginska kiselina, serin). Bakterijske proteinaze male molekulske mase (oko 20 kDa) se u strukturi okoline katalitičkog centra veoma malo razlikuju od znatno većih enzima koji se sintetišu u pankreasu sisara (Delbaere et al., 1975; Craik et al., 1983). Razlike u strukturi se najčešće javljaju na N-terminusu polipeptidnog lanca, koji u slučaju proteinaza viših organizama ulaze u sastav proenzima. U himotripsinsku grupu proteinaza pored himotripsina spadaju i tripsin, trombin, plazmin, aktivatori plazminogena, elastaza iz pankreasa i leukocita, a od bakterijskih proteinaza *Staphylococcus* V8 endopeptidaza, *Streptomyces griseus* endopeptidaze A i B i mnoge druge.

Subtilizinska grupa serinskih proteinaza u aktivnom centru takođe sadrži katalitičku trijadu (Asp<sup>32</sup>, His<sup>64</sup> i Ser<sup>221</sup> u slučaju subtilizina) sa konzervativnom okolinom koja je karakteristična i za ostale enzime iz ove grupe. Iako himotripsinska i subtilizinska grupa enzima imaju različite aminokiselinske sekvence i drugačije tercijerne strukture polipeptidnih lanaca, prostorna organizacija katalitičkog centra im je veoma slična. Na osnovu toga se može reći da ove dve grupe proteinaza imaju različito evolutivno poreklo, pri čemu je sličnost u organizaciji njihovih katalitičkih centara rezultat konvergentnog razvoja. (Barrett and Rawlings, 1991).

Do pre izvesnog vremena smatralo se da su proteinaze subtilizinskog tipa prisutne jedino kod bakterija, ali je njihovo postojanje utvrđeno i kod drugih mikroorganizama, biljaka i životinja. Pored subtilizina, u ovu grupu spadaju elastaza iz *Bacillus*-a, alkalna endopeptidaza iz *Aspergillus*-a, kao i proteinaze ćelijskog omotača laktokoka.

Subtilizinske proteinaze bakterijskog porekla po pravilu ne sadrže cistein, i u skladu s tim u njihovoj strukturi nema disulfidnih veza. Neki od ovih enzima, međutim, kao što su termitaza iz *Thermoactinomyces vulgaris*, i eukariotski enzimi proteinaza K i proteinaza B (poreklom iz kvasca), imaju u svojoj strukturi jedinstvenu bočnu grupu cisteina koja se u slučaju termitaze nalazi u blizini histidinskog ostatka iz katalitičkog centra. (Moehle et al., 1987; Betzel et al., 1990). Iz tog razloga, neki agensi koji reaguju sa -SH grupom cisteina dovode do inhibicije aktivnosti ovih enzima tako da su u tom slučaju oni osetljivi i na specifične inhibitore proteinaza cisteinskog tipa.

Značajna funkcija subtilizinskih proteinaza kod velikog broja eukariota je prevođenje pro-proteina u njihove aktivne forme odstranjivanjem pro-regiona, pri čemu dolazi do hidrolize peptidnih veza pored dve bazne aminokiseline. Jedan od takvih enzima je keksin, proteinaza izolovana iz kvasca, čija je funkcija proteolitička obrada  $\alpha$ -seks faktora ( $\alpha$ -mat-ing factor) kvasca. Soj kvasca koji nosi mutaciju u *kex 2* genu, odgovornom za sintezu keksina, nema sposobnost sinteze funkcionalnog  $\alpha$ -seks faktora, koji u odsustvu ove proteinaze ostaje u formi pro-proteina. Aktivnost keksina stimulišu joni Ca<sup>++</sup> i tiolni agensi, a njegova aminokiselinska sekvenca pokazuje visoku homologiju sa subtilizinom. (Mizuno et al., 1988). Ovakav način aktivacije (hidroliza pro-proteina na mestu na kome se nalaze dve bazne aminokiseline) prisutan je kod mnogih proteina sisara, uključujući i insulin i adrenokortikotropni hormon (ACTH). Pretpostavlja se da su u ove procese uključene subtilizinske proteinaze kao što su Furin, PC1 i PC2. (Benjannet et al., 1991; van de Ven et al., 1990.)

Pored himotripsinske i subtilizinske grupe, u serinski tip proteinaza spadaju i neki enzimi koji se ne mogu svrstati ni u jednu od pomenutih grupa. Jedan od njih je prolil endopeptidaza, koja hidrolizuje peptidne veze prolina u peptidima srednje veličine i koja je prisutna u velikom broju organizama, od bakterija do sisara. Ovaj enzim je inhibiran diizopropil fluorofosfatom (DFP), specifičnim inhibitorom serinskih proteinaza koji se u ovom slučaju vezuje za serin 554 (Rennex et al., 1991) ali ga istovremeno inhibiraju i inhibitori cisteinskih proteinaza. Bakterija *Escherichia coli* takođe sintetiše određen broj atipičnih serinskih proteinaza. Tu spada proteinaza IV, membranski protein u čiji sastav ulaze četiri subjedinice molekulske mase od 67 kDa. Ova proteinaza hidrolizuje karboksilni kraj peptidne veze hidrofobnih aminokiselina, a smatra se da je njena funkcija degradacija slobodnih lider-peptida (posle odvajanja od pro-proteina). (Dev and Ray, 1990). Još jedan membranski protein *E. coli*, proteinaza VII, predstavlja enzim uključen u obradu pro-proteina, pri čemu

hidrolizuje peptidne veze između dve bazne aminokiseline (Sugimura and Nishihara, 1988).

Aktivnost ove dve proteinaze je inhibirana DFP, kao i drugim specifičnim inhibitorima serinskih proteinaza, ali njihova aminokiselinska sekvenca ne pokazuje homologiju ni sa jednim od enzima subtilizinske ili himotripsinske grupe (Barrett and Rawlings, 1991).

### 1. 3. 2. Proteinaze cisteinskog tipa

U okviru proteinaza cisteinskog tipa najveći broj predstavnika pripada enzimima papainske grupe. Drugu grupu obuhvataju kalpainske proteinaze, a pored toga postoji i određeni broj enzima koji se ne mogu svrstati ni u jednu od ove dve grupe.

U papainsku grupu cisteinskih proteinaza, pored papaina uglavnom spadaju enzimi poreklom iz biljaka, kao što su himopapain, aktinidin, ficin, aleurain, papaja endopeptidaze III i IV i drugi. Svi ovi enzimi imaju veoma konzervativnu strukturu u okolini katalitičkog centra, koji u slučaju papaina čine Cys<sup>25</sup> i His<sup>159</sup>. Pored biljaka, cisteinske proteinaze papainske grupe se mogu naći i kod velikog broja protozoa (*Trypanosoma*, *Haemonchus*, *Schistosoma*, itd.) (Barrett and Rawlings, 1991).

Drugu grupu cisteinskih proteinaza čine kalpaini, enzimi prisutni kod velikog broja invertebrata i vertebrata. U njihov sastav ulaze dve subjedinice čije su molekulske mase 80, odnosno 30 kDa. U blizini N-terminusa veće subjedinice nalazi se region koji je odgovoran za proteolitičku aktivnost i koji pokazuje određeni stepen homologije sa papainom (Ohno et al., 1984). Na C-terminusu obe subjedinice nalaze se regioni odgovorni za vezivanje jona Ca<sup>++</sup> koji imaju ulogu u regulaciji aktivnosti kalpaina. Ovi enzimi se uglavnom nalaze u citosolu, ali mogu biti vezani i za ćelijske membrane i uključeni u određene procese koji se na njima odvijaju (Suzuki et al., 1987).

U odnosu na prve dve navedene grupe, cisteinske proteinaze bakterijskog porekla imaju znatno drugačiju strukturu. Streptokokalna cisteinska proteinaza pokazuje određene sličnosti sa papainom u regionu aktivnog centra koji pokazuje veliki afinitet za vezivanje bočne grupe fenilalanina (Kortt and Liu, 1973), ali, ukupno gledano, aminokiselinska sekvenca ne pokazuje homologiju sa papainom. Klostripain, proteinaza koju proizvodi *Clostridium histolyticum*, specifično hidrolizuje peptidne veze koje formira arginin (Siffert et al., 1976) ali njena aminokiselinska sekvenca u okolini katalitičkog cisteinskog ostatka ne pokazuje homologiju ni sa jednom od poznatih cisteinskih proteinaza (Gilles et al., 1983).

### 1. 3. 3. Aspartične proteinaze

Jedna od glavnih karakteristika aspartičnih proteinaza su veoma niske optimalne pH vrednosti, što proizilazi iz činjenice da njihov katalitički centar čine bočne grupe kiselih aminokiselina. Kod svih proteinaza ovog tipa koje potiču iz viših organizama, kao i kod većine onih koje sintetišu gljive, u sastav katalitičkog centra ulaze dve bočne grupe asparaginske kiseline. Ovi enzimi su prisutni u velikom broju organizama, mada se kod bakterija javljaju relativno retko.

Najveći broj proteinaza aspartičnog tipa pripada pepsinskoj grupi, u koju pored pepsina spadaju himozin, renin, rizopuspepsin, endotiapepsin, aspergilopepsini itd. (Barrett and Rawlings, 1991). Zajednička osobina proteinaza iz ove grupe je to da se njihovi molekuli

sastoje od dva simetrična dela sa aktivnim mestom smeštenim između njih; u slučaju pepsina katalitički centar čine Asp<sup>32</sup> i Asp<sup>215</sup>. Okolina ovih aminokiselina (aminokiseline 30-42 i 213-225) pokazuje visoku međusobnu homologiju, što navodi na zaključak da su ovi enzimi nastali kao rezultat duplikacije gena (Tang et al, 1978; James and Sielecki, 1987).

Pored pepsinske grupe, postoje i enzimi kojima bi, s obzirom na strukturu katalitičkog centra, više odgovarao naziv "karboksilne proteinaze". Gljiva *Scytalidium lignorum* sintetisuje nekoliko kiselih proteinaza čija aktivnost, za razliku od pepsinske grupe, nije inhibirana pepstatinom. Jedna od njih, proteinaza B, ima molekulsku masu od 20 kDa i najverovatnije je aktivna samo u obliku dimera. Pored toga, pretpostavlja se da umesto asparaginske kiseline, katalitički centar ovog enzima čine bočne grupe glutaminske kiseline (Tsuru et al. , 1986).

Kisele proteinaze rezistentne na pepstatin su, mada u manjoj meri, prisutne i kod bakterija. One su izolovane iz predstavnika rodova *Pseudomonas* i *Xanthomonas* (Barrett and Rawlings, 1991), kao i iz termofilnih arheobakterija. Termopsin, proteinaza koju sintetisuje termofilna arheobakterija (Fusek et al. , 1990) ima aminokiselinsku sekvencu koja ne pokazuje nikakvu homologiju sa do sada proučenim enzimima ovog tipa, tako da njen nastanak verovatno predstavlja nezavisan evolutivni događaj. (Lin and Tang, 1990).

#### 1. 3. 4. Metaloproteinaze

Zajednička osobina svih metaloproteinaza je prisustvo cinka u katalitičkom centru enzima, mada neke od njih zadržavaju aktivnost ukoliko je atom cinka zamenjen kobaltom. Najbolje izučena metaloproteinaza je termolizin, enzim koji sintetisuje *Bacillus thermoproteolyticus*. U slučaju termolizina, u aktivnom mestu se nalazi atom cinka vezan za dve bočne grupe histidina, kao i jedna bočna grupa glutaminske kiseline (Barrett and Rawlings, 1991). Aminokiselinska sekvencu - His - Glu - Xaa - Xaa - His - (označena kao "HEXXH") zadužena za vezivanje cinka je pronađena kod svih detaljnije okarakterisanih metaloproteinaza, kao i kod nekih metaloaminopeptidaza. Pored termolizina, u metaloproteinaze spadaju i Bacilolizin, elastaza iz *Pseudomonas*-a, intersticijska kolagenaza, želatinaze A i B, metaloproteinaza iz *Serratia*-e kao i kolagenaze mikrobijalnog porekla. Pored enzima koji u svojoj strukturi sadrže pomenutu "HEXXH" sekvencu, moguće je izdvojiti još dve grupe metaloproteinaza. Jednu od njih predstavlja metaloproteinaza prisutna kod predstavnika rodova *Achromobacter* i *Enzymogenes*. Ova proteinaza hidrolizuje peptidne veze koje formira amino-grupa lizina, a učestvuje u razgradnji ćelijskog zida kod bakterija (Li et al. , 1990). Drugu grupu predstavlja insulinaza, citoplazmatski enzim čije je prisustvo utvrđeno kod velikog broja organizama, od *Drosophila melanogaster* (Kuo et al, 1990) do sisara (Duckworth, 1988). Iako enzimi iz ove dve grupe imaju osobine koje ih svrstavaju u metaloproteinaze, nijedan od njih ne sadrži aminokiselinske sekvence koje bi pokazivale homologiju sa metaloproteinazama, kao ni sa drugim tipovima proteinaza (Barrett and Rawlings, 1991).

#### 1. 3. 5. Proteinaze nedefinisanog tipa

Pored navedena četiri tipa proteinaza, postoji određen broj enzima koji se ne mogu svrstati ni u jednu od ove četiri kategorije. Nemogućnost klasifikacije ovih enzima proističe

iz eksperimenata određivanja njihove senzitivnosti na specifične inhibitore, kao i iz poređenja njihovih aminokiselinskih sekvenci sa proteinazama definisanog tipa.

Bakterija *Escherichia coli* sintetishe dve proteinaze, lider-peptidazu I i II, koje spadaju u transmembranske proteine, a same su sintetisane bez lider-peptida. Lider-peptidaza I ima molekulska masu od 37 kDa, učestvuje u obradi većine eksportnih proteina i predstavlja produkt *LEP* gena. Lider-peptidaza II ima funkciju uklanjanja lider-sekvence mureinskog lipoproteina, koji inače predstavlja jednu od glavnih komponenti spoljašnje membrane *E. coli*. Ovaj enzim ima molekulska masu od 18,7 kDa i predstavlja produkt *LSP* gena. Aminokiselinske sekvence lider-peptidaza I i II ne pokazuju homologiju ni sa jednom od izučenih proteinaza bilo kog tipa, kao ni međusobno. (Dev and Ray, 1990).

Za razliku od bakterijskih lider-peptidaza, eukariotske lider-peptidaze se uvek sastoje od nekoliko subjedinica (2-5). Među nekim subjedinicama različitih organizama postoji određen stepen homologije (npr. , dve subjedinice sisarske lider-peptidaze od 18 i 21 kDa pokazuju homologiju sa jednom od subjedinica lider-peptidaze kvasca), ali se, kao ni bakterijske, ni eukariotske proteinaze ne mogu svrstati ni u jednu od četiri definisane kategorije proteinaza (Dev and Ray, 1990).

#### 1. 4. Proteolitička aktivnost bakterija iz familije *Micrococcaceae*

Ispitivanja proteolitičke aktivnosti bakterija iz familije *Micrococcaceae* su se uglavnom odnosila na njihovo delovanje na kazein i njegove frakcije u mleku i mlečnim proizvodima (sirevima), s obzirom da ove bakterije predstavljaju njihovu normalnu mikrofloru. Veći deo sojeva čija je proteolitička aktivnost do sada okarakterisana spada u saprofitske vrste prvobitno klasifikovane u rod *Micrococcus* (*M. caseolyticus*, *M. freudenreichii*) i naknadnom determinacijom uvršćene u rod *Staphylococcus* (*S. caseolyticus*). Najveći broj radova iz ranijeg perioda obuhvata detektovanje prisustva mikrokoka u određenim vrstama sireva i njihovu ulogu u sazrevanju sireva zbog proteolitičke i lipolitičke aktivnosti (Alfred and Frazier, 1950; Botazzi and Battistotti, 1966). Takođe, utvrđeno je da proteolitički aktivne mikrokoke, ukoliko se koriste kao starter kultura u kombinaciji sa bakterijama mlečne kiseline, ubrzavaju proces sazrevanja sireva (Ritter, 1962; Šutić, 1966; Marceron et al. , 1966). S obzirom da bakterije mlečne kiseline nemaju sposobnost sinteze većeg broja aminokiselina, produkti hidrolize kazeina, nastali pod delovanjem mikrokokalnih proteinaza, ubrzavaju njihov rast i na taj način skraćuju period zrenja sireva.

Prilikom testiranja jedne od kolekcija prirodnih izolata mikrokoka (Desmazeaud and Devoyod, 1970) utvrđeno je da od 306 analiziranih sojeva 45 ima veoma visoku proteolitičku aktivnost u odnosu na kazein, kao i sposobnost stimulacije rasta termofilnih streptokoka, dok 20 sojeva pokazuje inhibitornu aktivnost (korišćeni su sojevi *Streptococcus thermophilus* C. N. R. Z. 7, 22 i 302. ). Nijedan od prirodnih izolata mikrokoka ne pokazuje nikakav efekat na rast laktobacila. Pri tome, pod terminom "mikrokoke" obuhvaćene su sve Gram-pozitivne, katalaza - pozitivne, koagulaza - negativne koke koje su u ovom slučaju izolovane iz uzoraka sirovog mleka, pasterizovanog mleka i sireva. Jedan od prirodnih izolata sa izraženom proteolitičkom aktivnošću, označen kao *Micrococcus caseolyticus* M96, detaljnije je okarakterisan i utvrđeno je da pored  $\alpha_{S1}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  - i totalnog kazeina hidrolizuje i druge proteinske supstrate kao što su lizozim, insulin i glukagon. Soj *M. caseolyticus* M96 je zase-

javan u različite medijume za rast koji sadrže kazein; analizom filtrata ovih kultura utvrđeno je da produkti degradacije kazeina koji nastaju pod delovanjem mikrokokalne proteinaze stimulišu rast termofilnih streptokoka. Tom prilikom pokazano je i da je ovaj stimulatívni efekat najizraženiji u slučaju oligopeptida molekulske mase od 1000 do 1500 Da. Pored produkata degradacije kazeina, rast termofilnih streptokoka stimulišu i produkti degradacije drugih proteinskih supstrata.

Do sličnih rezultata su došli i drugi autori (Šutić, 1964; Stević i Awan, 1973; Nath and Ledford, 1971), pri čemu je pokazan stimulatívni efekat proteolitički aktivnih mikroko-ka i na rast bakterija iz rodova *Lactococcus* i *Lactobacillus*.

Pored navedenih podataka koji se uglavnom odnose na generalnu proteolitičku aktivnost mikroko-ka, postoji veoma ograničen broj radova u kojima su proteinaze ovih bakterija detaljnije biohemijiski okarakterisane.

Jedan od sojeva koji sintetišu ekstracelularne proteinaze je soj *Micrococcus freudenreichii* ATCC 407. Proteinaza koju sintetiše ovaj soj se oslobađa u medijum za rast i njena aktivnost se detektuje u supernatantu kulture (Husain and McDonald, 1958). Optimalna pH vrednost za hidrolizu kazeina od strane ovog enzima iznosi 5,7, a njegovo oslobađanje u medijum se povećava tokom eksponencijalne faze rasta i dostiže maksimum na prelasku u stacionarnu fazu. Proteolitička aktivnost ćelija posle centrifugiranja je zanemarljiva, iz čega se zaključuje da se radi o ekstracelularnoj proteinazi. U supernatantu kultura tretiranih lizozimom primećuje se znatno povećanje proteolitičke aktivnosti sa pH optimumom od 5,7 što može biti rezultat ubrzanog oslobađanja proteinaze ili delovanja intracelularnih proteinaza. Ukupan ćelijski lizat kulture ima, u odnosu na hidrolizu kazeina, pH optimum između 7,0 i 8,0, kao i visoku peptidaznu aktivnost (Mc Donald, 1965). Pored toga, izučavan je i uticaj medijuma za rast na nivo proizvodnje proteinaze. Soj *M. freudenreichii* 407 gajen je u bazalnom minimalnom medijumu koji sadrži metionin, tiamin, biotin,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$  i  $\text{FeSO}_4$  pri čemu su u ovoj podlozi korišćeni različiti izvori ugljenika. Ukoliko se u minimalnom medijumu kao izvori ugljenika koriste glutaminska kiselina, glutamin, asparaginska kiselina ili asparagin, proizvodnja proteinaze je veoma visoka. Soj *M. freudenreichii* 407 dobro raste i kada se kao izvor ugljenika koriste maltoza, maltotrijoza, maltotetroza, sukcinat, malat i fumarat, ali je u tim slučajevima proizvodnja proteinaze relativno niska. Kada se međutim, u minimalni medijum sa maltozom dodaju pojedinačne aminokiseline (arginin, prolin, lizin, leucin, fenilalanin), dolazi do povećanja sinteze proteinaze, mada je u prethodnim eksperimentima pokazano da ovaj soj ne može da raste u prisustvu navedenih aminokiselina kao jedinih izvora ugljenika. Ovi rezultati sugerišu da je soj *M. freudenreichii* 407 u odnosu na sintezu ekstracelularne proteinaze parcijalno konstitutivan, mada u ovom slučaju nije ispitan uticaj koncentracije oligopeptida na sintezu proteinaze, iako su oni krajnji produkti njenog delovanja. Pored toga, u medijumu sa glutaminskom kiselinom u kome je sinteza proteinaze na visokom nivou, dodavanjem izvora ugljenika kao što su maltoza ili sukcinat dolazi do smanjenja sinteze proteinaze, po svemu sudeći pod uticajem metaboličke represije. Iz činjenice da je sinteza ekstracelularne proteinaze stimulisana aminokiselinama i suprimirana dodavanjem maltoze ili sukcinata kao i na osnovu sposobnosti ovog soja da koristi aminokiseline kao izvor ugljenika, može se pretpostaviti da je funkcija ove proteinaze snabdevanje ćelije ugljenikom neophodnim za rast, a ne snabdevanje aminokiselinama za sintezu proteina (Mc Donald and Chambers, 1966).

Jedan od detaljnije okarakterisanih enzima je ekstracelularna proteinaza soja *Micrococcus caseolyticus* M96 (Desmazeaud and Hermier, 1968 b). Ovaj soj, kao što je prethodno navedeno, svojom proteolitičkom aktivnošću stimuliše rast bakterija mlečne kiseline. Utvrđeno je da on sintetiše ekstracelularnu proteinazu koja se oslobađa u supernatant kulture, s obzirom da ćelije preostale posle centrifugiranja kulture ne pokazuju proteolitičku aktivnost. Molekulska masa purifikovanog enzima je procenjena na 38 kDa ( $\pm 3$  kDa), pH optimum se kreće oko 7,4 a temperaturni optimum iznosi 50°C. Proteinaza pokazuje znatno veći afinitet prema kazeinu nego prema drugim proteinskim supstratima (denaturisani hemoglobin,  $\beta$ -laktoglobulin). Pored toga, ovaj enzim ispoljava osobine metaloproteinaza, pošto je njegova aktivnost potpuno inhibirana u prisustvu EDTA i Na-citrata. Inhibitorni efekat ispoljavaju i joni teških metala ( $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Ag}^{++}$ ,  $\text{Pb}^{++}$ ), dok prisustvo jona  $\text{Ca}^{++}$  ili  $\text{Sr}^{++}$  dovodi do parcijalne reaktivacije enzima (60%, odnosno 40%). Specifični inhibitori serinskih i cisteinskih proteinaza (diizopropilfluorofosfat, odnosno jodoacetat) ne ispoljavaju nikakav inhibitorni efekat na aktivnost ove proteinaze, dok redukujući agensi ( $\beta$ -merkapto-etanol) dovode do parcijalne inhibicije.

Prisustvo jona  $\text{Ca}^{++}$  je veoma bitno za stabilnost ovog enzima. U puferu bez jona  $\text{Ca}^{++}$  enzim je stabilan samo u veoma uskom opsegu pH vrednosti (oko 7,0), dok je u prisustvu 1, 5 mM  $\text{CaCl}_2$  stabilan od pH 6,5 do pH 8,5. Pretpostavlja se da je nestabilnost proteinaze rezultat autokatalitičkog procesa koji je inhibiran prisustvom jona  $\text{Ca}^{++}$ , koji tu funkciju imaju i u slučaju drugih bakterijskih proteinaza, kao što su proteinaza iz *Micrococcus lysodeicticus* (*Sarcina flava*) (Vallier, 1966), i proteinaze bakterija mlečne kiseline (Haandrikman et al. , 1991). Pored toga, ovaj enzim se i u prisustvu  $\text{Ca}^{++}$  veoma lako termički inaktivira, s obzirom da pad aktivnosti na 60°C iznosi 60%, a na 65°C 75%.

Proteinaza soja *Micrococcus caseolyticus* M96 ispoljava isključivo endopeptidaznu aktivnost, pri čemu hidrolizuje peptidne veze koje formiraju amino-grupe hidrofobnih aminokiselina (Desmazeaud and Hermier, 1971). Prilikom testiranja egzopeptidazne aktivnosti korišćeni su amidi Leu ( $\text{NH}_2$ ) kao i dipeptidi Gly-Leu, Gly-Phe i Glu-Ala, i ni u jednom slučaju nije došlo do hidrolize odgovarajućih veza. Pored toga, ni prilikom digestije glukagona nije detektovana pojava slobodnih aminokiselina, čime je potvrđena činjenica da ovaj enzim ne poseduje egzopeptidaznu aktivnost.

Za testiranje endopeptidazne aktivnosti korišćeni su disupstituisani dipeptidi (Z-Gly-X- $\text{NH}_2$ ; Z-karbobenzoksi ostatak) s obzirom da na monosupstituisane dipeptide enzim ne deluje. U ovom slučaju hidrolizovane su peptidne veze koje formiraju amino-grupe fenilalanina, alanina, valina, leucina, izoleucina, ali ne i triptofana. Najviši stepen hidrolize je dobijen sa dipeptidom u kome hidrolizovana peptidna veza sadrži amino grupu fenilalanina (Z-Gly-Phe- $\text{NH}_2$ ). Takođe, utvrđeno je da i aminokiselina koja u peptidnoj vezi učestvuje svojom karboksilnom grupom takođe utiče na enzimsku aktivnost, pošto je u grupi supstituisanih dipeptida Z-X-Phe- $\text{NH}_2$  najviši nivo hidrolize dobijen sa dipeptidom Z-Ala-Phe- $\text{NH}_2$ . Afinitet ove proteinaze prema hidrofobnim aminokiselinama je potvrđen i u eksperimentu digestije glukagona, prilikom koje su takođe hidrolizovane peptidne veze koje formiraju amino-grupe fenilalanina, alanina i leucina.

Neutralna proteinaza *M. caseolyticus* M96 na osnovu ovih rezultata ispoljava supstratnu specifičnost koja je slična proteinazama iz *Pseudomonas aeruginosa* (Moriyama and Tsuzuki, 1966) i *Streptomyces griseus* (Moriyama et al. , 1968) mada nije apsolutno specifična za hidrofobne aminokiseline kao npr. megateriopeptidaza iz *Bacillus megaterium* (Millet



and Archer, 1969), s obzirom da prilikom digestije glukagona u određenoj meri hidrolizuje i peptidnu vezu Ser-Arg. (Desmazeaud and Hermier, 1971).

Pored navedenih podataka, ispitivan je i uticaj različitih faktora na nivo sinteze proteinaze *M. caseolyticus* M96 u kulturi. Iako sam soj najbolje raste na 37°C, najviši nivo sinteze proteinaze je dobijen na 30°C, pošto je na toj temperaturi izmerena najviša specifična proteolitička aktivnost. Što se tiče uticaja pH vrednosti, brzina rasta kulture i sinteza proteinaze imaju maksimalne vrednosti na pH 7, i zbog toga tokom rasta kulture ovu pH vrednost treba održavati konstantnom. Prisustvo glukoze u medijumu ubrzava rast kulture, ali istovremeno dovodi do snižavanja pH vrednosti usled čega dolazi do ireverzibilne inaktivacije enzima, koja se može izbeći održavanjem konstantne vrednosti pH u kulturi. Glukoza sama po sebi ne povećava specifičnu proteolitičku aktivnost ćelija, ali ne dovodi ni do represije sinteze proteinaze kao u slučaju proteinaza iz *Micrococcus lysodeicticus* (*Sarcina flava*) (Gorini and Fromageot, 1950) i iz roda *Arthrobacter* (Hofsten and Tjeder, 1965). Aeracija kulture generalno ubrzava rast i povećava sintezu ekstracelularne proteinaze, dok prisustvo NaCl (u koncentracijama od 0,5 do 7%) nema uticaja na rast kulture i proizvodnju enzima. Potpuno izostavljanje NaCl u medijumu nema uticaja na rast kulture ali izaziva opadanje specifične proteolitičke aktivnosti ćelija za 50%.

Slobodne aminokiseline (Casamino acids) dovode do zanemarljivog povećanja proteolitičke aktivnosti ćelija u kulturi i ne pokazuju nikakav efekat represije sinteze enzima. Prisustvo proteina (kazein, serum-albumin,  $\beta$ -laktoglobulin) kao i enzimskih hidrolizata proteina (bakto-tripton, bakto-pepton) ne dovodi do ubrzanja rasta kulture ali drastično povećava specifičnu proteolitičku aktivnost (4 do 10 puta) pri čemu je ovaj efekat najizraženiji u prisustvu kazeina. U eksperimentu sa ćelijama u mirovanju, koje su prethodno oprane i resuspendovane u odgovarajućem puferu, utvrđeno je da hidrolizati proteina dovode do indukcije sinteze proteinaze, dok inkubacija sa kazeinom i drugim proteinima ne daje nikakav efekat, iako oni stimulišu sintezu enzima u ćelijama u fazi rasta. (Desmazeaud and Hermier, 1968 a).

Još jedna od ekstracelularnih proteinaza mikrokokka koja je detaljnije biohemijski okarakterisana je i proteinaza koju sintetiše prirodni izolat *Micrococcus* sp MCC - 315. Ovaj soj predstavlja jedan od 93 proteolitički aktivna prirodna izolata poreklom iz uzoraka čedar sira (Prasad et al. , 1983). Proteolitička aktivnost ovih izolata je određivana u odnosu na sposobnost hidrolize totalnog kazeina, a utvrđeno je i da 44 izolata, među kojima i *Micrococcus* sp MCC-315, imaju veoma visoku proteolitičku aktivnost u odnosu na  $\beta$ -kazein. Ekstracelularna proteinaza izolata MCC-135 je odabrana za detaljnije izučavanje; prethodno su utvrđeni optimalni uslovi za njenu sintezu u tečnoj kulturi (Prasad et al. , 1984) koji uključuju sastav medijuma za rast, temperaturu, aeraciju i dužinu inkubiranja, a zatim je ova proteinaza purifikovana i biohemijski okarakterisana. Optimalna pH vrednost za aktivnost prečišćenog enzima iznosi 10,6 i za totalni i za  $\beta$ -kazein, dok na višim pH vrednostima aktivnost drastično opada. Optimalna temperatura za hidrolizu totalnog kazeina iznosila je 60°C u prisustvu jona  $\text{Ca}^{++}$  odnosno 50°C u njihovom odsustvu. Ukoliko je kao supstrat korišćen  $\beta$ -kazein, optimalna temperatura se kretala između 37 i 40°C bez obzira na prisustvo jona  $\text{Ca}^{++}$ . Visoka vrednost pH optimuma svrstava ovaj enzim u alkalne proteinaze, slično proteinazi iz *Micrococcus sodonensis*, čiji se pH optimum kreće između 10 i 11 (Mills and Campbell, 1974). Što se tiče razlike u optimalnim temperaturama digestije totalnog

kazeina i  $\beta$ -kazeina, kao moguće objašnjenje ovog fenomena autori navode veću termostabilnost enzim - supstrat kompleksa u slučaju totalnog kazeina.

Termostabilnost same proteinaze je testirana u odnosu na njenu aktivnost prema  $\beta$ -kazeinu kao supstratu. U prisustvu jona  $\text{Ca}^{++}$  enzim zadržava 100% aktivnosti na  $45^{\circ}\text{C}$ , dok u odsustvu  $\text{Ca}^{++}$  na toj temperaturi gubi 20% svoje aktivnosti. Joni  $\text{Ca}^{++}$  generalno stabilizuju aktivnost proteinaze, ali bez obzira na njihovo prisustvo ili odsustvo, pri inkubaciji od 30 minuta na  $70^{\circ}\text{C}$  dolazi do potpune inaktivacije enzima.

Joni metala kao što su  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ ,  $\text{Sn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  i  $\text{Pb}^{++}$  deluju inhibitorno na enzim, smanjujući mu aktivnost od 38% do 54%, dok joni  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$  i  $\text{Fe}^{++}$  ispoljavaju slabiji stimulatorni efekat, koji je najizraženiji u prisustvu  $\text{Ca}^{++}$  sa povećanjem od 23%. Prilikom ispitivanja uticaja inhibitora na aktivnost ove proteinaze, utvrđeno je da EDTA, fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), diizopropilfluorofosfat (DFP) i jod izazivaju potpunu inaktivaciju enzima u 10mM koncentraciji. Pri 1mM koncentraciji EDTA i joda enzim je takođe potpuno inaktiviran, dok u prisustvu 1mM DFP ili PMSF on zadržava 35% svoje aktivnosti. U eksperimentima regeneracije enzimske aktivnosti posle delovanja EDTA, enzimskom preparatu su dodavani joni  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$  i  $\text{Mn}^{++}$  u 1mM ili 10mM koncentraciji, i ni u jednom slučaju nije došlo do reaktivacije enzima. Ostali testirani agensi, uključujući i  $\beta$ -merkaptotanol, kalijum ferocijanid, tripsin inhibitor ovomukoid i 1, 10 - fenantrolin (specifični inhibitor za metaloproteinaze sa jonom  $\text{Zn}^{++}$  u aktivnom centru) nemaju uticaja na aktivnost proteinaze ili pokazuju blagi stimulatorni efekat, uz povećanje aktivnosti do 19%.

Molekulska masa prečišćene proteinaze soja *Micrococcus* sp. MCC - 315 iznosi 28.9 kDa. Analizom aminokiselinskog sastava ovog enzima utvrđeno je da on sadrži 252 aminokiseline, a njihova distribucija pokazuje sličnosti sa alkalnim proteinazama poreklom iz roda *Bacillus* (Smith et al. , 1968, Tobe et al. , 1975, Yoshimoto et al. , 1971. ). Pored toga, u sastavu ovog enzima nije utvrđeno prisustvo cisteina, što isključuje njegovu moguću pripadnost cisteinskoj klasi proteinaza. S obzirom na rezultate eksperimenata sa specifičnim proteinaznim inhibitorima, ne može se sa sigurnošću reći da li proteinaza soja *Micrococcus* sp. MCC-315 pripada serinskoj klasi proteinaza ili metaloproteinazama. Specifični inhibitori serinskih proteinaza (DFP i PMSF) samo parcijalno inhibiraju enzim dok EDTA i u nižim koncentracijama dovodi do potpune inhibicije. S obzirom da joni  $\text{Ca}^{++}$  doprinose održavanju njegove aktivne konformacije autori predlažu da ovaj enzim bude svrstan u kalcijum-metaloproteinaze (Prasad et al. , 1986). Nemogućnost regeneracije enzimske aktivnosti posle delovanja EDTA, s druge strane, ostavlja otvorenim pitanje koji metal ulazi u sastav katalitičkog centra ovog enzima, ukoliko se radi o metaloproteinazi. Što se tiče specifičnosti u odnosu na supstrat, utvrđeno je da proteinaza iz *Micrococcus* sp. MCC -135 ima veći afinitet prema  $\beta$ -kazeinu nego prema totalnom kazeinu, ali nije ispitivan njen afinitet prema  $\alpha_{S1}$  - i  $\kappa$ -kazeinu, kao ni sposobnost hidrolize drugih proteinskih supstrata.

Proteolitički aktivan soj, čija je ekstracelularna proteinazna aktivnost testirana i u ovom radu, je i *Staphylococcus* sp M104 (ranije *Micrococcus*), soj iz laboratorijske kolekcije katedre za Mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Ranija istraživanja su pokazala da ovaj soj, zbog svoje proteolitičke aktivnosti, deluje stimulatивно na rast bakterija mlečne kiseline kada se sa njima nađe u mešanoj kulturi. Na osnovu ovih rezultata,



*Staphylococcus* sp. M104 je korišćen kao komponenta mešane starter kulture za izradu belog sira (Stević et al. , 1973), pri čemu je pored poboljšanih organoleptičkih svojstava sira postignuto i skraćenje perioda zrenja. Ista starter kultura je korišćena i u izradi kobasica, (Šutić and Joksimović, 1973), što je takođe rezultiralo poboljšanjem kvaliteta i skraćenim periodom zrenja. Pored toga, utvrđeno je i da soj *Staphylococcus* sp. M104 sintetiše ekstracelularnu proteinazu koja se oslobađa u medijum za rast. Nепреčišćeni ekstrakt ove proteinaze ima sposobnost koagulacije mleka, a gruš koji se pri tome formira ima osobine veoma slične onom koji se dobija pod delovanjem himozina. S obzirom na primenu ovog soja u starter kulturama, testirana je i proteinazna i peptidazna aktivnost pojedinih ćelijskih frakcija (Obradović, 1983). Tom prilikom je utvrđeno da ekstracelularna frakcija ( $\text{NH}_4$ - sulfatni precipitat supernatanta kulture), zatim frakcija ćelijskih zidova i intracelularna frakcija imaju sposobnost hidrolize totalnog kazeina, kao i da optimalna pH vrednost za sve tri frakcije iznosi 7,2. Frakcija ćelijskog zida i intracelularna frakcija ispoljavaju generalno viši nivo proteolitičke aktivnosti u odnosu na ekstracelularnu frakciju. Prema ovim rezultatima, ukupna proteolitička aktivnost soja *Staphylococcus* sp. M104 je najvećim delom koncentrisana u frakciji ćelijskog zida, a prilikom hidrolize totalnog kazeina ovom ćelijskom frakcijom dolazi do intenzivne degradacije  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazeina, dok je hidroliza  $\alpha_{S1}$ - kazeina nešto slabije izražena. Pored toga, pokazano je i da frakcije ćelijskih zidova sojeva *Staphylococcus* sp. M104 i bakterija mlečne kiseline (*Lactococcus lactis* NCDO 763 i *L. lactis* AK60) korišćeni u kombinaciji efikasnije hidrolizuju totalni kazein nego u slučaju korišćenja pojedinačnih frakcija.

Proteolitičku aktivnost mikrokoka ispitivali su i Bhowmik i Marth (1988). U ovim eksperimentima ispitivana je proteolitička aktivnost devet sojeva mikrokoka, poreklom iz laboratorijskih kolekcija ili prirodnih izolata, pri čemu je utvrđivana njihova intracelularna proteinazna i peptidazna aktivnost, kao i sposobnost rasta u mleku i proteolitičke promene koje u njemu izazivaju. Visok nivo intracelularne aminopeptidazne aktivnosti je detektovan kod većine testiranih sojeva, pre svega u slučaju *Micrococcus* sp. ATCC 398. Što se tiče delovanja na proteine mleka, utvrđeno je da proteinaze neprečišćenih intracelularnih ekstrakata imaju najveći afinitet prema  $\beta$ -kazeinu, dok produžena inkubacija dovodi i do degradacije  $\alpha_{S1}$  - kazeina. Svi testirani sojevi, sa izuzetkom prethodno pomenutog soja *Micrococcus* sp. ATCC 398, rastu u obranom mleku pri čemu u najvećem broju slučajeva ne izazivaju značajnije promene pH vrednosti, ali svojom ekstracelularnom proteolitičkom aktivnošću dovode do hidrolize proteina u mleku, i to pre svega  $\beta$ -kazeina. Soj *Micrococcus caseolyticus* ATCC 13548 (*Staphylococcus caseolyticus*) ima sposobnost rasta i u ultrafiltriranom mleku (5 puta koncentrovanom) u kome izaziva sličan tip proteolitičkih promena, s obzirom da preferencijalno degradira  $\beta$ - kazein. Pored kazeinskih frakcija, neki od testiranih sojeva hidrolizuju i  $\beta$ -laktoglobulin, jedan od proteina surutke (seruma).

## 1. 5. Ekstracelularne proteinaze laktobacila

Rod *Lactobacillus* predstavlja veliku i raznorodnu grupu bakterija sa nizom predstavnika koji imaju industrijski značaj, pre svega u proizvodnji sireva i fermentisanih mlečnih proizvoda. Za primenu laktobacila u ovim tehnološkim procesima od primarnog je značaja njihova sposobnost rasta u mleku. Laktobacili su kao i druge bakterije mlečne kise-

line, prirodni auksotrofi za veliki broj aminokiselina. Da bi postigli zadovoljavajuću brzinu rasta i formiranje mlečne kiseline industrijski sojevi moraju da imaju efikasan proteolitički sistem koji im omogućava iskorišćavanje proteina iz medijuma za rast.

Proteolitički sistem je na biohemijском i genetičkom nivou mnogo bolje izučen kod laktokoka (Kok and Venema, 1988). Ovaj sistem obuhvata ekstracelularne proteinaze, peptidaze i transportni sistem čijim se posredstvom produkti degradacije proteina mleka (kazeina) unose u ćeliju. Za laktokokalne proteinaze je karakteristična velika molekulska masa (200 kDa), koja je rezultat produženog C-terminusa preko kojeg su ovi enzimi vezani za ćelijski omotač (Laan and Konings, 1989). Laktokokalne proteinaze spadaju u subtilizinsku grupu serinske klase, a njihovi do sada klonirani i sekvencirani proteinazni regioni pokazuju veoma visok stepen međusobne homologije od preko 90% na nivou nukleotidne sekvence (Vos et al., 1989; Kiwaki et al., 1989). Za prelazak proteinaze iz pre-pro-forme u aktivnu formu neophodno je prisustvo membranskog lipoproteina koji je produkt gena lociranog neposredno uz proteinazni gen (Haandrikman et al., 1991). Ukoliko se bakterija nađe u medijumu bez  $Ca^{++}$  jona, enzim se autodigestijom odvaja sa površine ćelije.

O ekstracelularnim proteinazama laktobacila je do sada u literaturi bilo znatno manje podataka, posebno na genetičkom nivou. Kod većeg broja sojeva laktobacila su detektovane i biohemijски okarakterisane proteinaze koje su čvršće ili slabije vezane za ćelijski zid.

Soj *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCDO 1489 sintetiše proteinazu koja je vezana za ćelijski zid i čiji se aktivan ekstrakt može dobiti pranjem ćelija u fiziološkom rastvoru. Ovaj enzim najeeffikasnije hidrolizuje  $\beta$ -kazein, dok je afinitet prema  $\alpha_{S1}$ - i totalnom kazeinu nešto niži; u odnosu na druge proteinske supstrate, kao što su proteini seruma mleka, nije primećen značajniji nivo aktivnosti (Chandan et al., 1982). Enzimi sličnih osobina su izolovani i iz drugih sojeva *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, kao i iz *L. lactis* i *L. helveticus* (Ezzat et al., 1985). Proteinaze iz *L. helveticus* CNRZ 244 je testirana u odnosu na afinitet prema supstratu i utvrđeno je da hidrolizuje  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ -kazein. Proteinaze serinske klase su detektovane kod sojeva *L. acidophilus* i *L. plantarum* (El Soda et al., 1986; Kok and Venema, 1988) pri čemu su aktivni proteinazni ekstrakti dobijeni pranjem ćelija u puferu bez kalcijuma. Soj *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397 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). Ovaj 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. Molekulska masa ove proteinaze iznosi 170 kDa, dok njena pripadnost određenoj klasi nije definitivno potvrđena. Specifični inhibitori metaloproteinaza 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).

Soj *L. helveticus* CP 790 sintetiše proteinazu koja pripada serinskoj klasi i čija je molekulska masa 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, proteinaza soja CP790 hidrolizuje  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ -kazein, ali ne i  $\kappa$ -kazein. (Yamamoto et al., 1993). Neaktivna forma enzima ima molekulsku masu od 46 kDa (dodatnih sedam aminokiselina na N-terminusu), i

prisutna je u ćelijskom zidu u svim fazama ćelijskog rasta, dok je prisustvo aktivne forme od 45 kDa detektovano uglavnom u sredini faze eksponencijalnog rasta (Yamamoto et al. , 1995).

Nekoliko sojeva vrste *L. paracasei* subsp. *paracasei* proizvodi proteinaze serinske klase koje imaju identičnu organizaciju proteinaznog regiona kao laktokoke. Za razliku od laktokoka, kod kojih su proteinazni regioni skoro isključivo locirani na plazmidima, kod ovih sojeva laktobacila se proteinazni regioni po svemu sudeći nalaze na hromozomu. Soj *L. paracasei* subsp. *paracasei* HN 14 sintetiše proteinazu sličnu laktokokalnim proteinazama PI tipa, koja preferencijalno hidrolizuje  $\beta$  - kazein, dok restrikciona mapa proteinaznog regiona ovog soja ukazuje na organizaciju identičnu sa laktokokalnim proteinaznim regionima (Kojić et al. , 1991). Soj *L. paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151 ima proteinazni region koji je lociran na hromozomu i koji je kloniran i sekvenciran, i na nivou nukleotidne sekvence on takođe pokazuje visok nivo homologije sa laktokokama (Holck and Hes, 1992).

Proteinaza prethodno pomenutog soja *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCDO 1489 je takođe kodirana od strane hromozomalno lociranog gena koji je kloniran i sekvenciran (Gilbert et al. , 1996). Na osnovu analize sekvence ovaj enzim bi trebalo da ima molekulska masu od 212 kDa, pri čemu se najverovatnije sintetiše u pre-pro formi. Nivo homologije sa laktokokalnim proteinazama je znatno manji i primećen je samo na N-terminusu i u regionu aktivnog centra. Prisustvo cisteina u blizini histidinskog ostatka koji čini katalitičku trijadu ukazuje na pripadnost ovog enzima cisteinskoj potklasi subtilizinskih proteinaza.

## 1. 6. Cilj istraživanja

Prema podacima navedenim u literaturi bakterije iz rodova *Staphylococcus* i *Micrococcus* predstavljaju normalnu mikrofloru mleka i mlečnih proizvoda, a svojom proteolitičkom i lipolitičkom aktivnošću doprinose procesu zrenja sireva. Ovaj proces je inače uspešno ubrzavan tokom eksperimentalne proizvodnje sireva dodavanjem komercijalnih preparata proteinaza i lipaza mikrobijalnog porekla (Sood and Kosikowski, 1979; Kumar, 1979). Soj *Staphylococcus* sp. M104 sintetiše ekstracelularnu proteinazu koja dovodi do koagulacije mleka pri čemu se dobija gruš himozinskog tipa uz izdvajanje bistrog seruma. Pored toga, ovaj soj je korišćen kao komponenta starter kulture za proizvodnju belog sira, i tom prilikom, i pored visoke proteolitičke aktivnosti ovog soja, ni u jednom slučaju nije došlo do oslobađanja peptida koji dovode do pojave gorkog ukusa. Uzimajući u obzir te rezultate, prvi cilj ovog rada je bio dobijanje kolekcije prirodnih izolata stafilokoka sa različitih lokacija i iz različitih izvora, kao i identifikacija proteolitički aktivnih sojeva u okviru dobijene kolekcije. Sledeći cilj predstavlja biohemijsku karakterizaciju ekstracelularnih proteinaza koje ovi sojevi sintetišu, odnosno utvrđivanje njihove specifičnosti prema različitim proteinskim supstratima, određivanje optimalnih vrednosti pH i temperature za njihovu aktivnost, zatim ispitivanje uticaja jona i specifičnih inhibitora na aktivnost proteinaza kao i utvrđivanje njihove molekulske mase. Pored toga, s obzirom na prethodne rezultate dobijene sa sojem M104, jedan od ciljeva rada je bilo i ispitivanje sposobnosti koagulacije mleka u odnosu na ukupnu proteolitičku aktivnost dobijenih izolata. Ovaj deo istraživanja je zasnovan na činjenici da veliki broj mikroorganizama sintetiše ekstracelularne proteinaze koje su eksperimentalno i komercijalno korišćene za koagulaciju mleka u procesu proizvodnje sire-

va. Najbolji rezultati su postignuti sa proteinazama iz plesni, kao što su *Mucor miehei* (Martens, 1973), *Mucor pusillus* (Trop and Pinsky, 1971) i *Cryphonectria parasitica*, ranije *Endothia parasitica* (Carini et al, 1973), koje se komercijalno koriste kao preparati sirila mikrobijalnog porekla. Nešto slabiji rezultati su postignuti u eksperimentalnoj proizvodnji sireva sa proteinazama koje sintetišu plesni *Byssoschlamys fulva* (Jedrychowski et al., 1975) i *Aspergillus ochraceus* (Foda et al., 1976). Pored enzima poreklom iz plesni, u sličnim eksperimentima su korišćene proteinaze koje sintetišu bakterije iz roda *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. mesenteroides*, *B. brevis*, *B. polymyxa*) ali su i tom prilikom u većini slučajeva dobijani sirevi slabijeg kvaliteta, kao rezultat veoma visoke i nedovoljno specifične proteolitičke aktivnosti korišćenih enzima (Kikuchi and Toyoda, 1969; Mašek et al., 1970). S obzirom na navedene rezultate, proteolitički aktivni prirodni izolati stafilocoka su preliminarno testirani na sposobnost koagulacije mleka paralelno sa komercijalnim preparatom himozina. Pošto je himozin visoko specifična proteinaza koja preferencijalno hidrolizuje  $\kappa$ -kazein dovodeći do koagulacije mleka, u ovom radu je ispitivano i delovanje proteinaza stafilocoka na glavne kazeinske frakcije tokom procesa koagulacije, u cilju preliminarnog identifikovanja sojeva koji bi mogli da se koriste kao proizvođači sirila mikrobijalnog porekla.

Laktobacili su, kao što je navedeno, grupa mikroorganizama od izuzetnog značaja za proizvodnju fermentisanih prehrambenih proizvoda. Dosadašnja istraživanja na njima su međutim bila ograničena na manji broj sojeva koji se već niz godina nalaze u industrijskoj upotrebi. U skladu s tim, od velikog značaja bi bila analiza proteolitičkog sistema prirodnih izolata laktobacila koji potiču iz uzoraka fermentisanih prehrambenih proizvoda iz domaće radinosti i sa ograničenih i relativno izolovanih područja. Jedan deo ovog rada obuhvata testiranje kolekcije prirodnih izolata mezofilnih laktobacila na sposobnost sinteze ekstracelularnih proteinaza, utvrđivanje supstratne specifičnosti proteinaza i ostvarivanje preliminarnog uvida u organizaciju njihovih proteinaznih gena. Očekivani rezultat istraživanja bi bila identifikacija sojeva koji sintetišu proteinaze koje se od do sada izučenih razlikuju u odnosu na specifičnost prema kazeinskim frakcijama, utvrđivanje pripadnosti proteinaza određenim klasama i pokušaj određivanja plazmidne odnosno hromozomalne lokacije njihovih proteinaznih gena.

## 2. MATERIJAL I METODE

### 2. 1. Bakterijski sojevi

Sojevi bakterija korišćeni u ovom radu su navedeni u Tabeli 1.

Tabela 1.

Izolatz		Izvor	
Staphylococcus sp.			
1)F 22	prirodni izolat	sirovo mleko	ovaj rad
2)F 30	"	"	"
3)F 31	"	"	"
4)F 48	"	UHT mleko	"
5)F 57	"	"	"
6)F 72	"	sirovo mleko	"
7)F 86	"	UHT mleko	"
8)F 96	"	sirovo mleko	"
9)F 104	"	"	"
10)F 111	"	"	"
11)F 120	"	UHT mleko	"
12)F 121	"	"	"
13)F 124	"	"	"
14) S 44	"	silaza	"
15) S 49	"	"	"
16) S 172	"	"	"
17) S 182	"	"	"
18) S 1013	"	"	"
19) S 1014	"	"	"
20) S 1018	"	"	"
21) S 2005	"	"	"
22) S 2007	"	"	"
23) S 2102	"	"	"
24) S 2103	"	"	"
25) S 2105	"	"	"
26) S 2107	"	"	"
27)M104	Poljoprivredni fakultet Beograd		

<i>Staphylococcus aureus</i>	
Soj	Izvor
Z 2	prirodni izolat, sirovo mleko, ovaj rad
<i>Micrococcus</i> sp.	
Soj	Izvor
R 3	prirodni izolat, sirovo mleko, ovaj rad
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
Soj	Izvor
MG 1363	Gasson (1983)
NCDO712	
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	
Soj	Izvor
HN14	prirodni izolat, Kojic et al. 1991
BGLI17	prirodni izolat, sir
BGLI18	prirodni izolat, sir
<i>Lactobacillus divergens</i>	
Soj	Izvor
BG742	prirodni izolat starter za proizvodnju
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
Soj	Izvor
BGEN1	prirodni izolat, sir

## 2. 2. Podloge za rast bakterija

Za izolovanje stafilokoka iz uzoraka mleka i drugog materijala korišćena je podloga za određivanje ukupnog broja bakterija (Torlak) koja sadrži tripton (5 g), kvašćev ekstrakt (2,5 g), dekstrozu (1 g) i agar (15 g) na 1000 ml destilovane vode.

Za rast i održavanje kultura stafilokoka korišćeni su hranljivi bujon (Torlak) i kvašćev dekstrozni bujon. Hranljivi bujon (Torlak) sadrži pepton-1 (15 g), mesni ekstrakt (3g), NaCl (5 g) i  $K_2HPO_4$  (0,3 g) na 1000 ml destilovane vode. Za dobijanje čvrste podloge dodaje se agar (18 g na 1000 ml). Kvašćev dekstrozni bujon predstavlja hranljivi bujon (Torlak) sa dodatkom dekstroze (5 g) i kvašćevog ekstrakta (3 g) na 1000 ml podloge. Kvašćev dekstrozni agar se dobija dodavanjem agara (18 g na 1000 ml).

Za rast i održavanje kultura laktobacila korišćen je MRS medijum (de Man et al. , 1960) koji sadrži mesni ekstrakt (5 g), kvašćev ekstrakt (5 g), proteoza pepton (10 g),  $K_2HPO_4$  (2 g), amonijum citrat (2 g), natrijum acetat (5 g),  $MgSO_4$  (0,1 g),  $MnSO_4$  (0,05 g), glukozu (20 g) i Tween 80™ (1 ml) na 1000 ml destilovane vode. Pre sterilizacije pH vrednost se podešava na 6,5. Za dobijanje čvrste podloge dodaje se agar (20 g na 1000 ml).

Za utvrđivanje rasta u prisustvu različitih koncentracija soli korišćen je hranljivi bujon (Torlak) sa dodatkom NaCl u finalnim koncentracijama od 5, 7,5 i 15%.

Za ispitivanje hemolitičnosti izolata korišćen je krvni agar koji se dobija dodavanjem defibrinisane ovčije krvi u hranljivi agar u finalnoj koncentraciji od 7%. Krv se sterilno dodaje neposredno pre razlivanja u otopljeni hranljivi agar prethodno ohlađen na 55°C.



Za utvrđivanje sposobnosti aerobnog ili anaerobnog rasta korišćen je bromkrezol purpur duboki agar koji sadrži pepton (10 g), glukozu (10 g), kvašćev ekstrakt (5 g), NaCl (5 g), bromkrezol purpur (0,04 g) i agar (5 g) na 1000 ml destilovane vode. Pre sterilizacije, pH se podešava na 7,2, podloga se rastvara postepenim zagrevanjem i razliva u epruvete.

FTO agar (podloga sa furazolidonom) sadrži pepton (10 g), kvašćev ekstrakt (5 g), NaCl (5 g), glukozu (1 g) i agar (12 g) na 1000 ml destilovane vode, pri čemu se pH vrednost podloge podešava na 7,0. Posle sterilizacije podloga se ohladi na 48°C, a zatim se na 1000 ml podloge dodaje 100 ml 0,02% rastvora furazolidona u acetonu. (von Rheinbaben and Hadlock, 1981 ).

Za test sposobnosti koagulacije mleka korišćeno je sterilizovano obrano mleko, kao i mleko sa dodatkom kvašćevog ekstrakta (0,3%) i dekstroze (0,5%).

Za analizu proteolitičke aktivnosti korišćen je mlečno - citratni agar (MCA) koji sadrži obrano mleko u prahu (44 g), Na-citrat x 2H<sub>2</sub>O (86 g), kvašćev ekstrakt (2 g) i agar (18 g) na 1000 ml destilovane vode.

Za identifikaciju proteolitički aktivnih sojeva korišćen je i kazeinski agar koji sadrži 12 g totalnog kazeina i 20 g agara na 1000 ml podloge. Obe komponente se prethodno rastvaraju u po 500 ml 100 mM Tris pH 7,8 a zatim se pomešaju neposredno pred razlivanje u petri šolje.

## 2. 3. Izolovanje i determinacija prirodnih izolata stafilokoka

Prirodni izolati stafilokoka su izolovani iz uzoraka sirovog, pasterizovanog i sterilizovanog mleka, stočne hrane i silaže. Razblaženja uzoraka su pravljena u fiziološkom rastvoru (sirovo mleko - 10<sup>-4</sup>, pasterizovano mleko - 10<sup>-2</sup>, sterilizovano mleko - nerazblaženo, stočna hrana i silaža - 10<sup>-3</sup>), a zatim je po 1ml odgovarajućeg razblaženja zasejavan na podlogu za određivanje ukupnog broja bakterija. Posle inkubacije od 48 sati na 30°C, pojedinačne kolonije prirodnih izolata su zasejavane na kosi hranljivi agar i inkubirane 48 sati na 30°C.

Mikroskopski preparati svih izolata su bojeni po Gram-u, a prisustvo katalaze je određivano prelivanjem svežih kultura na kosom agaru rastvorom vodonik-peroksida (10%).

Sposobnost rasta u prisustvu NaCl je određivana zasejavanjem sojeva u hranljivi bujon sa koncentracijama NaCl od 5%, 7,5% i 15%, a pojava ili odsustvo rasta su registrovani posle inkubacije od 24 sata na 30°C. Hemolitičnost izolata je testirana zasejavanjem kultura na krvni agar i praćenjem pojave hemolize posle 24 i 48 sati inkubacije na temperaturama od 30°C i 37°C.

Prisustvo koagulaze je testirano unošenjem kultura prirodnih izolata (0,1 ml pune prekončne tečne kulture ili jedna eza materijala sa čvrste podloge) u 1 ml krvne plazme. Pojava koagulacije plazme je praćena u intervalima od 2, 4, 6 i 24 sata, uz inkubaciju na 37°C.

Sposobnost aerobnog ili anaerobnog rasta prirodnih izolata utvrđivana je zasejavanjem kultura u bromkrezol purpur duboki agar. Svaka kultura je zasejavana u dve epruvete sa dubokim agarom od kojih je jedna prelivana sterilnim parafinskim uljem da bi se postigli anaerobni uslovi rasta. Bakterijski rast (promena boje podloge na površini agara i u dubini) je utvrđivan posle 24 i 48 sati inkubacije na 30°C i 37°C.

## 2. 4. Metode za izolovanje DNK

### 2. 4. 1. Mini - metoda izolovanja plazmidne DNK

Za izolovanje plazmida iz male količine bakterija korišćena je modifikovana metoda alkalne lize (Birnboim and Doly, 1979). Talog iz logaritamske kulture bakterija ( $OD_{600nm} = 0,6 - 0,8$ ) ili prekonoćne kulture pran je u TEN puferu (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM EDTA, 50 mM NaCl) i resuspendovan u 100 $\mu$ l PP pufera (0,5 M saharoza, 40mM  $NH_4$ -acetat, 10 mM Mg-acetat, pH7) sa lizostafinom (5 mg/ml) za stafilokoke, odnosno lizozimom (7 mg/ml) za laktobacile. Posle inkubacije od 15 minuta na 37°C, dodavano je 200 $\mu$ l sveže pripremljene smese 1% SDS-a u TE 1 puferu (100 mM Tris, 10mM EDTA, pH $\gg$ 12). Smesa se lagano meša do pojave lize ćelija posle čega se dodaje 100 $\mu$ l glacijalne sirćetne kiseline i 125  $\mu$ l 5M NaCl. Posle kratkog mešanja smesa se centrifugira 15 minuta na 13000 obrt /min u mikrocentrifugi (Biofuge A, Heraeus) na sobnoj temperaturi. Dobijeni supernatant je prebačen u nove mikrotube, dodato je 2,5 volumena hladnog 96% etanola (-20°C), i dobijena plazmidna DNK je taložena centrifugiranjem u trajanju od 15 minuta na 13000 obrt /min u mikrocentrifugi na sobnoj temperaturi. Talog DNK se zatim ispira hladnim 70% etanolom (1 ml), a zatim osuši i resuspenduje u 20m $\mu$ l destilovane vode. Degradacija RNK u uzorcima je vršena dodavanjem 1 $\mu$ l rastvora RNK-aze (10 mg/ml) uz inkubaciju od 15 minuta na 37°C. Ovako izolovana plazmidna DNK je analizirana elektroforezom na agaroznom gelu.

### 2. 4. 2. Izolovanje ukupne DNK

Ukupna DNK je izolovana iz prirodnih izolata stafilokoka i laktobacila po metodi koju su opisali Hopwood i saradnici (1985). Talog dobijen centrifugiranjem 3 ml bakterijske kulture u logaritamskoj fazi rasta ( $OD_{600nm} = 0,6 - 0,8$ ) je opran u 1 ml TEN pufera, a zatim resuspendovan u 0,5 ml PP pufera koji sadrži lizostafin (5 mg/ml) za stafilokoke ili lizozim (7 mg/ml) za laktobacile kao i RNK-azu (50 $\mu$ g/ml). Suspenzija ćelija se inkubira na 37°C u vodenom kupatilu u trajanju od 30 minuta ili dok ćelije ne postanu translucentne, a zatim se dodaje 250  $\mu$ l 2% rastvora SDS-a. Suspenzija se zatim intenzivno meša na vibratoru u trajanju od jednog minuta ili dok viskozitet rastvora ne postane manji. Posle toga se vrši odstranjivanje proteina višestrukom fenolnom ekstrakcijom (do potpunog gubitka interfaze), pri čemu se svaki put dodaje po 250 $\mu$ l neutralnog fenol-hloroforma, rastvor intenzivno promeša u trajanju od 30 sekundi i centrifugira 2 minuta na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi na sobnoj temperaturi. Posle fenolne ekstrakcije, sakupljenom supernatantu se dodaje 1/10 volumena 3M Na-acetata pH 4,8 i jedan volumen izopropanola, uzorci se lagano izmešaju i inkubiraju 5 minuta na sobnoj temperaturi. Ukupna DNK se zatim istaloži centrifugiranjem u trajanju od 2 minuta na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi na sobnoj temperaturi, i dobijeni talog se rastvara u 0,5 ml TE pufera (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA). Posle dodavanja 25 $\mu$ l spermin-HCl rastvor se inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugira kao u prethodnom koraku. Dobijeni talog se resuspenduje u 300  $\mu$ l rastvora koji sadrži 100  $\mu$ l 3M Na-acetata, 10  $\mu$ l 1 M  $MgCl_2$  i 890  $\mu$ l destilovane vode, a zatim se rastvoru

doda 2,5 volumena 96% etanola na sobnoj temperaturi, smesa lagano promeša i inkubira jedan sat na sobnoj temperaturi. Posle centrifugiranja od 2 minuta na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi na sobnoj temperaturi, supernatant se odstranjuje, a talog ukupne DNK se osuši i resuspenduje u 100 $\mu$ l TE pufera. Ovako izolovana DNK je stabilna i pogodna za digestiju restrikcionim enzimima.

## 2. 5. Digestija DNK restrikcionim enzimima

Ukupna DNK prirodnih izolata stafilokoka i laktobacila digerirana je restrikcionim enzimima prema uputstvu proizvođača (Gibco-BRL, DIPRO, Vienna, Austria). Za digestije je korišćen sistem od tri pufera različite jonske jačine (Maniatis et al., 1982). Puferi su pravljani u 10 puta koncentrisanim stokovima i dodavani u reakcije u sledećim koncentracijama:

L ( pufer niske jonske jačine ) : 10mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT.

S ( pufer srednje jonske jačine ) : 10mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT.

M ( pufer visoke jonske jačine ) : 50mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT.

Enzimi su dodavani u reakcione smese u koncentraciji od 1U/ $\mu$ g DNK. Posle inkubacije na optimalnoj temperaturi, reakcije su zaustavljane inkubacijom na 70°C u trajanju od 10 min.

## 2. 6. Izolacija DNK *in situ* iz laktobacila. Digestija DNK restrikcionim enzimima *in situ* u agaroznim blokovima.

Izolacija DNK *in situ* iz laktobacila je vršena iz rane logaritamske kulture (1,5 ml, OD<sub>600nm</sub> = 0,3 - 0,4). Posle centrifugiranja, talog je opran u 1 ml EET pufera (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM Tris HCl pH 8) a zatim resuspendovan u 300  $\mu$ l EET pufera. Suspenzija je zagrejana na 37°C a zatim joj je dodat isti volumen 2% agaroze (FMC, In Cert Agarose) koja je prethodno otopljena i ohlađena na 42°C. Smesa je zatim razlivena u kalupe dimenzija 10 x 4 x 2 mm koji su zatim inkubirani 20 minuta na 4°C da bi agarozna polimerisala. Imobilisane ćelije u agaroznim blokovima su lizirane u 5 ml rastvora I (EET sa 2 mg/ml lizozima, 10 U/ml mutanolizina i 0,05% sarkozila) inkubacijom od 2 sata na 30°C. Agarozni blokovi su zatim prebačeni u 5 ml rastvora II (EET sa 0,5% SDS-a i 1mg/ml proteinaze K) i u njemu inkubirani preko noći na 50°C. Inaktivacija proteinaze K vršena je tretiranjem agaroznih blokova PMSF-om 2 x 30 minuta u po 50 ml rastvora (0,01 mM PMSF u TE puferu). Oslobođanje od PMSF-a vršeno je dijalizom agaroznih blokova u TE puferu (2 x 30 minuta u 50 ml). Agarozni blokovi su do upotrebe čuvani na 4°C u TE puferu.

Za digestije DNK *in situ* u agaroznim blokovima korišćena je jedna četvrtina bloka koji je prethodno ekvilibriran u 500  $\mu$ l pufera za odgovarajući restrikcioni enzim. Posle inkubacije od 30 minuta na 4°C, pufer je odstranjen, dodato je 60  $\mu$ l svežeg pufera i uzorci su preinkubirani 10 minuta na temperaturi optimalnoj za restrikcioni enzim. Posle preinkubacije u smesu se dodaje enzim (20 U po uzorku) i inkubacija produžava još 2 sata. Po završenoj digestiji, pufer sa enzimom se odstranjuje a reakcija se zaustavlja dodavanjem stop pufera (40 % saharoza, 100 mM EDTA, 0,002% bromfenol plavo). Uzorci se posle toga koriste za PFGE ili čuvaju na 4°C.

## 2. 7. Horizontalna elektroforeza DNK

Elektroforeza DNK je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su dobijeni otapanjem agaroze u TBE puferu (89 mM TRIS, 89 mM borna kiselina, 2mM EDTA, finalni pH 8,3) sa dodatkom etidijum bromida (0,5 mg/ml). Isti pufer je korišćen kao elektrolit za elektroforezu, a u zavisnosti od veličine fragmenata DNK koji su razdvajani, koncentracija agaroze u gelovima je iznosila 0,7 ili 1%. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 5-10 V/cm gela.

Veličine linearnih DNK fragmenata dobijenih posle digestije restrikcionim enzimima utvrđivane su poređenjem njihove migracije na agaroznom gelu sa dužinom puta koju su prešli fragmenti DNK poznate veličine (standard). Kao standard je korišćena  $\lambda$ DNK digerirana restrikcionim enzimima *Hind* III i *Eco*RI pri čemu su dobijani fragmenti DNK dužine 21400, 5370, 5170, 4310, 3530, 2020, 1940, 1610, 1360, 940, 860, 564 i 150 baznih parova.

Za određivanje veličine cirkularnih molekula DNK korišćeni su cirkularni plazmidi poznate veličine iz soja *E. coli* V517 (Macrina et al. , 1978).

## 2. 8. Elektroforeza DNK u pulsirajućem polju (PFGE)

Elektroforeza totalne DNK izolovane *in situ* u agaroznim blokovima vršena je na aparaturi za PFGE (LKB-BROMA, Pulsaphor PLUS Control Unit - kontroler pulsa, 2015 Pulsaphor Electrophoresis Unit - kadice. ) Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u 0,5 x TBE, a u zavisnosti od veličine fragmenata DNK koji su razdvajani korišćeni su gelovi sa 1, 1,2 i 1,4% agaroze. Elektroforeza je tekla na 9°C pod sledećim uslovima: nesečena DNK - 170 V, puls N/S 21-30s, puls E/W 21-30s, 48h; sečena DNK - 300 V, puls N/S 8-19s, puls E/W 8 - 19s, 15 h. U oba slučaja korišćen je heksagonalni položaj elektroda.

Detekcija DNK u gelu vršena je bojenjem gelova u 0,5 x TBE sa 1mg/ml etidijum bromida, 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, dok je odbojavanje gelova vršeno 1 sat u 0,5 x TBE pod istim uslovima. Kao standard za određivanje veličine fragmenata korišćeni su konkatemeri  $\lambda$ DNK veličine 48,5, 97, 145,5, 194, 242,5, 291, 339,5, 388, 436,5, 485, 533,5 i 582 kB.

## 2. 9. Obeležavanje DNK metodom "Nick translacije"

"Nick translacija" je postupak pri kome se DNK blago tretira DNKazom što dovodi do formiranja jednolančanih prekida. Egzonukleazna aktivnost DNK polimeraze I zatim proširuje ove prekide, a sa druge strane ih popunjava svojom polimeraznom aktivnošću. Ukoliko se u reakciju polimerizacije pored neobebeženih dodaju i dezoksiribonukleotidi obeleženi biotinom, prilikom sinteze komplementarnog lanca DNK polimeraza će i njih ugrađivati u novosintetisani lanac DNK, što rezultira dobijanjem DNK fragmenata obeleženih biotinom. Za obeležavanje DNK biotinom korišćen je "Bio Nick Labeling system" (Gibco BRL). Reakcija obeležavanja vršena je po uputstvu proizvođača u trajanju od jednog sata na 16°C. U cilju uklanjanja neugrađenih obeleženih nukleotida, DNK je dva puta precipitirana etanolom. Pre hibridizacije proba je denaturisana inkubacijom na 100°C u trajanju od 10 minuta.

## 2. 10. "Southern" hibridizacija

### 2. 10. 1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane

Po završenoj elektroforezi, DNK je prenošena na najlonske membrane po metodi Southern-a (1975), postupkom opisanim kod Herrman-a (1986). Da bi se omogućio prenos većih fragmenata DNK, po završenoj elektroforezi agarozni gelovi su tretirani sa 20 volumena 0,25 M HCl tokom 15 minuta, što dovodi do depurinizacije DNK. Gel je zatim ispiran u destilovanoj vodi, a denaturacija DNK je vršena potapanjem gela u rastvor koji sadrži 0,5 M NaOH i 1,5 M NaCl (denaturacioni rastvor). Posle dva tretmana od 20 minuta u denaturacionom rastvoru neutralizacija je vršena u neutralizacionom puferu (1,5 M NaCl, 1 M TRIS pH 7,5), takođe sa dva tretmana od po 20 minuta. Najlonska membrana na koju se prenosi DNK (Photo Gene™) je nakratko potopljena u destilovanu vodu, a zatim tretirana 15 minuta 10xSSC puferom (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat). Dve trake ranije pripremljenog Whatman 3MM filter papira, većih dimenzija od gela, se zatim potapaju u 10xSSC pufer i slože jedan na drugi. Na njih se postavlja tretirani gel sa bunarima okrenutim na dole, a oko gela se postavljaju najlonski graničnici. Na gel se zatim polaže najlonska membrana, a preko nje još tri 3MM filter papira veličine membrane, prethodno navlaženih SSC puferom. Pošto se odstrane mehurići vazduha zaostali između filter papira i membrane, na njih se postavlja 10 cm deo sloj upijajućeg papira, koji se ravnomerno optereti tegom od 1 kg. Transfer DNK na membranu je vršen preko noći na sobnoj temperaturi.

Posle završenog prenosa najlonska membrana je skinuta i oprana u 5 x SSC puferu u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim osušena na sobnoj temperaturi polaganjem na filter papir (30 minuta), sa DNK stranom okrenutom na gore. Prema uputstvu proizvođača, membrana je zatim spakovana između dva lista 3MM papira i pečena dva sata na 80°C. Ovako pripremljene membrane upotrebljavaju se za hibridizaciju. One se takođe mogu čuvati na sobnoj temperaturi, a pored toga, mogu se rehibridizovati do 5 puta.

### 2. 10. 2. Hibridizacija

DNK koja je prenetna na najlonsku membranu sa agaroznih gelova hibridizovana je sa DNK-probama obeleženim biotinom. Postupak hibridizacije obuhvata tri faze: prehibridizacija i denaturisanje probe, hibridizacija i pranje.

Prehibridizacija je rađena na 65°C ili 45°C (1-2 sata) u prehibridizacionom puferu (5 x SSC, 0,1% sarkozil, 0,02% SDS i 1% bloking reagens - totalni kazein). Posle odbacivanja prehibridizacionog pufera, hibridizacija je vršena u istom puferu uz dodatak probe denaturisane kuvanjem (10 minuta na 100°C). Hibridizacija je vršena na temperaturi od 65°C ili 45°C u trajanju od 16 sati.

Po završenoj hibridizaciji, hibridizacioni pufer je odbacivan, a membrane su sukcesivno prane dva puta po 5 minuta u 5 x SSC sa 0,5% SDS (na 65°C ili 45°C), zatim 30 minuta u 0,1 x SSC sa 1% SDS (na 65°C ili 45°C) i na kraju u 2 x SSC na sobnoj temperaturi (5 minuta).

Za detekciju hibrida korišćen je Gibco BRL "Photo Gene™ Nucleic Acid Detection System." Proces detekcije uključuje dva koraka: 1) vezivanje konjugata streptavidin - alkalne fosfataze (SA-AP) za biotinske grupe sadržane u probi vezanoj za DNK; 2) inkubiranje membrane sa supstratom alkalne fosfataze i njegovu defosforilaciju uz luminiscenciju koja se detektuje eksponiranjem "x - ray" filma. Detekcija hibrida je vršena prema uputstvu proizvođača (Gibco BRL).

## 2. 11. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti

### 2. 11. 1. Test koagulacije mleka

Prirodni izolati stafilokoka koji koaguliraju mleko proteolitičkim delovanjem na kazein identifikovani su zasejavanjem punih prekonocnih kultura (u hranljivom ili kvašćevom dekstroznom bujonu) u uzorke sterilizovanog mleka. Korišćen je inokulum od 10%, a kulture su zasejavane u obrano sterilizovano mleko, kao i u mleko sa dodatkom dekstroze (0,5%) i kvašćevog ekstrakta. Proteolitičke promene u mleku su registrovane posle 24, 48 i 72 sata, a uzorci su inkubirani na 30°C. Kontrolni uzorci koagulirani himozinom dobijeni su dodavanjem komercijalnog telećeg sirila ("Dairyland") u mleko u odnosu 1:5000. Početne vrednosti pH u mleku su se kretale od 6,55 do 6,62.

### 2. 11. 2. Određivanje koncentracije neproteinskog azota po Kjeldahl-u

Koncentracija neproteinskog azota je određivana u uzorcima mleka koaguliranog kulturama stafilokoka i telećim sirilom, kao i u netretiranom mleku. Pod koncentracijom neproteinskog azota se podrazumeva koncentracija onih komponenata u uzorku koje sadrže azot a koje su rastvorljive u 12% trihlorsirćetnoj kiselini. Ove vrednosti predstavljaju pokazatelj generalne proteolitičke aktivnosti testiranih sojeva i odgovaraju stepenu hidrolize proteina mleka (pre svega kazeinskih frakcija) pod delovanjem stafilokoknih proteinaza. Koncentracija neproteinskog azota je određivana makro-metodom po Kjeldahl-u (Horwitz, 1980). Posle koagulacije, uzorci mleka su precipitirani trihlorsirćetnom kiselinom (12%), a za analizu je korišćeno po 20 ml dobijenog supernatanta. Pored uzorka, digestiona smesa je sadržavala 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 0,45 g CuSO<sub>4</sub>. Dobijene vrednosti koncentracija neproteinskog azota izražene su u procentima.

### 2. 11. 3. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti celih ćelija prirodnih izolata

Analiza proteolitičke aktivnosti celih ćelija stafilokoka i laktobacila u odnosu na proteinske supstrate je vršena modifikovanom metodom koju su razvili Hill i Gasson (1986). Sojevi su zasejavani na petri šolje sa mlečno-citratnim agarom (MCA) tako da se na površini podloge dobije ravnomeran bakterijski film. Posle inkubacije od 48 sati na 30°C ćelije su sakupljane ezom i prenošene u mikrotube, a zatim resuspendovane u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 7,2 pri čemu je za stafilokoke na 1 mg ćelija dodavano 15 µl pufera, a za laktobacile 10 µl pufera na 1 mg ćelija. Kao supstrati u digestijama korišćeni su α<sub>S1</sub>-, β - i κ-

kazein, denaturisani hemoglobin, BSA i želatin. Svi proteinski supstrati su bili rastvoreni u istom puferu u koncentraciji od 5 mg/ml. Digestija supstrata je vršena na 30°C, pri čemu su suspenzija ćelija i rastvor supstrata mešani u odnosu 1:1. Po isteku predviđenog vremena ćelije su odstranjivane centrifugiranjem 5 minuta na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi na sobnoj temperaturi. Supernatantu je zatim dodavan isti volumen 2 x koncentrovanog pufera za uzorak (125 mM Tris pH 6, 8, 10 mM EDTA, 4% SDS, 25% glicerol, 5% β-merkaptoetanol i 0,07 % bromfenol plavo). Uzorci su inkubirani 3 minuta na 100°C i analizirani na SDS-polikrilamidnoj gel elektroforezi.

Prilikom ispitivanja uticaja pH vrednosti na proteolitičku aktivnost, suspenzije ćelija su pravljene u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 5,4, 5,7, 6,5 i 7,2 kao i u 0,1 M Tris-HCl puferu pH 8 i 8,7. Rastvori supstrata za digestije (β-kazein) su pravljene u istim puferima, u koncentraciji od 5 mg/ml. U digestionim smesama, suspenzije ćelija (1 mg ćelija na 10 μl pufera) su pomešane sa rastvorima supstrata odgovarajućih pH vrednosti u zapreminskom odnosu 1:3 za stafilokoke, odnosno 1:1 za laktobacile. Digestije supstrata su vršene na 30°C, a po završenoj digestiji uzorci su centrifugirani 5 minuta na 13000 obrt /min u mikrocentrifugi na sobnoj temperaturi. Proteini u dobijenom supernatantu su zatim precipitirani dodavanjem 1/2 volumena 50% trihlorsirćetne kiseline pri čemu je precipitacija vršena 30 minuta na ledu (0°C). Istaloženi proteini su odstranjivani centrifugiranjem 10 minuta na 1300 obrt. /min. u mikrocentrifugi 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 proteolitičke aktivnosti uzeta je količina enzima koja u reakciji oslobodi 1 μg 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 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,2 a digestije supstrata vršene na 25, 30, 37, 42, 50 i 60°C.

U eksperimentima u kojima je utvrđivan uticaj inhibitora na proteinaze stafilokoka i laktobacila, fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) je u reakcionu smesu dodavan u finalnoj koncentraciji od 10 mg/ml.

#### 2. 11. 4. Dobijanje aktivnog proteinaznog ekstrakta

Aktivan proteinazni ekstrakt je dobijen ispiranjem ćelija koje su rasle na mlečno-citratnom agaru, ili taloženjem NH<sub>4</sub>-sulfatom iz supernatanta tečnih kultura.

Ćelije sa mlečno-citratnog agara su sakupljane ezom u Eppendorf epruvetu (100 do 200 mg) i resuspendovane u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 7,2 ili u Tris-Ca<sup>++</sup> puferu (50 mM Tris, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2) u odnosu 1 μl pufera na 1 mg ćelija. Suspenzija ćelija je inkubirana 30 minuta na 30°C a zatim centrifugirana 5 minuta na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi 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.

Za dobijanje proteinaznog ekstrakta iz supernatanta tečnih kultura korišćene su pune prekonoćne kulture prirodnih izolata u kvašćevom dekstroznom bujonu. Posle obaranja ćeli-

ja centrifugiranjem, proteini u supernatantu su taloženi dodavanjem  $\text{NH}_4$ -sulfata do zasićenja od 50% (31 g na 100 ml). Posle taloženja na  $0^\circ\text{C}$  (2 sata) uzorci su centrifugirani 20 minuta na 10000 g. Dobijeni talog proteina je zatim resuspendovan u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 7,2 u zapremini 40 puta manjoj od početne zapremine supernatanta bakterijske kulture. Koncentrovan proteinazni ekstrakt je dijaliziran u istom puferu, u zapreminskom odnosu 1:500. Dijaliza je vršena 24 sata na  $4^\circ\text{C}$ , uz dve promene pufera. Dijaliziran proteinazni ekstrakt je zatim korišćen za ispitivanje uticaja jona i inhibitora na aktivnost stafilokoknih proteinaza.

## 2. 11. 5. 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 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 7,2 ili u 50mM Tris, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,2) i inkubirani na  $30^\circ\text{C}$ . Zapreminski odnosi enzimskog ekstrakta i rastvora supstrata su određivani u odnosu na proteolitičku aktivnost testiranih izolata. 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  $100^\circ\text{C}$ , uzorci su analizirani na SDS - poliakrilamidnoj gel elektroforezi.

Za ispitivanje uticaja jona i inhibitora na aktivnost stafilokoknih proteinaza korišćeni su dijalizirani proteinazni ekstrakti.  $\text{CaCl}_2$ , NaCl, KCl,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ , EGTA i EDTA su u reakcionim smesama bili prisutni u 10mM finalnoj koncentraciji, dok je PMSF (fenilmetil-sulfonil fluorid) dodavan u finalnoj koncentraciji od 10 mg/ml. Ostali inhibitori su dodavani u sledećim koncentracijama: pepstatin-0,2 mM, 3,4 dihaloroizokumarin - 0,1 mM, jodoacetat -10 mM i 1-10 fenantrolin - 0,5 mM. Dijalizirani ekstrakti su pre digestije bili inkubirani 10 minuta na  $30^\circ\text{C}$  sa odgovarajućim solima i inhibitorima, a zatim pomešani sa rastvorom supstrata ( $\beta$ -kazein, 5 mg/ml) u zapreminskom odnosu 1:1 i inkubirani narednih 30 minuta na  $30^\circ\text{C}$ . Po završenoj inkubaciji, digestija supstrata je zaustavljena dodavanjem 1/2 volumena 50% trihlorsirćetne kiseline. Posle taloženja od 30 minuta na  $0^\circ\text{C}$ , uzorci su centrifugirani 10 minuta u mikrocentrifugi na 13000 obrt/min na  $4^\circ\text{C}$ , a u dobijenim supernatantima koncentracije TCA- solubilnih produkata hidrolize određivane su Lowry-jevom metodom (1951). Određivanje proteolitičke aktivnosti je izvršeno na isti način kao u eksperimentu sa celim ćelijama, pri čemu je za 100% proteolitičke aktivnosti uzimana aktivnost dijaliziranih proteinaznih ekstrakata bez prisustva jona i inhibitora.

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

Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) 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 diskontinuirani 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, 0,125 M 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 0,375 M 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 minuta pre elektroforeze. U sastav pufera za elektroforezu ulaze 0,025 M Tris baza, 0,192 M 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 plavo) dođe do 0,5cm 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 ugaj koji za sebe vezuje Coomassie brilliant blue R250. Po završenom odbojvanju u gelovi su čuvani u rastvoru sirćetne kiseline (8%).

Za analizu ukupnih proteina mleka korišćena je modifikovana metoda SDS-poliakrilamidne gel elektroforeze (Verdi et al. , 1987). U ovom slučaju pufer za uzorke sadrži 10mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 20% glicerol, 0,02% bromfenol plavo i 50mM ditiotreitol koji se u pufer dodaje neposredno pre upotrebe. Uzorci koaguliranog mleka su rastvarani u ovom puferu u zapreminskom odnosu 1:10 i zagrevani 3 minuta na 100°C. Za razdvajanje proteina u uzorcima korišćen je gel sa linearnim gradijentom koncentracije od 10% akrilamida i 0,27% bisakrilamida do 20% akrilamida i 0,53% bisakrilamida. Za pravljenje gelova za razdvajanje korišćen je gradijent former (BioRad, Model 230). Po završenoj elektroforezi, bojenju i odbojvanju, skaniranje gelova je vršeno na denzitometru (BioRad, Model 620) povezanom sa integratorom. Kao standardi za određivanje molekulskih masa korišćeni su "Rainbow™" proteinski markeri (Amersham) sledećih molekulskih masa: ovalbumin (46 kDa), karbonat anhidraza (30 kDa), tripsin inhibitor (21,5 kDa), lizozim (14,3 kDa), apro-tinin (6,5 kDa), insulin (B), (3,4 kDa) i insulin (A) (2,35 kDa). Pored toga, korišćen je i proteinski standard MW-SDS-70L (Sigma) koji sadrži BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (subjedinica, 36 kDa), karbonat anhidraza (29 kDa), tripsinogen (24 kDa), tripsin inhibitor (20,1 kDa) i  $\alpha$ -laktalbumin (14,2 kDa).

## 2. 13. Elektroforeza na nedenaturišućem SDS-polikrilamidnom gelu

SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza u nedenaturišućim uslovima korišćena je za određivanje molekulskih masa proteinaza u enzimskim ekstraktima. Elektroforeza je rađena prema modifikovanoj metodi koju su razvili Mac Farlane i Mac Farlane (1992). Proteinazni ekstrakti, pripremljeni na opisan način, pomešani su u zapreminskom odnosu 1:1 sa puferom za uzorak, koji sadrži 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 25% glicerol, 1% SDS i 0,07% bromfenol plavo. Posle inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, uzorci su nanošeni na SDS-poliakrilamidni gel (15% akrilamida, 0,5% bisakrilamida). U ovaj gel je neposredno pre polimerizacije dodavan totalni kazein u finalnoj koncentraciji od 0,25%. Po završenoj elektroforezi, koja se odvijala pod istim uslovima kao i standardna SDS-PAGE, gel je inkubiran u 500 ml

pufera koji sadrži 25mM Tris pH 8,0, 5% Tween 80<sup>TM</sup> i 0,5% Triton X-100. Posle dva sata inkubiranja na sobnoj temperaturi uz mešanje, pufer je promenjen i inkubacija je nastavljena narednih 14 sati na 4°C.

Gel je zatim ispran destilovanom vodom i inkubiran dva sata u 500 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7, a posle toga spakovan u plastičnu foliju i inkubiran 4 sata na 30°C. Na ovaj način se na gelu dobijaju proteolitički aktivne forme enzima, razdvojene prema svojim molekulskim masama. Posle inkubacije na 30°C, za bojenje gelova je korišćena boja Amido black (45% metanola, 47% vode, 8% sirćetne kiseline i 0,5% amido black) dok je odbojavanje gelova vršeno u odbojivaču istog sastava kao i za standardne gelove. Na odbojenim gelovima se detektuju prosvetljene trake, odnosno mesta na kojima je došlo do hidrolize supstrata u gelu (totalnog kazeina), i koja odgovaraju pozicijama proteolitički aktivnih formi enzima. Uporedo sa nenedenaturišućim, puštana je i elektroforeza na standardnom SDS-gelu, na koji su pored uzoraka proteinaznih ekstrakata nanošeni i proteinski standardi. Na osnovu njihove pokretljivosti na gelu konstruisana je standardna kriva pomoću koje su određene molekulske mase stafilokoknih proteinaza.

## 3. REZULTATI

### 3. 1. Izolovanje i determinacija prirodnih izolata stafilokoka

Prirodni izolati stafilokoka su izolovani iz različitih izvora (sirovo, pasterizovano i UHT-mleko, stočna hrana, silaža) i sa različitih lokacija. Ukupno je testiran 171 izolat, a rezultati izolovanja su sumirani u Tabeli 1. Svi testirani izolati su Gram-pozitivne, katalaza pozitivne koke koje se na mikroskopskom preparatu javljaju kao pojedinačne, u parovima ili u obliku nepravilnih klastera (grozdova). Svi izolati imaju karakterističan izgled na standardnim podlogama za rast. Kolonije su okrugle, glatke, neprozirne, bele ili žuto pigmentisane, veličine od jednog do dva milimetra u prečniku. Tokom izolovanja, eliminisani su svi izolati koji na preparatu pokazuju formirane tetrade, pošto je njihova pojava karakteristična za bakterije iz roda *Micrococcus*, kao i za neke druge rodove. Pored toga, nijedan od potencijalnih izolata mikrokoka nije pokazao proteolitičku aktivnost u odnosu na totalni kazein u mleku, ili na neke od njegovih frakcija.

Početno testiranje proteolitičke aktivnosti izolata u odnosu na kazein vršeno je zasejavanjem tečnih kultura sojeva u sterilizovano mleko sa dodatkom dekstroze i kvašćevog ekstrakta kao i u mleko bez ovih dodataka. Uzorci su inkubirani na temperaturi od 30°C, a proteolitičke promene u mleku su registrovane posle 24, 48 i 72 sata. Od 171 izolata, 55 su u mleku izazivali proteolitičke promene u nekom od navedenih vremenskih intervala. Ove promene su bile različitog tipa, od koagulacije himozinskog tipa sa čvrstim grušem i izdvajanjem bistrog seruma, do proteolize sa pocepanim grušem uz izdvajanje mutnog ili bistrog seruma (Tabela 1). Kao kontrola je korišćen prirodni izolat *Staphylococcus* sp. M104 (ranije *Micrococcus*), za kojeg je ranije pokazano da sintetiše ekstracelularnu proteinazu koja koagulira mleko na način sličan himozinu. Proteolitičke promene u mleku su na ovaj način poslužile kao pravi indikator za izolovanje sojeva koji sintetišu ekstracelularne proteinaze.

Za dalje analize odabrano je 26 izolata koji pokazuju proteolitičku aktivnost, pri čemu su serijom "F" (od izolata F22 do F124) obuhvaćeni izolati izolovani iz sirovog ili UHT mleka, dok su u seriju "S" svrstani izolati poreklom iz uzoraka silaže (S44 - S2107). Determinacija ovih izolata je izvršena do nivoa roda, i utvrđeno je da svi pripadaju rodu *Staphylococcus* (Tabela 2). Pored već pomenutih karakteristika (bojenje po Gramu, proizvodnja katalaze, izgled mikroskopskog preparata), svi izolati su aerobni, što pokazuje odsustvo rasta u dubokom agaru sa bromkrezol purpustom. Izolati su takođe i halotolerantni, s obzirom da rastu u prisustvu NaCl u koncentraciji od 7,5%. Pored toga, nijedan od ovih izolata ne daje pozitivne rezultate u testovima za hemolizu i prisustvo koagulaze, a takođe nemaju sposobnost rasta na podlozi sa furazolidonom. Rast na podlozi sa furazolidonom je

jedna od osnovnih karakteristika koja omogućava razlikovanje rodova *Micrococcus* i *Staphylococcus*, s obzirom da mikrokoke rastu na ovoj podlozi, dok je rast stafilokoka inhibiran (von Rheinbaben and Hadlock, 1981). Na osnovu navedenih karakteristika može se reći da svi izolati pripadaju rodu *Staphylococcus* dok odsustvo proizvodnje koagulaze i hemolize na krvnom agaru ukazuju na to da se radi o saprofitskim, nepatogenim stafilokokama. Proteolitički aktivni sojevi, uključujući i sve ostale izolate, pripadaju mezofilnim vrstama, sa optimalnim rastom na temperaturi od 30°C na kojoj su i izolovani. Kao kontrola prilikom determinacije roda korišćeni su prirodni izolati *Staphylococcus aureus* Z2, hemolitičan i koagulaza pozitivan izolat čiji je rast inhibiran furazolidonom, kao i *Micrococcus* sp. R3 koji raste na podlozi sa furazolidonom, dok se na mikroskopskom preparatu javlja u obliku tetra- da (Tabela 2).

Tabela 1. Pregled izolovanja bakterija iz roda *Staphylococcus*

Datum izolovanja	Izvori izolovanja					Silaža	Ukupno Izolovano	Promene u mleku			
	Sirovo mleko	Past. mleko	UHT mleko	Stočna hrana	O			S	SP	P	
03. 03. 87.	19	3	-	-	-	22	19	1	-	2	
13. 03. 87.	5	-	-	5	-	10	6	-	3	1	
16. 03. 87.	5	-	-	3	-	8	7	-	-	1	
18. 03. 87.	2	-	7	-	-	9	5	2	1	1	
31. 03. 87.	3	-	-	-	-	3	2	-	-	1	
04. 04. 87.	-	-	2	-	-	2	1	1	-	-	
08. 04. 87.	1	-	1	-	-	2	2	-	-	-	
11. 05. 87.	7	3	-	-	-	10	9	1	-	-	
14. 05. 87.	6	-	-	-	-	6	3	1	2	-	
25. 05. 87.	8	-	10	-	-	18	14	4	-	-	
07. 06. 87.	16	-	-	-	-	16	11	3	2	-	
18. 06. 87.	6	-	7	-	-	13	4	5	4	-	
24. 08. 87.	-	-	8	-	-	8	5	-	-	3	
25. 06. 88.	-	-	-	-	44	44	28	7	7	2	
UKUPNO	78	6	35	8	44	171	116	25	19	11	

Legenda:

O - nema proteolize

S - koagulacija himozinskog tipa

P - proteoliza, cepanje gruša

SP - prelazni oblik proteolize (delimično pocepan gruš sa mutnim ili bistrim serumom)

Tabela 2. Determinacija proteolitičkih aktivnih izolata stafilokoka

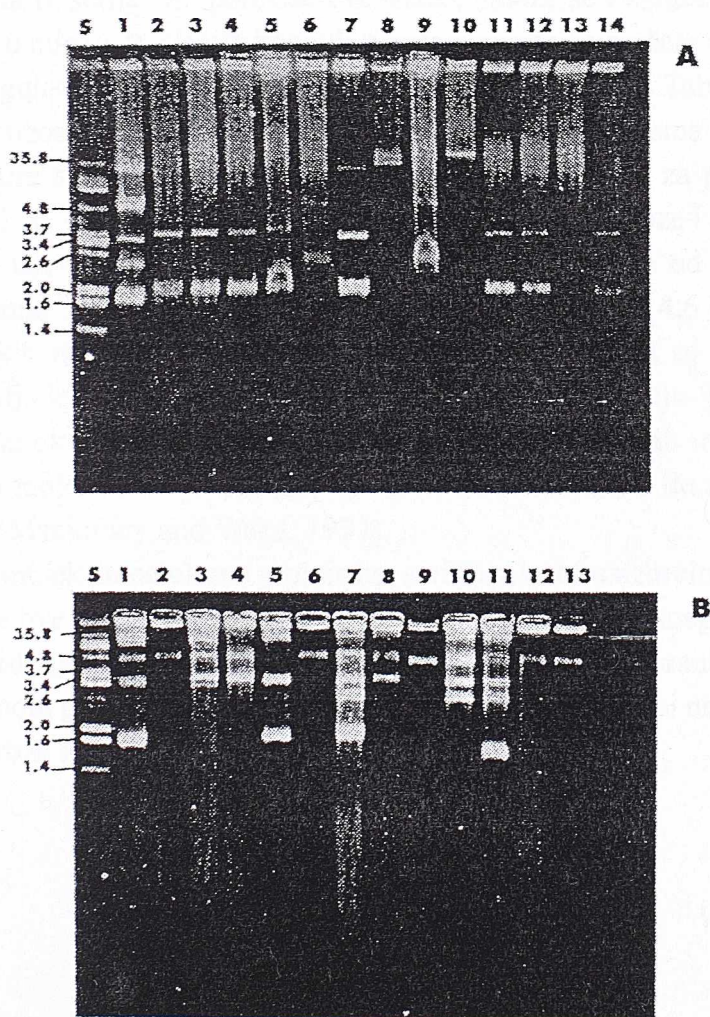
IZOLAT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
									5%	7, 5%	15%	
1) F22	koke, pojedinačne i u grozdovima	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
2) F30	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	Y
3) F31	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	Y
4) F48	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
5) F57	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
6) F72	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
7) F86	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
8) F96	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
9) F104	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	Y
10) F111	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
11) F120	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
12) F121	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
13) F124	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
14) FS44	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
15) S49	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
16) S172	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
17) S182	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
18) S1013	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
19) S1014	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
20) S1018	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
21) S2005	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	Y
22) S2007	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	Y
23) S2102	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	Y
24) S2103	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	Y
25) S2105	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	Y
26) S2107	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	Y
27) M104	“	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	W
28) Z2	“	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	Y
29) R3	koke, tetrade	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	Y

Legenda:

1) izgled mikroskopskog preparata, 2) bojenje po Gram-u, 3) prisustvo katalaze, 4) rast na podlozi sa furazolidonom (FTO agar), 5) rast u dubokom agaru sa bromkrezol purpurom (aerobno), 6) rast u dubokom agaru sa bromkrezol purpurom (anaerobno), 7) hemoliza na krvnom agaru, 8) koagulacija seruma, 9) rast u prisustvu različitih koncentracija NaCl, 10) boja kolonija (W - bele, Y - žute).

### 3. 2. Plazmidni sadržaj izolata

U cilju potpunije karakterizacije prirodnih izolata stafilokoka iz svih 26 kandidata odabranih za dalji rad (uključujući i kontrolni izolat *Staphylococcus* sp. M104) izolovani su plazmidi (Slika 1). Kao standard za molekulske mase korišćeni su plazmidi soja *Escherichia coli* V517 iako veličine pojedinih plazmidnih traka kod prirodnih izolata nisu precizno utvrđivane. Neki od izolata stafilokoka imaju skoro identične plazmidne profile (izolati F30, F31, F48, F120, F121 i F124, sa po dve trake približno istih veličina, kao i izolati S49, S1014, S2105 i S2107 sa jednom trakom iste veličine). S obzirom na ostale analizirane osobine ovih izolata, kao što su veličina i pigmentacija kolonija i nivo proteolitičke aktivnosti, može se tvrditi da se u navedenim slučajevima radi o različitim prirodnim izolatima.



Slika 1. Plazmidni profili prirodnih izolata stafilokoka

A) S - plazmidi soja *E. coli* V517, 1) soj F22, 2) F30, 3) F31, 4) F48, 5) F57, 6) F72, 7) F86, 8) F96, 9) F104, 10) F111, 11) F120, 12) F121, 13) M104, 14) F124. (serija F)

B) S- *E. coli* V517, 1) S44, 2) S49, 3) S172, 4) S182, 5) S1013, 6) S1014, 7) S1018, 8) S2005, 9) S2007, 10) S2102, 11) S2103, 12) S2105, 13) S2107. (serija S)

(Molekulske mase plazmida *E. coli* V517 su izražene u megadaltonima. )

### 3. 3. Proteolitička aktivnost

#### 3. 3. 1. Koagulacija mleka i delovanje na frakcije kazeina

Proteolitička aktivnost prirodnih izolata stafilokoka je detektovana zasejavanjem kultura stafilokoka u sterilizovano mleko sa dodatkom dekstroze i kvašćevog ekstrakta i u neobogaćeno sterilizovano mleko. Uzorci mleka su inkubirani na 30°C, uz registrovanje proteolitičkih promena na 24, 48 i 72 sata, a u uzorke mleka zasejavane su pune prekonocne kulture prirodnih izolata stafilokoka. Na Tabeli 3 prikazana su vremena koagulacije za svaki od izolata, zajedno sa tipom proteolitičke promene koju izazivaju u obogaćenom i neobogaćenom mleku. U seriju izolata označenu sa "F" uvršćeni su isključivo izolati koji u mleku izazivaju koagulaciju himozinskog tipa (formiranje čvrstog gruša uz izdvajanje bistrog seruma). Među izolatima iz serije "S" poreklom iz silaže, nalaze se i izolati koji izazivaju drugačiji tip proteolize u mleku, tj. slabiju koagulaciju sa pocepanim grušem i mutnim serumom. Pored vremena koagulacije i tipa proteolitičkih promena u mleku, na Tabeli 3 predstavljene su i pH vrednosti u uzorcima mleka posle završene koagulacije. Početna pH vrednost mleka pre dodavanja kultura stafilokoka je iznosila 6,60, a pH vrednosti za pojedinačne izolate prikazane u Tabeli 3 se odnose na uzorke mleka bez dodatka dekstroze i kvašćevog ekstrakta. Vrednosti pH u uzorcima mleka posle koagulacije su se kretale od 5,49 do 6,37. Ove vrednosti pH su znatno iznad izoelektrične tačke kazeina koja iznosi 4,6 i na kojoj dolazi do razgradnje kazeinskih micela i koagulacije mleka. Na osnovu toga se može zaključiti da prirodni izolati stafilokoka u uzorcima mleka izazivaju koagulaciju proteolitičkog tipa, odnosno da sintetišu ekstracelularne proteinaze. Struktura kazeinskih micela je u nativnoj formi stabilizovana molekulima  $\kappa$ -kazeina, čijom hidrolizom dolazi do razgradnje micela i koagulacije mleka (Mackinlay and Wake, 1971).

U skladu s tim, ekstracelularne proteinaze stafilokoka bi u uzorcima mleka trebalo da dovode do hidrolize ove kazeinske frakcije i da na taj način izazovu koagulaciju. Da bi se to potvrdilo, ukupni proteini uzoraka mleka su, posle koagulacije, analizirani elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu. U ovom eksperimentu korišćeni su uzorci neobogaćenog mleka (bez dodatka dekstroze i kvašćevog ekstrakta).

Tabela 3. Proteolitičke promene u mleku izazvane kulturama prirodnih izolata stafilokoka

1	2	3	4	1	2	3	4
IZOLAT	MLEKO	MLEKO + D + Y. E	pH	IZOLAT	MLEKO	MLEKO + D + Y. E	pH
F22	S(24)	S(24)	5, 92	S44	S(48)	S(24)	6, 12
F30	S(48)	S(24)	6, 30	S49	S(48)	S(48)	6, 22
F31	S(48)	S(24)	5, 98	S172	SP(72)	SP(48)	6, 33
F48	S(24)	S(24)	5, 87	S182	SP(48)	SP(24)	5, 98
F57	S(48)	S(24)	6, 31	S1013	SP(48)	SP(24)	6, 05
F72	S(24)	S(24)	5, 49	S1014	SP(48)	SP(24)	6, 31
F86	S(24)	S(24)	6, 31	S1018	SP(72)	SP(48)	6, 12
F96	S(72)	S(24)	6, 19	S2005	S(48)	S(48)	6, 25
F104	S(48)	S(24)	5, 80	S2007	S(24)	S(24)	6, 02
F111	S(48)	S(24)	5, 76	S2102	SP(24)	S(24)	6, 37
F120	S(24)	S(24)	6, 00	S2103	S(48)	S(48)	6, 17
F121	S(24)	S(24)	5, 90	S2105	S(24)	S(24)	6, 29
F124	S(24)	S(24)	5, 95	S2107	S(24)	S(24)	6, 35
M104	S(24)	S(24)	5, 70				

Legenda:

1) oznaka izolata, 2) vreme koagulacije (h) i tip proteolitičke promene u mleku, 3) vreme koagulacije i tip proteolitičke promene u mleku sa dodatkom dekstroze i kvašćevog ekstrakta, 4) pH vrednosti u uzorcima neobogaćenog mleka posle završene koagulacije.

Proteolitičke promene u mleku:

S - koagulacija himozinskog tipa

SP - prelazni oblik proteolize (koagulacija sa pocepanim grušem i mutnim serumom)

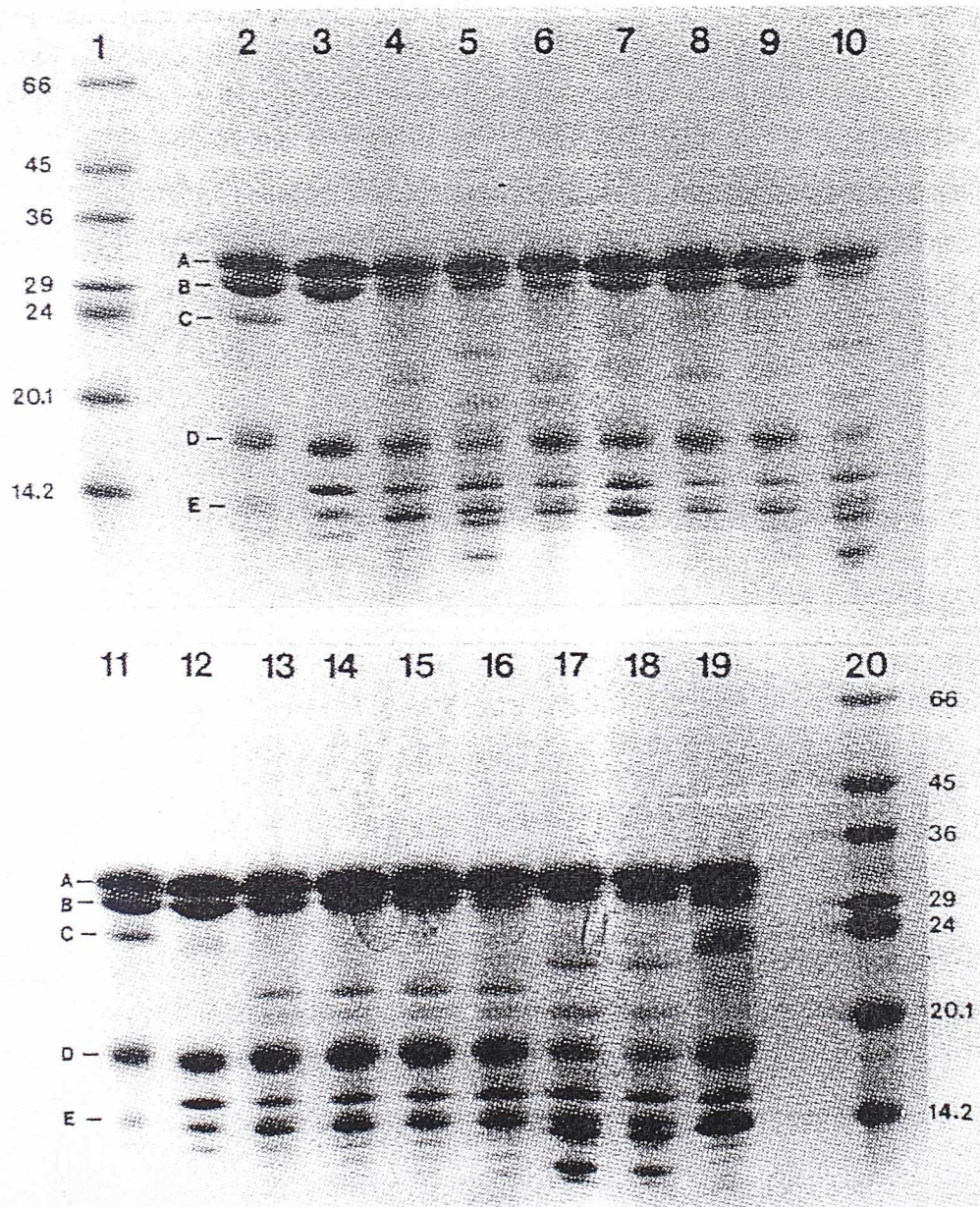
### 3. 3. 2. Elektroforetska analiza uzoraka mleka posle koagulacije

Pošto se na osnovu prvih rezultata moglo zaključiti da prirodni izolati stafilokoka sintetišu ekstracelularne proteinaze, elektroforetski su analizirani uzorci ukupnih proteina mleka. Na ovaj način su testirani prirodni izolati iz serije F (poreklom iz mleka), s obzirom da se među njima nalazio najveći broj sojeva koji brže koaguliraju mleko (videti Tabelu 3). Pored toga, svi sojevi iz ove serije u mleku izazivaju koagulaciju himozinskog tipa.

Po završenoj koagulaciji, uzorci mleka su rastvoreni u puferu za uzorak i razdvajani elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu sa gradijentom koncentracije akrilamida od 10 do 20%. Kao kontrola je korišćen uzorak obezmašćenog mleka koje nije tretirano proteolitičkim enzimima kao i uzorak istog mleka podsirenog (koaguliranog) komercijalnim preparatom telećeg sirila čija je aktivna komponenta himozin. Koagulacija mleka himozinom je vršena prema standardnoj proceduri, pri čemu je vreme koagulacije iznosilo 30 minuta. U kontrolnom uzorku netretiranog mleka vidljive su sve tri glavne kazeinske frakcije,  $\alpha_{S1}$  - ,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazein (slika 2). U uzorcima mleka posle koagulacije, pored očekivanog nestanka trake koja odgovara  $\kappa$ -kazeinu hidrolizovanom od strane ekstracelularnih proteinaza, primetna je i veća ili manja hidroliza  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$  - frakcije. U slučaju kontrolnog uzorka tretiranog



preparatom komercijalnog telećeg sirila, hidrolizovan je samo  $\kappa$ -kazein, dok su  $\alpha_{S1}$  i  $\beta$ -kazein ostali praktično intaktni. U sastav telećeg sirila ulazi himozin, kisela proteinaza poreklom iz jednog dela želuca preživara koja preferencijalno hidrolizuje  $\kappa$ -kazein i izaziva koagulaciju mleka. Ovaj proces je stimulisan prisustvom jona kalcijuma (Green, 1977) i predstavlja jednu od početnih faza u tehnološkom procesu proizvodnje sireva. S obzirom da pokazuje manji afinitet prema  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ -kazeinu, himozin dovodi do njihove hidrolize tek u kasnijim fazama sazrevanja sireva. (Green, 1977).



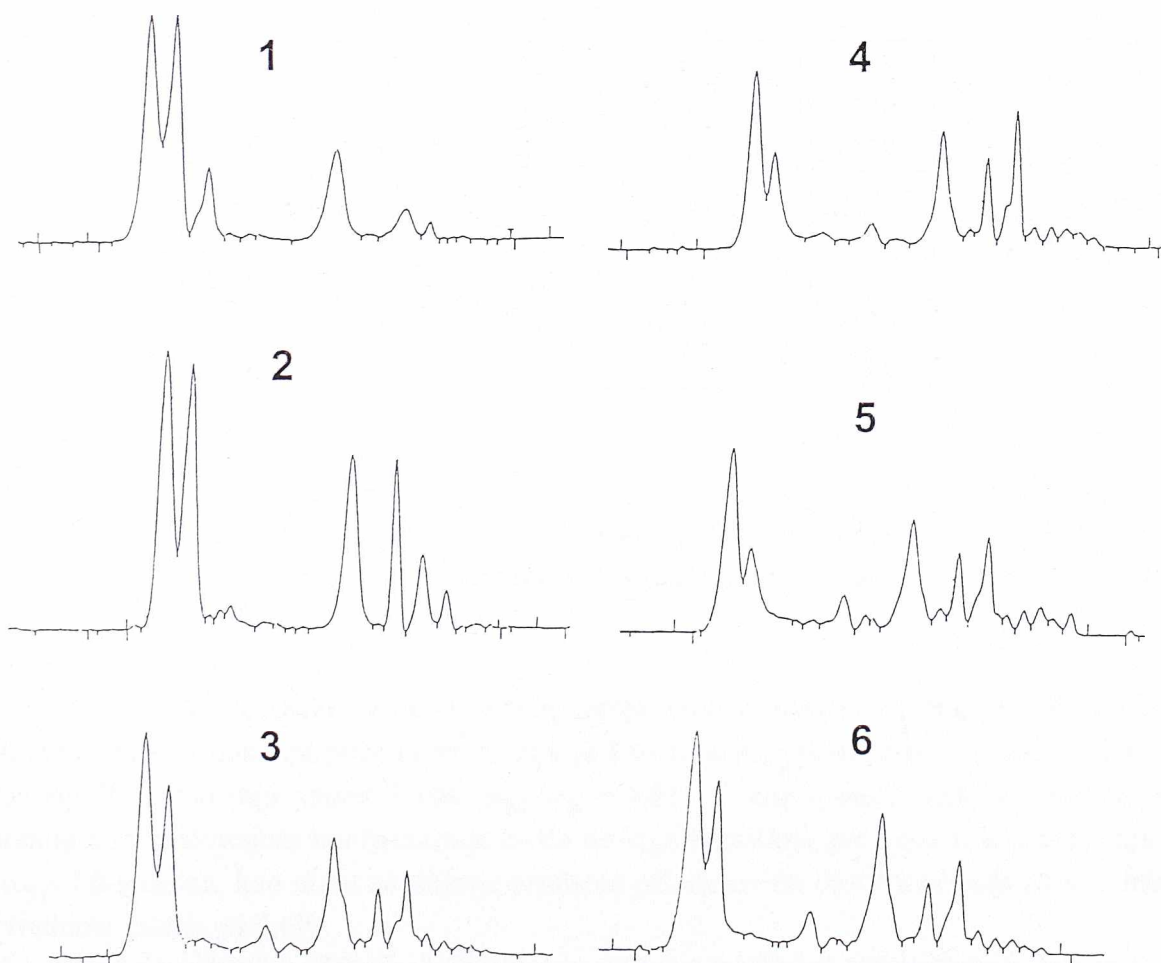
Slika 2. SDS-PAGE proteina mleka posle koagulacije stafilokoknim proteinazama.

1 i 20 - standard poznatih molekulskih masa, 2 i 11 - netretirano mleko, 3 i 12 - uzorak koaguliran himozinom, 4 - F22, 5 - F31, 6 - F48, 7 - F72, 8 - F86, 9 - F96, 10 - F104, 13 - F111, 14 - F120, 15 - F121, 16 - M104, 17 - F30, 18 - F57, 19 - F124. Molekulske mase proteinskog standarda izražene su u kilodaltonima.

A -  $\alpha_{S1}$  - kazein, B -  $\beta$ - kazein, C -  $\kappa$ -kazein, D -  $\beta$ -laktoglobulin, E -  $\alpha$ -laktalbumin.

Ekstracelularne proteinaze, pored hidrolize  $\kappa$ -kazeina (čime izazivaju koagulaciju), u određenoj meri hidrolizuju i  $\alpha_{S1}$  - i  $\beta$ -kazein. S obzirom na to da se frakcije kazeina u mleku ne nalaze u ekvimolarnom odnosu, kao i na činjenicu da su za test koagulacije korišćene ćelijske kulture umesto prečišćenog enzimskog ekstrakta, na ovaj način se mogu dobiti samo preliminarne informacije o afinitetu proteinaza stafilokoka prema određenim frakcijama kazeina. S obzirom na veći broj prirodnih izolata koji sintetišu ekstracelularne proteinaze, na osnovu rezultata ovog testa mogu se identifikovati sojevi koji u ovakvim uslovima izazivaju koagulaciju mleka bez prevelike hidrolize  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ -kazeina.

Da bi se odnosi kazeinskih frakcija u uzorcima posle koagulacije kvantifikovali, poliakrilamidni gelovi su po završenoj elektroforezi skanirani na denzitometru. Na slici 3. su prikazani denzitogrami nekoliko uzoraka koji odgovaraju pojedinim prirodnim izolatima, kao i denzitogrami kontrolnih uzoraka. Na denzitogramima se vidi da je pik koji odgovara  $\kappa$ -kazeinu odsutan kod svih uzoraka u kojima je došlo do koagulacije mleka. Pored toga, proteinaze prirodnih izolata stafilokoka u većoj meri hidrolizuju  $\beta$ -kazein, što je inače karakteristično za veliki broj bakterijskih proteinaza.



Slika 3. Denzitogrami kazeinskih frakcija po završenoj koagulaciji. 1) netretirano mleko, 2) uzorak sa komercijalnim sirilom (himozin), 3) F86, 4) F22, 5) M104, 6) F111.

Na Tabeli 4 prikazani su međusobni odnosi kazeinskih frakcija u uzorcima, preračunati u odnosu na površine na denzitogramima koje odgovaraju određenim pikovima. Ovi rezultati ukazuju na smanjenje količine  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ -kazeinske frakcije u odnosu na njihovu početnu koncentraciju u mleku. Iz dobijenih vrednosti se vidi da se koncentracija  $\beta$ -kazeina pod delovanjem stafilokoknih proteinaza smanjuje od 1,38 do 3,92 puta.

Tabela 4. Odnosi kazeinskih frakcija posle koagulacije stafilokoknim proteinazama

IZOLAT	1. $\alpha / \beta$	2. $\alpha_M / \alpha_X$	3. $\beta_M / \beta_X$	4. NPN (%)
F 22	1,70	1,29	1,97	0,0712
F 30	2,61	1,47	3,40	0,1406
F 31	2,21	1,23	2,44	0,1182
F 48	1,81	1,22	1,99	0,0703
F 57	2,32	1,49	3,10	0,1631
F 72	1,79	0,97	1,58	0,0698
F 86	1,81	0,94	1,38	0,0864
F 96	1,55	1,08	1,48	0,0665
F 104	2,77	1,81	3,92	0,1508
F 111	1,57	1,00	1,41	0,0680
F 120	1,87	1,09	1,84	0,1239
F 121	1,84	0,98	1,44	0,0903
F 124	2,00	1,28	2,31	0,1362
M 104	1,70	1,25	1,90	0,1163
S *	1,24	0,82	0,92	0,0520
MLEKO	1,11	/	/	0,0324

Legenda:

1) odnos  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ -kazeina posle koagulacije u uzorku, 2) odnos  $\alpha_{S1}$  frakcije u mleku i uzorcima posle koagulacije, 3) odnos  $\beta$ -frakcije kazeina u mleku i uzorcima posle koagulacije, 4) neproteinski azot (% - g/100 ml)

Što se tiče  $\alpha_{S1}$ -kazeina, kod jednog broja izolata njegova koncentracija ostaje nepromenjena u odnosu na početni nivo, dok je kod izrazito proteolitičnih sojeva to smanjenje signifikantno (npr. izolat F 104,  $\alpha_M / \alpha_X = 1,81$ ). U kontrolnom uzorku mleka koaguliranog pod delovanjem himozina nije došlo do signifikantnije promene u koncentracijama  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ -kazeina, kao ni do značajnije promene pH vrednosti (6,49 u odnosu na početnu pH vrednost mleka od 6,60).

Pored navedenih podataka, u Tabeli 4 se nalaze i vrednosti koncentracija neproteinskog azota izraženih u procentima. Povećanje koncentracije neproteinskog azota u uzorcima mleka predstavlja parametar koji generalno ilustruje proteolitičku aktivnost testiranih izolata, a dobijene vrednosti su uglavnom u skladu sa stepenom degradacije kazeinskih frakcija.

### 3.4. Određivanje supstratne specifičnosti stafilokoknih proteinaza

Pored testiranja proteolitičke aktivnosti kultura u mleku, aktivnost proteinaza prirodnih izolata stafilokoka je određivana u odnosu na pojedine kazeinske frakcije, kao i u odnosu na druge proteine (heterologe supstrate). Svi izolati su testirani u eksperimentu hidrolize kazeinskih frakcija suspenzijama celih ćelija, prema proceduri razvijenoj za detekciju proizvodnje ekstracelularnih proteinaza kod bakterija mlečne kiseline (Hill and Gasson, 1986). Posle inkubacije sa supstratom u trajanju od 5 sati na 30°C, svi izolati hidrolizuju sve tri frakcije kazeina u potpunosti. Ovakvi rezultati su se mogli očekivati, s obzirom da je digestija supstrata vršena u uslovima određenim za detekciju ekstracelularnih proteinaza laktokoka i laktobacila. Proteinaze bakterija mlečne kiseline u većini slučajeva sintetišu proteine specifične za određene frakcije kazeina, uglavnom  $\beta$ -kazein (Kok and Venema, 1988, Kojić et al. , 1995) i ukupno gledano imaju znatno nižu proteolitičku aktivnost u odnosu na proteinaze stafilokoka ili roda *Bacillus*. Zbog toga je eksperiment sa prirodnim izolatima stafilokoka ponovljen sa kraćim vremenima digestije kazeinskih frakcija (30 minuta za  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ -kazein i 1 sat za  $\kappa$ -kazein ). Posle digestije, uzorci su analizirani na SDS-PAGE, a rezultati ovog testa su prikazani na Tabeli 5. Na osnovu toga, u obe serije izolata identifikovani su izrazito proteolitički aktivni kandidati čije ćelije potpuno degradiraju sva tri supstrata i u znatno kraćem vremenu inkubacije (F86, F31, S2007, S2105 itd). Za dalji rad, odnosno za potpuniju karakterizaciju njihovih ekstracelularnih proteinaza, pored ranije izolovanog *Staphylococcus* sp. M104, odabrana su po dva prirodna izolata iz obe serije. Izolati F22, F86, S2007 i S2105 imaju, kao i ostali, sposobnost degradacije sve tri kazeinske frakcije (Slika 4), ali se razlikuju u odnosu na nivo proteolitičke aktivnosti kao i izvor iz kojeg su izolovani.

Na kazeinskom agaru, indikatorskoj podlozi razvijenoj za identifikaciju proteolitički aktivnih sojeva, svih pet izolata formiraju zone degradacije totalnog kazeina, pri čemu prečnici zona odgovaraju nivou aktivnosti proteinaza. Petri šolja prikazana na Slici 5 inkubirana je 24 sata na 30°C, mada se vidljive zone proteolize (prečnika 3 do 4 mm) formiraju već posle 10 sati inkubacije. Kontrolni proteinaza - negativan soj *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* MG 1363, ni posle 48 sati inkubacije ne pokazuje sposobnost degradacije supstrata.

### 3.5. Delovanje stafilokoknih proteinaza na heterologe proteinske supstrate

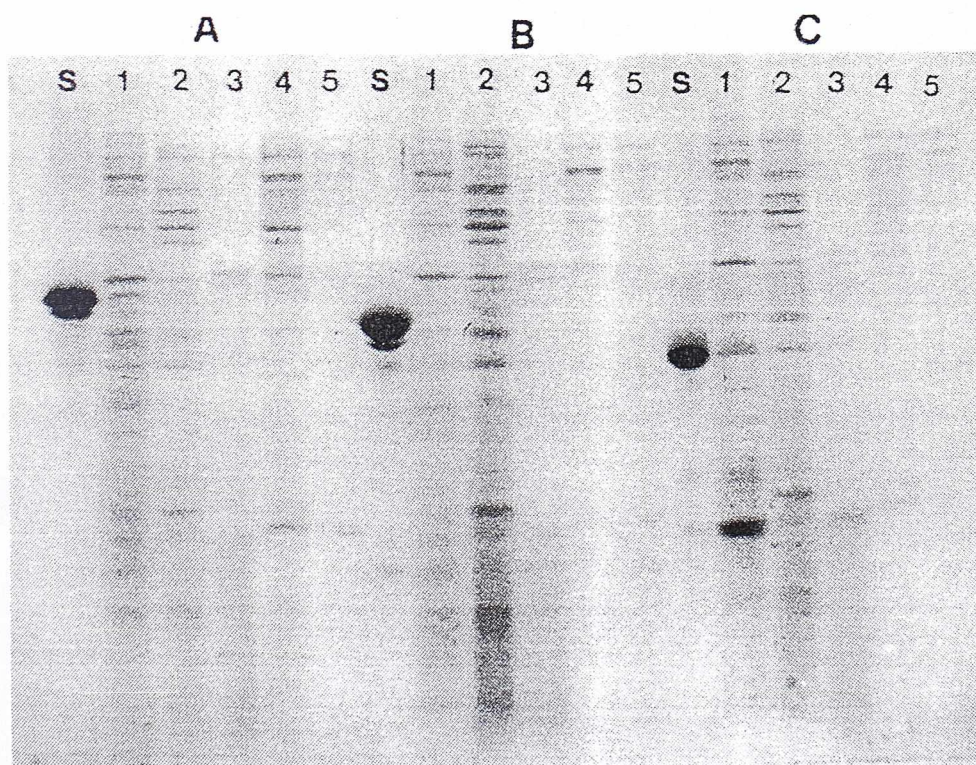
Pored delovanja na  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazein, ispitivana je aktivnost stafilokoknih proteinaza u odnosu na druge proteinske supstrate. U ovom eksperimentu, kao supstrati su korišćeni denaturisani hemoglobin, goveđi serum albumin (BSA) i želatin. Kao i u prethodnom slučaju, za hidrolizu supstrata su korišćene suspenzije celih ćelija odgovarajućih izolata, a produkti degradacije su analizirani pomoću SDS-PAGE (Slika 6). Na ovaj način je utvrđeno da nijedan od testiranih izolata nema sposobnost degradacije hemoglobina, dok sposobnost hidrolize želatina imaju samo proteolitički najaktivniji izolati (F86, S2007, S2105). Kada je u pitanju BSA, parcijalna degradacija supstrata je primetna kod svih izolata, izuzev F22 kod koga je količina supstrata ostala praktično nepromenjena u odnosu na polaznu. Kao i prilikom hidrolize kazeinskih frakcija, vreme inkubacije ćelija sa supstratom je bilo 5 sati.

Tabela 5. Relativni stepen hidrolize kazeinskih frakcija od strane prirodnih izolata stafilokoka.

IZOLAT	$\alpha_{S1}$	$\beta$	$\kappa$	IZOLAT	$\alpha_{S1}$	$\beta$	$\kappa$
F 22	+	+	+	S 44	-	-	-
F 30	-	+	+	S 49	-	-	-
F 31	+++	+++	+++	S 172	-	-	-
F 48	-	-	-	S 182	-	-	+/-
F 57	-	-	-	S 1013	+	-	+
F 72	++	+++	+++	S 1014	-	-	-
F 86	+++	+++	+++	S 1018	-	-	-
F 96	-	-	-	S 2005	-	-	-
F 104	+	+	+/-	S 2007	+++	+++	+++
F 111	-	+/-	+/-	S 2102	-	-	-
F 120	-	+/-	+/-	S 2103	-	-	-
F 121	+++	+++	+++	S 2105	+++	+++	+++
F 124	-	+/-	+	S 2107	+++	+++	+++
M 104	+	++	++				

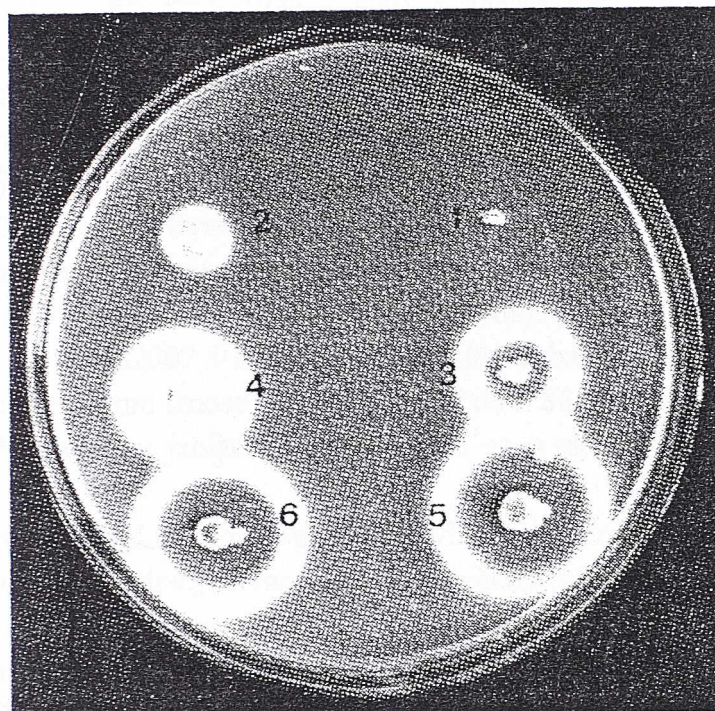
Legenda:

(-) - nema hidrolize, (+/-) - slabija hidroliza, veći deo supstrata intaktan, (+, ++, +++) - izražena hidroliza, od delimične do potpune. Vreme inkubacije: 30 minuta za  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ - kazein, 1 sat za  $\kappa$ -kazein



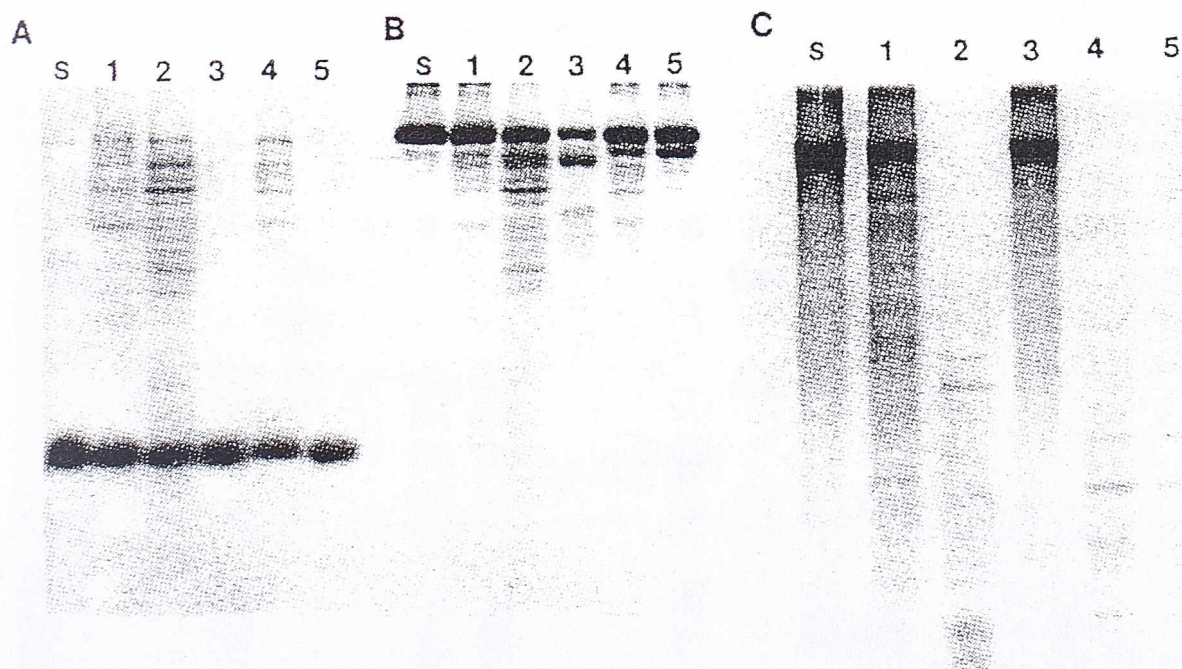
Slika 4. Hidroliza kazeinskih frakcija celim ćelijama prirodnih izolata stafilokoka.

A)  $\alpha_{S1}$ - kazein, B)  $\beta$ - kazein, C)  $\kappa$ -kazein. Kolone: S - početni supstrat, 1 - F22, 2 - F86, 3 - M104, 4 - S2007, 5 - S2105. Vreme inkubacije ćelija sa supstratom je 5 sati.



Slika 5. Prirodni izolati stafilokoka na kazeinskom agaru.

1) *L. lactis* subsp. *lactis* MG 1363 (proteinaza - negativan soj), 2) F22, 3) F86, 4) M104, 5) S2007, 6) S2105.



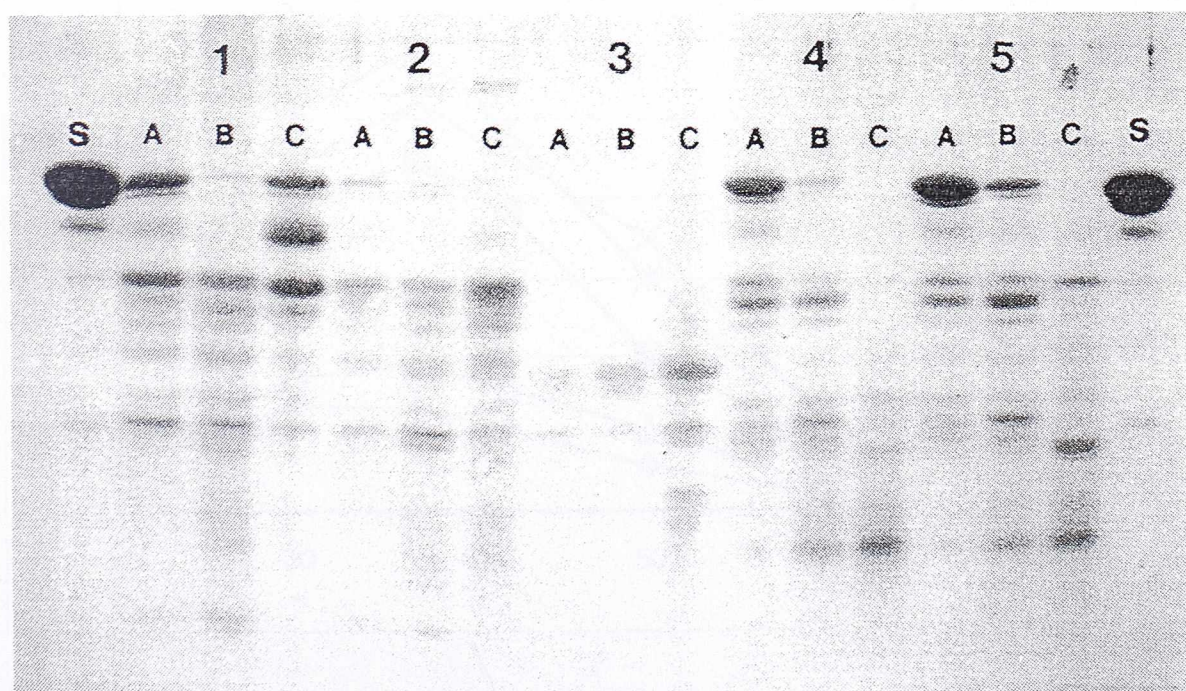
Slika 6. Hidroliza denaturisanog hemoglobina (A), BSA (B) i želatina (C) celim ćelijama prirodnih izolata stafilokoka.

S - početni supstrat, 1 - F22, 2 - F86, 3 - M104, 4 - S2007, 5 - S2105. Vreme inkubacije sa supstratom je 5 sati

### 3. 6. Optimalne vrednosti pH i temperature za delovanje stafilokoknih proteinaza

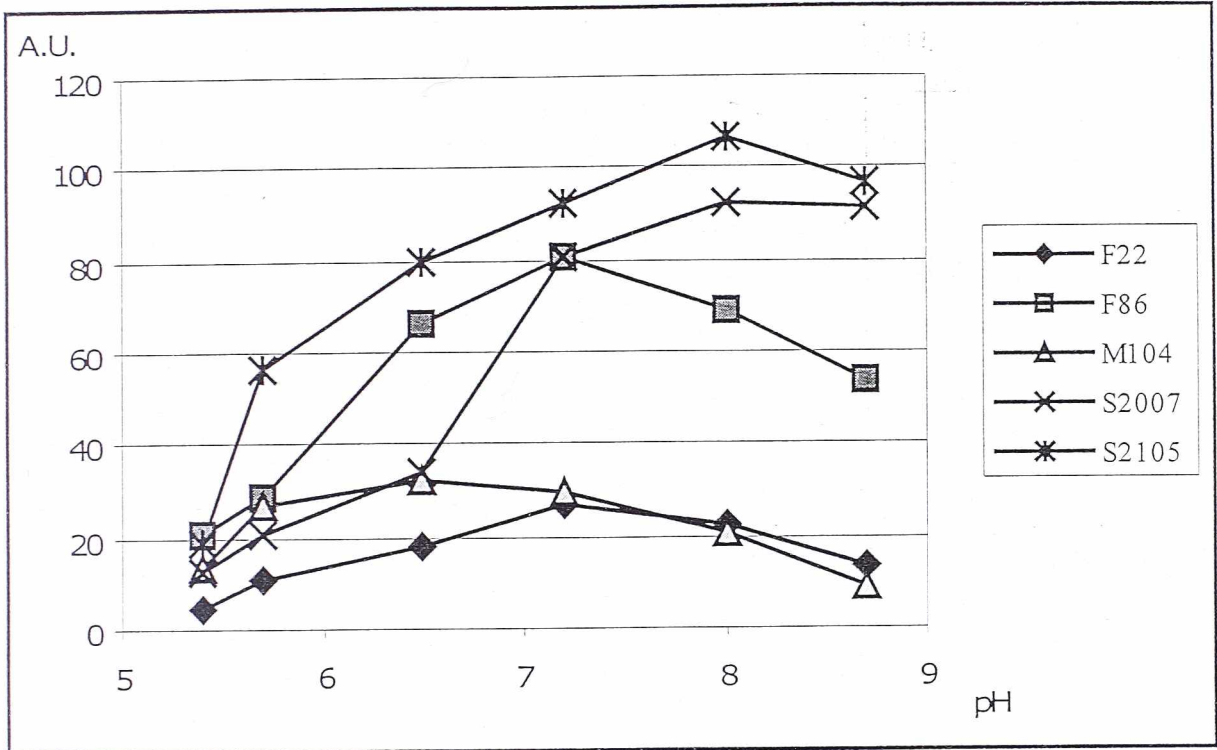
U okviru karakterizacije ekstracelularnih proteinaza stafilokoka određivana je i njihova aktivnost na različitim pH vrednostima. Ovaj eksperiment je rađen sa celim ćelijama odabranih prirodnih izolata, a kao supstrat je korišćen  $\beta$ -kazein. Na Slici 7 prikazani su produkti hidrolize  $\beta$ -kazeina na tri vrednosti pH (5,7, 7,2, i 8,7) analizirani na SDS-PAGE. Na osnovu ovih rezultata, u odnosu na intenzitet digestije  $\beta$ -kazeina na različitim pH vrednostima, može se zaključiti da izolati F22 i F86 sintetišu neutralne proteinaze, izolat M104 kiselu, dok su proteinaze izolata S2007 i S2105 najaktivnije na baznoj pH vrednosti. Vremena inkubacije ćelija sa supstratom iznose 5 minuta za izolate F 86, S2007 i S2105, 15 minuta za izolat M104 i 30 minuta za izolat F22 a odabrana su u skladu sa aktivnošću njihovih proteinaza.

Da bi se preciznije odredili pH optimumi ovih proteinaza, koncentracija formiranih produkata degradacije  $\beta$ -kazeina je kvantitativno određena (Lowry et al. , 1951). Digestija supstrata je vršena celim ćelijama u trajanju od 1 sata, a zatim su uzorci precipitirani trihlor-sirćetnom kiselinom. Enzimska aktivnost je izražena pomoću arbitrarnih jedinica. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim eksperimentom, a krive enzimske aktivnosti u funkciji pH vrednosti (Slika 8) pokazuju da proteinaze izolata F22 i F86 imaju najveću aktivnost na pH 7,2, izolata M104 na pH 6,5, izolata S2105 na pH 8 i izolata S2007 između pH 8 i 8,7. Kao i u prethodnim slučajevima, digestija supstrata je vršena na 30°C. Optimalne temperature za aktivnost proteinaza iznose 37°C na pH 7,2 sa izuzetkom izolata F22 kod koga je najefikasnija digestija  $\beta$ -kazeina postignuta na 30°C (Slika 9).

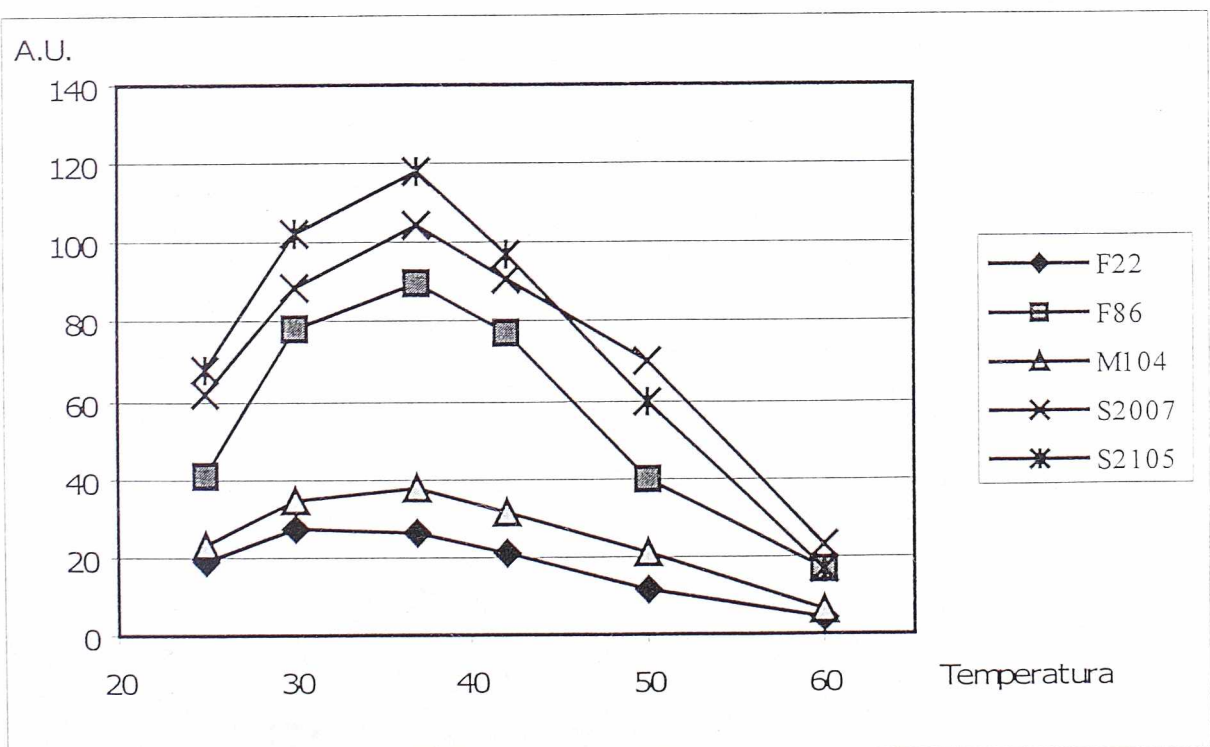


Slika 7. Digestije  $\beta$ -kazeina na različitim pH vrednostima

1 - F22, 2 - F86, 3 - M104, 4 - S2007, 5 - S2105. (S - početni supstrat, A - pH 5,7, B - pH 7,2, C - pH 8,7)



Slika 8. Aktivnost stafilokoknih proteinaza u funkciji pH vrednosti  
(A. U. - arbitrarne jedinice aktivnosti)



Slika 9. Aktivnost stafilokoknih proteinaza u funkciji temperature  
(A. U. - arbitrarne jedinice aktivnosti)



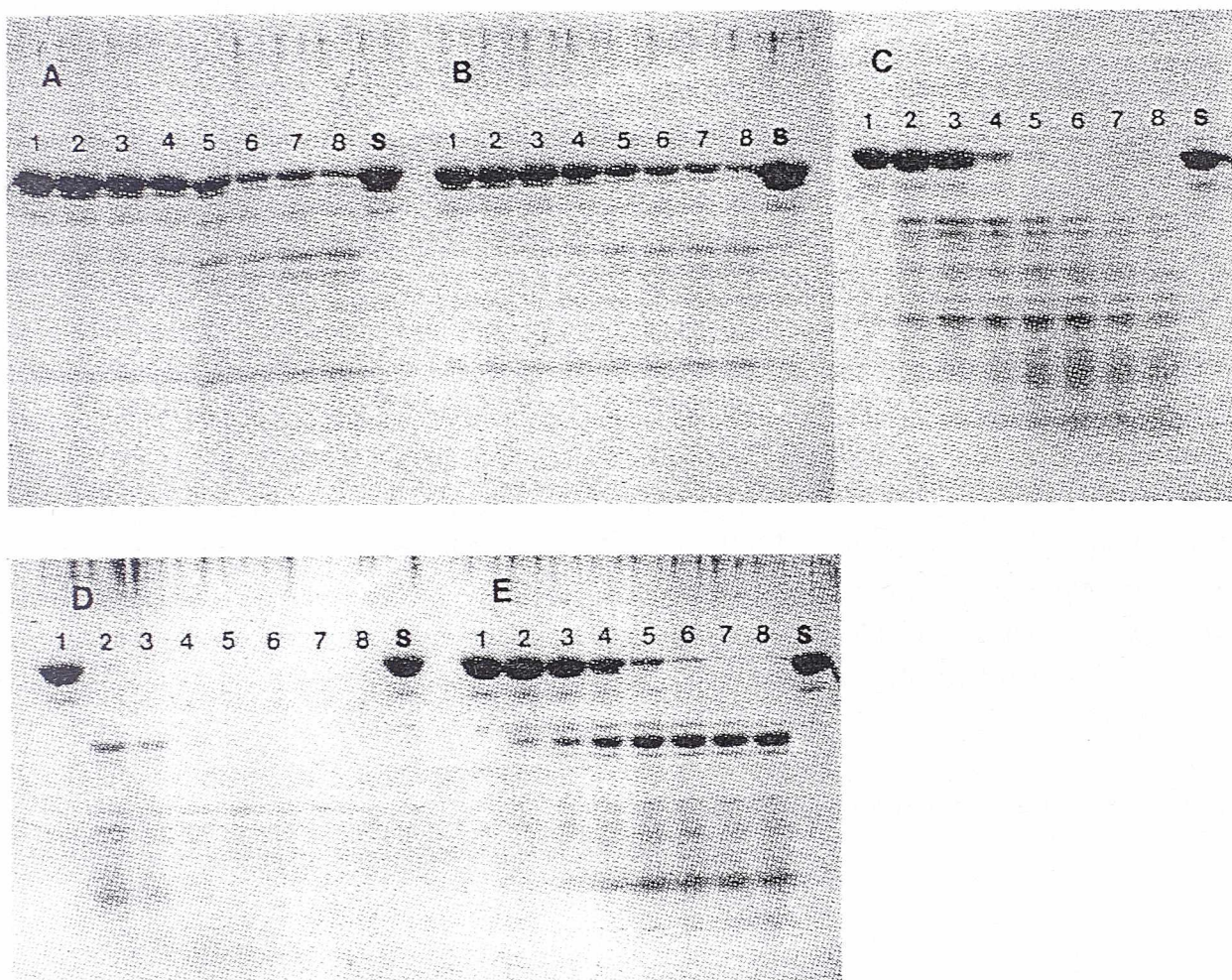
### 3. 7. Aktivnost ekstrakata stafilokoknih proteinaza

Proteinazni ekstrakti prirodnih izolata stafilokoka su dobijeni ispiranjem ćelija u fosfatnom puferu (pH 7,2), a kao supstrat za određivanje njihove aktivnosti korišćen je  $\beta$ -kazein. Na Slici 10 su prikazane kinetike degradacije  $\beta$ -kazeina od strane ekstracelularnih stafilokoknih proteinaza. Ove kinetike su dobijene tako što su enzimski ekstrakti pomešani sa supstratom u odgovarajućim odnosima, pri čemu su uzorci iz reakcione smese uzimani u određenim vremenskim intervalima i analizirani na SDS-PAGE. Na Tabeli 6 prikazane su ukupne koncentracije proteina u ekstraktima, kao i zapreminski odnosi ekstrakta i supstrata za svaku digestiju.

Tabela 6. Koncentracija proteina u ekstraktima i zapreminski odnos enzima i supstrata

IZOLAT	KONCENTRACIJA PROTEINA (mg/ml)	ENZIM / SUPSTRAT
F 22	2,9	1:1
F 86	3,6	1:4
M 104	2,9	1:3
S 2007	3,0	1:4
S 2105	3,1	1:4

Odnosi ekstrakta i supstrata su određivani u odnosu na relativnu proteolitičku aktivnost izolata, da bi se u odabranim vremenskim intervalima digestije mogli videti produkti degradacije  $\beta$ -kazeina karakteristični za svaki izolat. U odnosu na tip degradacije  $\beta$ -kazeina i oslobađanje specifičnih međuprodukata analizirani izolati se mogu podeliti (uslovno) u tri grupe. U prvu grupu bi spadali izolati F22 i M104 (Slika 10 - A i B), u drugu grupu izolat F86 (slika 10 - C) i u treću izolat S2105 i S2007 (Slika 10 - D i E). Veoma slični rezultati su dobijeni kada je za pripremu ekstrakata i odvijanje reakcija umesto fosfatnog pufera korišćen Tris -  $\text{Ca}^{++}$ pufer, na osnovu čega se može zaključiti da kalcijumovi joni nemaju uticaja na oslobađanje proteinaza sa ćelijskog omotača.



Slika 10. Hidroliza  $\beta$  - kazeina ekstraktima stafilokoknih proteinaza

A - F22, B - M104, C - F86, D - S2105, E - S2007.

S - početni supstrat, 1) 0 minuta, 2) 5 minuta, 3) 10 minuta, 4) 30 minuta, 5) 60 minuta, 6) 90 minuta, 7) 120 minuta, 8) 180 minuta (vreme uzimanja uzorka iz reakcione smese. )

### 3. 8. Uticaj jona i inhibitora na aktivnost proteinaza

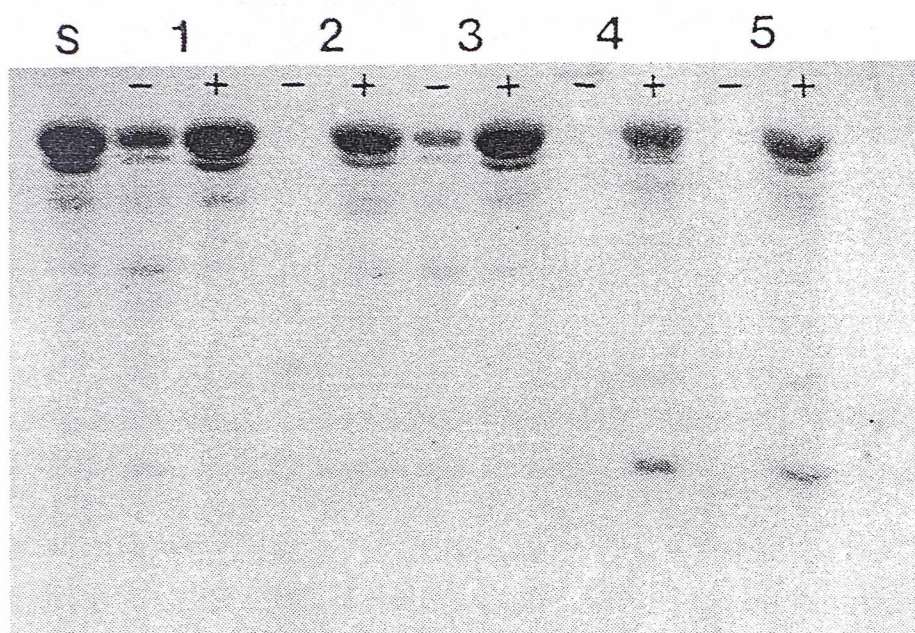
U eksperimentu određivanja uticaja prisustva jona i inhibitora na aktivnost stafilokoknih proteinaza korišćeni su dijalizirani proteinazni ekstrakti, dok je, kao i u prethodnim slučajevima, kao supstrat korišćen  $\beta$ -kazein. Joni  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  kao i EDTA i EGTA su u reakcionim smesama bili prisutni u 10 mM finalnoj koncentraciji. Digestije supstrata su vršene 30 minuta na  $30^{\circ}\text{C}$ , a proteolitička aktivnost je određivana merenjem koncentracija TCA-solubilnih produkata hidrolize  $\beta$ -kazeina (Lowry et al., 1951). Na Tabeli 7 su prikazane relativne aktivnosti proteinaznih ekstrakata sojeva stafilokoka, pri čemu vrednost od 100% predstavlja aktivnost dijaliziranog ekstrakta bez dodatih jona ili inhibitora. Iz ovih rezultata se vidi da joni  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  nemaju uticaj na aktivnost proteinaza, koja u njihovom prisustvu ostaje uglavnom nepromenjena. Joni  $\text{Cu}^{++}$  inhibiraju aktivnost svih testiranih proteinaza, dok joni  $\text{Zn}^{++}$  ispoljavaju nešto slabiji inhibicioni efekat, pre svega na proteinaze M104, S2007 i S2105. Joni  $\text{Ca}^{++}$  povećavaju aktivnost proteinaznih ekstrakata izolata F22, M104 i u manjoj meri S2007. Prisustvo EGTA i EDTA inhibira aktivnost proteinaza izolata S2007 i S2105, dok EDTA u određenoj meri inhibira i proteinazu izolata F86.

Radi utvrđivanja pripadnosti stafilokoknih proteinaza određenoj klasi, ispitivan je i uticaj specifičnih inhibitora na aktivnost njihovih ekstrakata. Pepstatin i jodoacetat, inhibitori aspartičnih, odnosno cisteinskih proteinaza, ne inhibiraju nijednu od testiranih proteinaza, dok PMSF i 3, 4 dihaloroizokumarin u potpunosti inhibiraju proteolitičku aktivnost izolata F22 i M104, što dokazuje pripadnost njihovih proteinaza serinskoj klasi (Tabela 7). Proteinaze izolata S2007 i S2105 su u značajnoj meri inhibirane 1, 10 fenantrolinom, što, uz njihovu parcijalnu inhibiciju sa EDTA i EGTA sugerise pripadnost ovih enzima klasi metaloproteinaza koje sadrže jon  $Zn^{++}$  u aktivnom centru. Proteinaza izolata F86 u ovom testu nije bila potpuno inhibirana nijednim od testiranih inhibitora.

U eksperimentu sa celim ćelijama ( Slika 11 ), suspenzija ćelija je prethodno inkubirana sa PMSF-om, a posle dodavanja supstrata inkubacija je produžena narednih 20 minuta za izolate F22 i M104, odnosno 10 minuta za izolate F86, S2007 i S2105. Po završenoj digestiji produkti degradacije  $\beta$ -kazeina su analizirani na SDS-PAGE. Kao i sa ekstraktima, i u eksperimentu sa celim ćelijama je potvrđeno da PMSF u potpunosti inhibira proteinaze izolata F22 i M104, a u velikoj meri i F86. Određeni stepen inhibicije se primećuje i kod izolata S2007 i S2105, što je u skladu sa činjenicom da PMSF pored serinskih u određenoj meri inhibira i proteinaze koje pripadaju drugim klasama (Beynon and Bond, 1994).

Tabela 7. Aktivnost proteinaznih ekstrakata u prisustvu jona i inhibitora (100% - aktivnost dijaliziranog ekstrakta bez dodatih jona ili inhibitora)

	F 22	F 86	M 104	S 2007	S 2105
1) Bez jona	100	100	100	100	100
2) $Zn^{++}$	103	83	69	77	67
3) $Ca^{++}$	134	97	123	111	99
4) $Cu^{++}$	21	32	26	45	52
5) $Na^{+}$	104	96	97	107	97
6) $K^{+}$	91	102	105	101	92
7) EDTA	99	88	95	47	52
8) EGTA	102	98	101	66	70
9) PMSF	0	36	4	39	49
10) PEP	98	103	96	94	101
11) IAC	100	92	95	105	99
12) 1,10P	96	94	82	33	37
139 DCI	0	80	0	92	88



Slika 11. Uticaj PMSF-a na aktivnost stafilokoknih proteinaza

S - početni supstrat ( $\beta$ -kazein), 1 - F22, 2 - F86, 3 - M104, 4 - S2007, 5 - S2105.

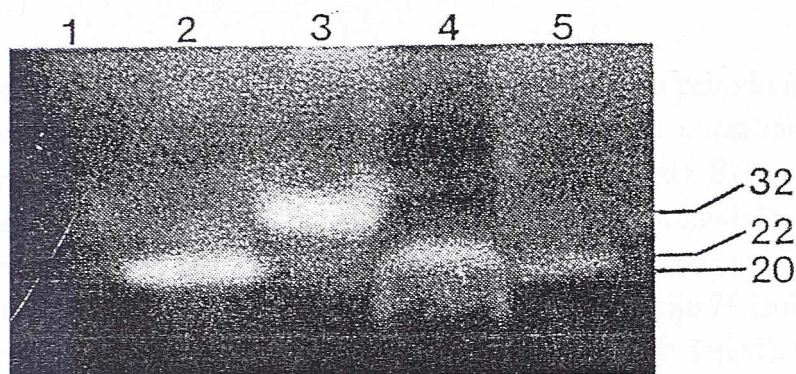
(-) : digestija  $\beta$ -kazeina bez prisustva PMSF-a

(+) : digestija  $\beta$ -kazeina sa dodatkom PMSF-a

(vreme inkubacije: 10 minuta za sojeve F86, S2007 i S2105, 20 minuta za sojeve F22 i M104.)

### 3. 9. Određivanje molekularnih masa stafilokoknih proteinaza

Molekulske mase proteinaza prirodnih izolata stafilokoka određivane su SDS-elektroforezom na nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Ovakvi uslovi elektroforeze omogućavaju očuvanje aktivnosti proteinaza i njihovo detektovanje na gelu po završenoj elektroforezi. Kao supstrat koji je inkorporiran u gel korišćen je totalni kazein. Naneseni uzorci predstavljaju ekstrakte proteinaza dobijene ispiranjem ćelija u fosfatnom puferu. Posle elektroforeze, gel se regeneriše u odgovarajućem puferu a zatim inkubira 4 sata na 30°C. Po završenoj inkubaciji i bojenju gelova, na pozicijama traka koje imaju proteolitičku aktivnost zapažaju se prosvetljenja koja nastaju zbog digestije supstrata. Na slici 12 prikazan je 15%-tni nedenaturišući gel sa uzorcima koji odgovaraju ekstraktima proteinaza stafilokoka. U ekstraktu izolata F22 nije detektovana proteolitički aktivna traka, najverovatnije zbog nedovoljne aktivnosti njegove proteinaze u uslovima nedenaturišućeg gela. U svim ostalim ekstraktima detektovane su jedinstvene trake sa izraženom proteolitičkom aktivnošću, i one odgovaraju ekstracelularnim proteinazama koje ovi izolati sintetišu. Uporedo sa nedenaturišućom puštena je i standardna SDS-PAGE, pri kojoj su pored proteinaznih ekstrakata na gel nanošeni i standardni proteinski uzorci za određivanje molekulske mase nepoznatih uzoraka. Na osnovu pokretljivosti standardnih proteinskih uzoraka konstruisana je standardna kriva pomoću koje su određene molekulske mase stafilokoknih proteinaza. Ove molekulske mase približno iznose 22 kDa za izolate F86 i S2007, 20 kDa za izolat S2105 i 32 kDa za izolat M104. U svakom od uzoraka je detektovana po jedna proteolitički aktivna traka, što ukazuje na činjenicu da ovi izolati stafilokoka sintetišu proteinaze relativno male molekulske mase koje se najverovatnije javljaju samo u jednoj aktivnoj formi.



Slika 12. Nedenaturišući SDS-gel sa uzorcima proteinaznih ekstrakata.

1) F22, 2) F86, 3) M104, 4) S2007, 5) S2105.

Molekulske mase aktivnih traka su izražene u kilodaltonima.

### 3. 10. Distribucija stafilokoknih proteinaza u kulturi

U cilju utvrđivanja ekstracelularnog karaktera proteinaza stafilokoka testirana je proteolitička aktivnost supernatanta kultura izolata F22, F86, M104, S2007 i S2105, kao i aktivnost ćelija preostalih posle centrifugiranja. Posle rasta u kvašćevom dekstroznom bujonu, koncentrovani i dijalizirani supernatanti kultura su inkubirani sa supstratom ( $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazeinom). Analizom na SDS-PAGE utvrđeno je da uzorci supernatanta ovih izolata efikasno hidrolizuju sve tri kazeinske frakcije, dok suspenzije ćelija dobijenih centrifugiranjem kultura ne pokazuju nikakvu proteolitičku aktivnost. Iz ovih rezultata se može zaključiti da navedeni prirodni izolati stafilokoka sintetišu ekstracelularne proteinaze koje se u potpunosti oslobađaju u medijum za rast.

### 3. 11. Hibridizacija totalne DNK stafilokoka sa laktokokalnim proteinaznim probama

Svi proteolitički aktivni sojevi stafilokoka korišćeni u ovom radu (prirodni izolati serije F, serije S i izolat M104) su testirani i u eksperimentima hibridizacije sa probama poreklom iz proteinaznog regiona soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. U hibridizaciji je korišćena totalna DNK sojeva stafilokoka digerirana restrikcijom enzimom *Hind*III i laktokokalne proteinazne probe Q1, Q6 i Q92 koje odgovaraju maturacionom lipoproteinu (produkt *prtM* gena), regionu aktivnog centra proteinaze, odnosno C-terminusu proteinaze. U hibridizaciji vršenoj na 65°C, kao i u manje restriktivnim uslovima hibridizacije (45°C) nisu dobijeni nikakvi hibridizacioni signali. Ovi rezultati ukazuju na nepostojanje homologije proteinaznih gena (ili regiona) stafilokoka sa regionom odgovornim za sintezu laktokokalnih serinskih proteinaza, kao i na njihovu različitu strukturu i organizaciju.

### 3. 12. Utvrđivanje prisustva ekstracelularnih proteinaza kod prirodnih izolata laktobacila

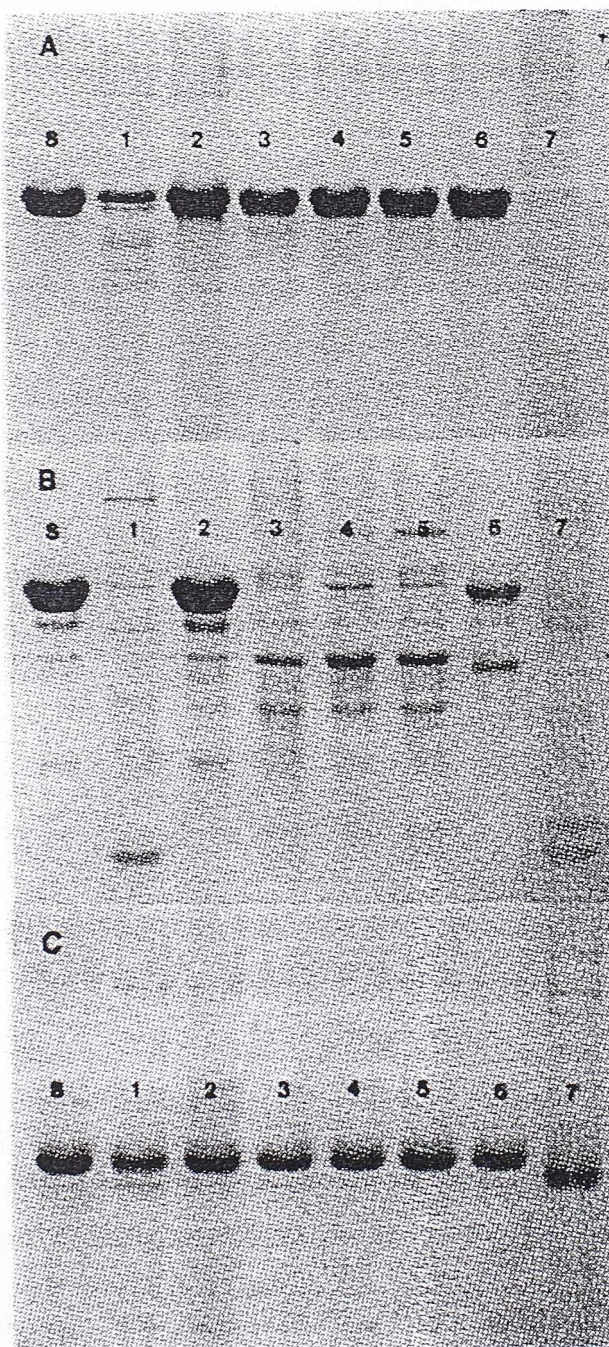
Da bi se utvrdilo prisustvo ekstracelularnih proteinaza u prirodnim izolatima laktobacila formirana je kolekcija prirodnih izolata koji su dobijeni iz različitih izvora (sirevi, kobasice i fermentisano povrće proizvedeno u domaćoj radinosti). Svi ovi izolati potiču sa geografski različitih i relativno izolovanih lokaliteta. Analiza prirodnih izolata laktobacila je pokazala da većina od njih pripada mezofilnim vrstama s obzirom da imaju sposobnost rasta u MRS medijumu na 15°C i 30°C ali ne i na 45°C. Iz ove kolekcije 75 izolata je testirano na prisustvo ekstracelularnih proteinaza vezanih za ćelijski zid (Pr<sup>t+</sup> sojevi). Ovaj test je rađen pomoću hidrolize β-kazeina celim ćelijama prirodnih izolata na 30°C u toku 5 sati, pri čemu je degradacija supstrata uzimana kao dokaz prisustva aktivnih ekstracelularnih proteinaza.

Proteolitička aktivnost je detektovana kod 17 od 75 testiranih izolata. Pored toga, Pr<sup>t+</sup> sojevi bez obzira na poreklo i izvor izolovanja sintetišu proteinaze koje najverovatnije pripadaju serinskoj klasi, s obzirom na to da je njihova proteolitička aktivnost inhibirana fenilmetisulfonil fluoridom (PMSF). Kod svih proteolitički aktivnih sojeva je takođe testirana sposobnost hidrolize ostale dve kazeinske frakcije, α<sub>S1</sub>- i κ-kazeina. Za dalju analizu odabrani su sojevi *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* HN14, BGLI17 i BGLI18, *Lactobacillus divergens* BG742 i *Lactobacillus rhamnosus* BGEN1.

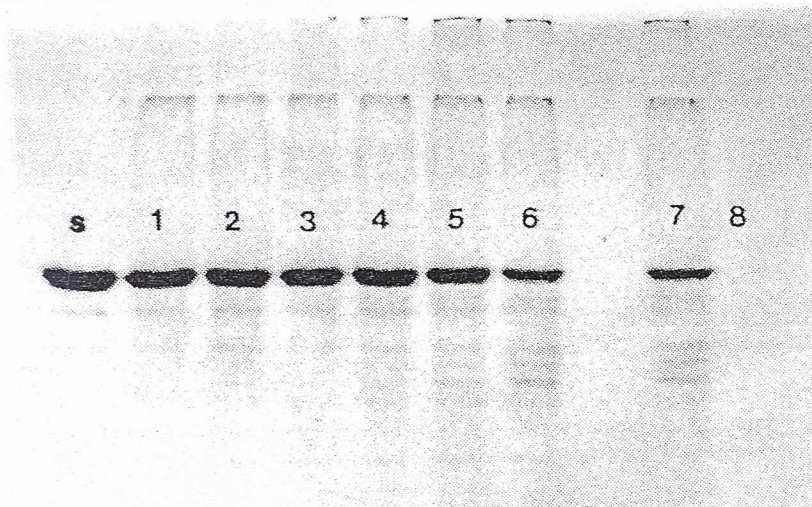
#### 3.12.1. Proteolitička aktivnost laktobacila

Proteolitička aktivnost celih ćelija prirodnih izolata mezofilnih laktobacila je testirana u odnosu na glavne kazeinske frakcije. Cele ćelije odabranih izolata laktobacila su resuspendovane u fosfatnom puferu pH 7,2 i pomešane sa odgovarajućim supstratom, a po završenoj digestiji produkti degradacije supstrata analizirani su na SDS PAGE (Slika 13). Najviši nivo proteolitičke aktivnosti pokazuju ćelije soja *Lactobacillus divergens* BG742, koje pored potpune degradacije β-kazeina hidrolizuju i α<sub>S1</sub>- i κ-kazein (Slika 13, uzorak 7.).

Aktivnost proteinaznog ekstrakta *L. divergens* BG742 tokom hidrolize β-kazeina je prikazana na slici 14. Generalno posmatrano, nivo degradacije supstrata je znatno niži u prisustvu proteinaznog ekstrakta u odnosu na cele ćelije resuspendovane u fosfatnom puferu (Slika 14, uzorak 6 i 8). S druge strane, odvajanje proteinaze sa ćelijskog zida kao i njena aktivnost po svemu sudeći ne zavise od prisustva jona kalcijuma. Utvrđeno je da proteinazni ekstrakt pripremljen u 50 mM Tris-HCl puferu pH 7,2 sa ili bez 25 mM CaCl<sub>2</sub> pokazuje isti nivo aktivnosti kao ekstrakt pripremljen u fosfatnom puferu (Slika 14, uzorak 6 i 7).



Slika 13. Hidroliza kazeinskih frakcija celim ćelijama prirodnih izolata laktobacila  
 A).  $\alpha_1$ -kazein, B)  $\beta$ -kazein, C)  $\kappa$ -kazein. Digestija supstrata je rađena 5 sati na 30°C. S - početni supstrat, 1- *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* NCD0712, 2- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363, 3- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* HN14, 4- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGLi17, 5- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGLi18, 6- *Lactobacillus rhamnosus* BGEN1, 7- *Lactobacillus divergens* BG742.



Slika 14. Kinetika degradacije  $\beta$ -kazeina proteinaznim ekstraktom soja *Lactobacillus divergens* BG742.

S- početni supstrat; 1 do 6 - nivo degradacije  $\beta$ -kazeina u uzorcima uzimanim iz reakcione smese posle 15, 30, 60, 120, 180 i 240 minuta, sa ekstraktom pripremljenim u fosfatnom puferu pH7,2, 7- degradacija  $\beta$ -kazeina sa ekstraktom pripremljenim u Tris- $\text{Ca}^{++}$  puferu posle 240 minuta, 8- degradacija  $\beta$ -kazeina celim ćelijama resuspendovanim u fosfatnom puferu pH 7,2 posle 240 min. Sve digestije su rađene na 30°C.

Dva soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGLi17 i BGLi18, kao i *Lactobacillus rhamnosus* BGEN1, ispoljavaju proteolitičku aktivnost koja je specifična isključivo za  $\beta$ -kazein, s obzirom da nijedan od ovih sojeva ne sintetiše proteinaze koje mogu da kao supstrat koriste  $\alpha_{S1}$ - ili  $\kappa$ -kazein (Slika 13, uzorci od 4 do 6). Proteinaza soja BGEN1 istovremeno pokazuje najniži nivo proteolitičke aktivnosti u odnosu na  $\beta$ -kazein. Pored toga, nijedna od proteinaza iz ova tri soja ne hidrolizuje  $\alpha_{S1}$ - ni  $\kappa$ -kazein u digestijama u kojima je odnos ćelija i supstrata u reakcionoj smesi udvostručen.

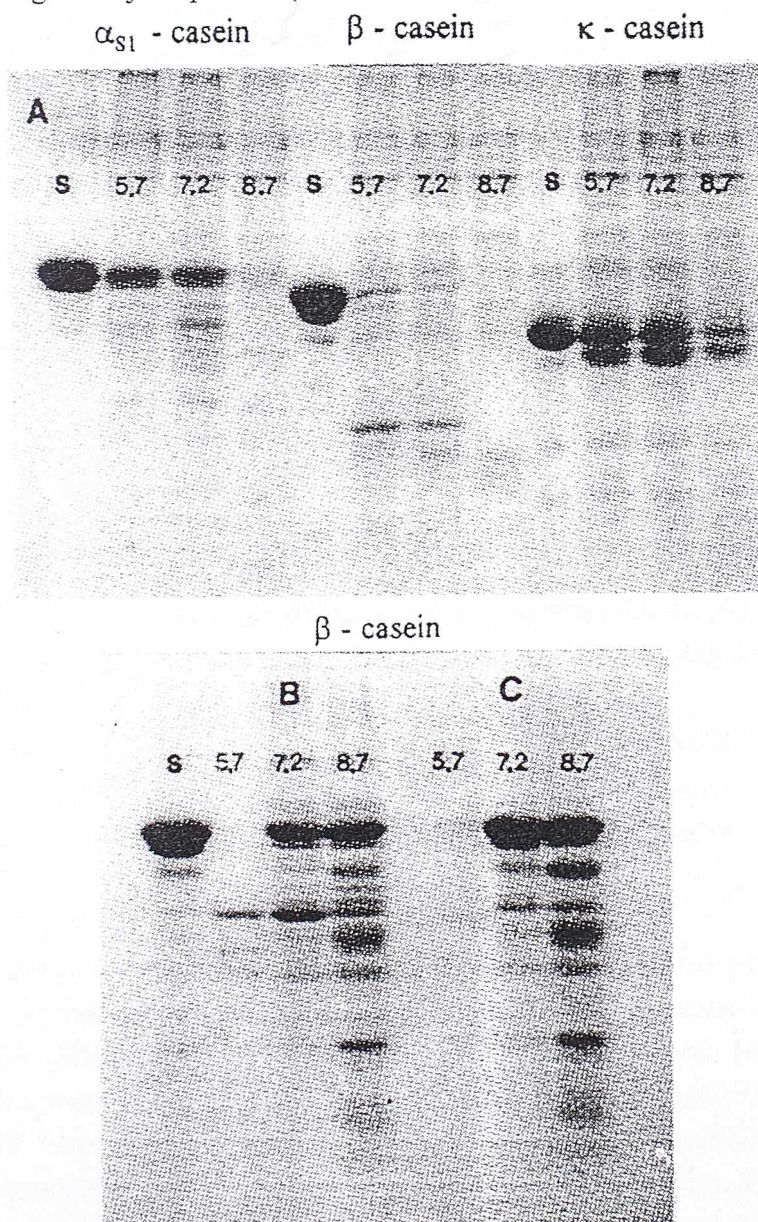
Aktivan proteinazni ekstrakt sojeva BGLi17 i BGLi18 se može dobiti pranjem njihovih ćelija u fosfatnom puferu pH 7,2 bez prisustva  $\text{Ca}^{++}$  jona. Proteinazni ekstrakti, kao i cele ćelije, hidrolizuju samo  $\beta$ -kazein, dok degradacija  $\alpha_{S1}$ - i  $\kappa$ -kazeina nije detektovana ni u slučaju povećanog odnosa ekstrakta prema supstratu u reakcionoj smesi (1:1 ili 2:1). Što se tiče soja BGEN1, njegov aktivan proteinazni ekstrakt nije bilo moguće dobiti ovom tehnikom.

Produkti degradacije  $\beta$ -kazeina se kod testiranih sojeva u znatnoj meri razlikuju. Proteinaze sojeva BGEN1 i BG742 daju međusobno različite produkte degradacije  $\beta$ -kazeina, ali se oba ova soja istovremeno razlikuju od sojeva BGLi17, BGLi18 i HN14 (Slika 13). Poslednja tri navedena soja pokazuju istu supstratnu specifičnost prema kazeinskim frakcijama, što ukazuje na činjenicu da sintetišu proteinaze istog tipa. Pošto testirani prirodni izolati pripadaju vrstama *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, u ovom slučaju se može zaključiti da svaka od ovih vrsta sintetiše proteinaze različitog tipa.



## 3.12.2. Određivanje opsega pH vrednosti za proteolitičku aktivnost

Hidroliza  $\beta$ -kazeina celim ćelijama sojeva BGLi18, BG742 i BGEN1 je rađena i na pH vrednostima od 5,7, 7,2 i 8,7. Ovi rezultati pokazuju da se pH optimumi proteinaza testiranih sojeva razlikuju ( Slika 15 ). Proteinaze sojeva *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGLi18 i *Lactobacillus rhamnosus* BGEN1 najefikasnije hidrolizuju  $\beta$ -kazein na pH 5,7, dok proteinaza *Lactobacillus divergens* BG742 najvišu aktivnost ispoljava na pH 8,7. Na ovoj pH vrednosti proteinaza soja BG742 znatno efikasnije hidrolizuje i ostale dve kazeinske frakcije, što naročito dolazi do izražaja u slučaju  $\alpha_{S1}$ -kazeina (Slika 15). Proteinaza soja BGLi17 pokazuje, kao i ona iz BGLi18, najefikasniju hidrolizu  $\beta$ -kazeina na pH 5,7 uz skoro identičan stepen degradacije supstrata (rezultati nisu prikazani).

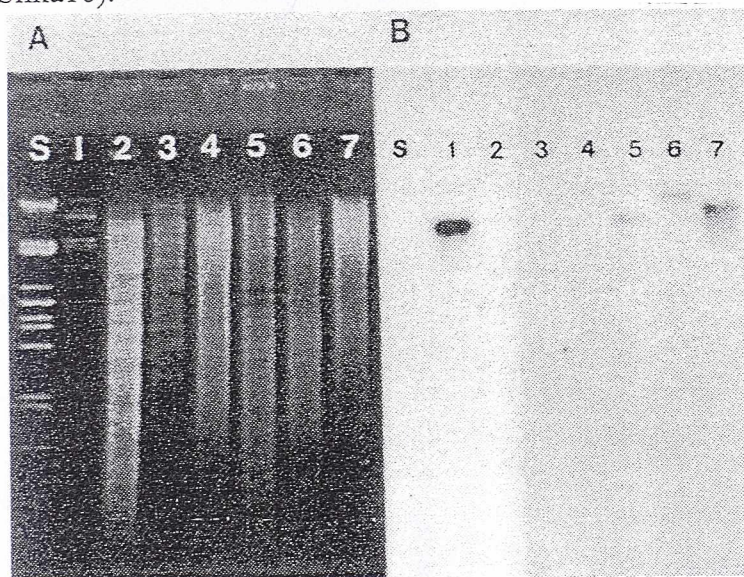


Slika 15. Hidroliza kazeina celim ćelijama *Lactobacillus divergens* BG742 (A), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGLi18 (B) i *Lactobacillus rhamnosus* BGEN1 (C) na različitim pH vrednostima ( 5,7, 7,2 i 8,7 ).

S - početni supstrat. Digestije kazeina su rađene na 30°C u trajanju od 90 minuta za soj BG742 i 30 minuta za sojeve BGLi18 i BGEN1.

### 3.12.3. Hibridizacioni eksperimenti i konstrukcija restrikcionih mapa proteinaznih regiona

U eksperimentima hibridizacije korišćena je totalna DNK izolovana iz sojeva BGLi17, BGLi18, BGEN1 i BG742. Pored ovih uzoraka, u hibridizaciji su korišćeni i plazmidi proteinaza-pozitivnog kontrolnog soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO712, kao i totalna DNK izolovana iz proteinaza-negativnog soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363 i iz ranije opisanog soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* HN14 ( Kojić et al., 1991 ). Svi uzorci su digerirani restrikcionim enzimom *Hind*III i hibridizovani sa probama iz proteinaznog regiona soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Hibridizacija je rađena na 68°C (Slika16).



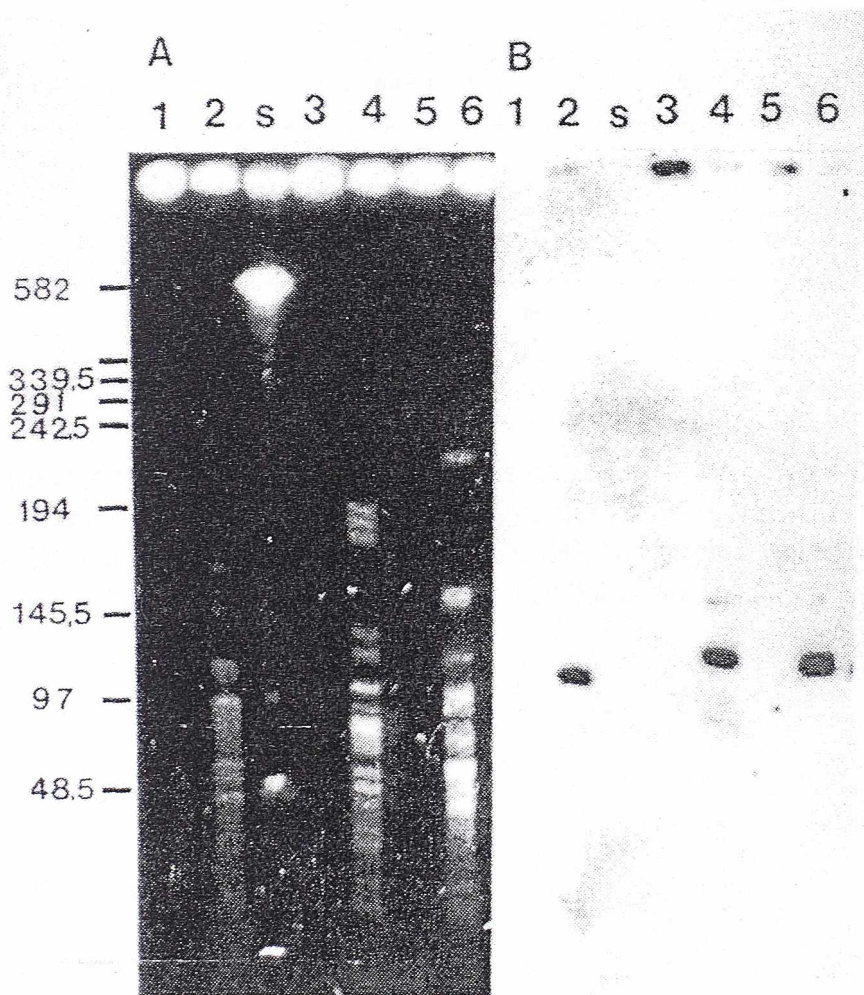
Slika 16. “ Southern” hibridizacija *Hind*III-digeriranih uzoraka DNK (A) sa laktokokalnom proteinaznom probom Q6 na 68°C (B). Identični signali su dobijeni i u hibridizaciji sa probama Q6 i Q92.

S -  $\lambda$ DNK/ *Pst*I standard, 1- plazmidna DNK iz *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO712, 2-7, totalna DNK iz sledećih sojeva: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363, *Lactobacillus rhamnosus* BGEN1, *Lactobacillus divergens* BG742, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* HN14, BGLi17 i BGLi18.

U hibridizaciji totalne DNK sa laktokokalnim proteinaznim probama signali su detektovani kod uzoraka izolovanih iz sojeva *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGLi17 i BGLi18 (Slika 16B, uzorci 6 i 7). U odnosu na kontrolne sojeve NCDO712 i HN14, *Hind*III fragmenti koji hibridizuju sa laktokokalnim probama su veći kod sojeva BGLi17 i BGLi18. Uzorci totalne DNK izolovane iz sojeva *Lactobacillus divergens* BG742 i *Lactobacillus rhamnosus* BGEN1 nisu dali signale u hibridizaciji ni sa jednom od proba iz proteinaznog regiona laktokoka (Slika 16B, uzorci 3 i 4), čak ni pod manje restriktivnim uslovima hibridizacije (45°C).

Da bi se utvrdila preliminarna lokalizacija proteinaznih gena sojeva BGLi17 i BGLi18, njihove plazmidne i hromozomalne DNK su razdvojene centrifugiranjem u gradijentu cezijum hlorida i hibridizovane sa laktokokalnim proteinaznim probama. Tom prilikom su kod oba soja signali u hibridizaciji dobijeni samo sa hromozomalnom DNK. Pored toga,

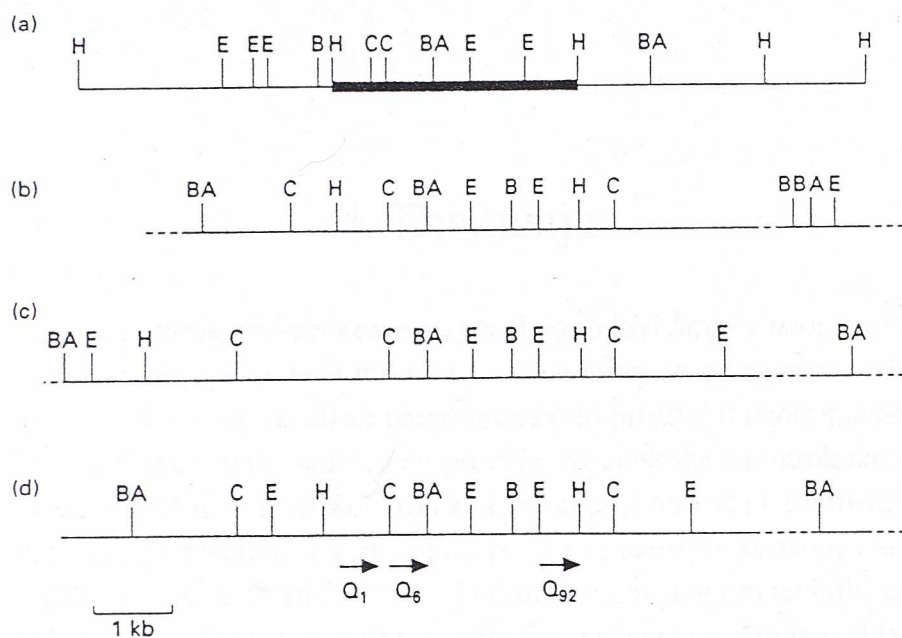
u cilju utvrđivanja lokacije proteinaznih gena ovih sojeva korišćena je i elektroforeza u pulzirajućem polju (PFGE). Ovi rezultati su pokazali da genomska DNK sojeva BGLi17 i BGLi18 sečena restrikcijom enzimom *NotI* hibridizuje sa laktokokalnim proteinaznim probama (Slika 17). Veličine DNK fragmenata koji hibridizuju iznose približno 120 kb za soj BGLi17, 115 kb za soj BGLi18 i 110 kb za ranije okarakterisani soj HN14 (Kojić et al., 1995).



Slika 17. PFGE genomske DNK iz sojeva *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* posle digestije sa *NotI* (A) i hibridizacija sa laktokokalnim proteinaznim probom Q6 (B).

S- konkatemeri  $\lambda$ faga, 1 i 2, soj HN14; 3 i 4, soj BGLi17; 5 i 6, soj BGLi18. 1, 3 i 5 su uzorci nedigerirane genomske DNK.

Na osnovu eksperimenata u kojima je totalna DNK prirodnih izolata laktobacila sečena različitim restrikcijom enzimima a zatim hibridizovana sa laktokokalnim proteinaznim probama konstruisane su preliminarne restrikcione mape proteinaznih regiona sojeva *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Slika 18). Na nivou restrikcijom mape ovi regioni pokazuju visoku homologiju, kako međusobno tako i sa odgovarajućim regionima laktokoka.



Slika 18. Restriktivne mape proteinaznih regiona soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2 (a) i sojeva *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* HN14 (b), BGLi17 (c) i BGLi18 (d). H- *Hind*III, E- *Eco*RI, B- *Bgl*II, C- *Cla*I, BA- *Bam*HI. Deblja linija u restriktivnoj mapi soja Wg2 označava njegov proteinazni region koji je kloniran i sekvenciran (Kok and Venema, 1988).

## 4. Diskusija

Bakterije iz familije *Micrococcaceae*, posebno rodovi *Staphylococcus* i *Micrococcus*, predstavljaju veoma rasprostranjene mikroorganizme čijim se primarnim staništem smatra površina kože i sluzokože sisara, ali su pored toga često prisutni u uzorcima zemljišta, vode i vazduha, kao i u namirnicama animalnog porekla. Stafilokoke i mikrokoke, između ostalog, ulaze u sastav normalne mikroflore mleka i mlečnih proizvoda (Bautista et al., 1986). Prirodni izolati koji su testirani u ovom radu potiču iz uzoraka sirovog, pasterizovanog i UHT mleka, kao i iz stočne hrane i silaže. Preliminarnom determinacijom utvrđeno je da velika većina izolata (171 od 190) pripada rodu *Staphylococcus*, što je u skladu sa podacima iz literature prema kojima je, u okviru familije *Micrococcaceae*, ovaj rod najzastupljeniji (Kloos and Schleifer, 1986). Izolati okarakterisani kao predstavnici roda *Micrococcus* su se u analiziranim uzorcima javljali daleko ređe, i pri tome nijedan od njih nije ispoljavao proteolitičku aktivnost.

Kolekcija prirodnih izolata stafilokoka je formirana u cilju pronalaženja što većeg broja proteolitički aktivnih sojeva, s tim što se pod proteolitičkom aktivnošću podrazumevala njihova sposobnost da sintetišu ekstracelularne proteinaze. Prisustvo ekstracelularnih proteinaza je u ovom slučaju detektovano praćenjem proteolitičkih promena u mleku, nastalih pod delovanjem dodatih tečnih kultura prirodnih izolata stafilokoka. Za dalju analizu je odabran određen broj proteolitički aktivnih izolata, u prvom redu onih čije kulture izazivaju koagulaciju himozinskog tipa i koji proteolitičke promene u mleku prouzrokuju u najkraćem vremenu (Tabela 3). U koaguliranim uzorcima mleka su određene pH vrednosti koje se u slučaju testiranih izolata kreću od 5,49 do 6,37. S obzirom da se izoelektrična tačka kazeina na kojoj dolazi do koagulacije mleka nalazi na pH 4,6, očigledno je da kulture stafilokoka izazivaju koagulaciju svojim proteolitičkim delovanjem.

Kazein inače predstavlja najzastupljeniji protein mleka i obuhvata oko 80% njegovog ukupnog proteinskog sadržaja. Kazein se u mleku nalazi u obliku micela, sferičnih agregata čiji se prečnik kreće od 40 do 300 nm. Kazeinske micidele sadrže četiri tipa kazeinskih frakcija, koji su prisutni u molarnom odnosu  $\alpha_{S1} : \alpha_{S2} : (\beta + \gamma) : \kappa = 4 : 1 : 4 : 1,3$ . Pored toga, micidele sadrže i 7% neorganskih komponenata, pre svega jone kalcijuma i fosfata, kao i znatnu količinu vode, odnosno rastvora koji po sastavu odgovara mlečnom serumu (Walstra, 1990). Analizom strukture kazeinskih micela utvrđeno je da se one sastoje od submicela čiji se prečnik kreće od 10 do 15 nm i koje uglavnom sadrže između 15 i 25 molekula kazeina (Stothart and Cebula, 1982, Pessen et al., 1989). Submicidele su međusobno povezane hidrofobnim i elektrostatičkim interakcijama (Schmidt, 1982), a u odnosu na svoj sastav dele se na dva osnovna tipa, odnosno na one koje sadrže i one koje ne sadrže  $\kappa$ -kazein. Submicidele koje sadrže  $\kappa$ -kazein se uglavnom nalaze na površini kazeinskih micela, pri čemu su hidrofilni C-terminalni krajevi molekula  $\kappa$ -kazeina okrenuti prema spoljašnjosti. Na taj način, hidrofilni krajevi molekula  $\kappa$ -kazeina stabilizuju strukturu micela i

sprečavaju njihovu agregaciju. Ukoliko pod delovanjem proteolitičkih enzima dođe do hidrolize  $\kappa$ -kazeina, istovremeno dolazi i do destabilizacije strukture micela koje počinju da formiraju veće agregate, što na kraju dovodi do koagulacije mleka. Ovaj proces proteolitičke koagulacije mleka predstavlja prvi korak u tehnološkom procesu proizvodnje sireva. U tu svrhu se koriste komercijalni preparati sirila koji kao aktivnu komponentu sadrže himozin, proteolitički enzim koji pripada klasi aspartičnih proteinaza. Himozin se sintetise u određenom delu želuca preživara u fazi mlečne ishrane, a u svom delovanju na molekule kazeina ispoljava visoku specifičnost na taj način što preferencijalno hidrolizuje peptidnu vezu Phe105 – Met106 u molekulu  $\kappa$ -kazeina (Green, 1977). Tom prilikom dolazi do odvajanja hidrofilnog C-terminalnog dela  $\kappa$ -kazeina (tzv. glikomakropeptid, koji obuhvata fragment od 106. do 169. aminokiseline u molekulu) i, u prisustvu jona  $\text{Ca}^{++}$ , do otpočinjanja procesa koagulacije mleka na već opisan način. Drugi deo  $\kappa$ -kazeina, para- $\kappa$ -kazein (ostatak molekula, od 1. do 105. aminokiseline) ostaje u strukturi kazeinskih micela (Shammet et al., 1992).

Pored himozina, i druge proteinaze različitog porekla dovode do sličnog efekta u mleku, pri čemu po pravilu ispoljavaju veću nespecifičnu proteolitičku aktivnost u odnosu na sposobnost koagulacije. Enzimi koje sintetise gljive *Mucor miehei* i *Cryphonectria parasitica* (ranije *Endothia parasitica*) spadaju, kao i himozin, u klasu aspartičnih proteinaza i takođe se koriste kao komercijalna sirila. Ispitivanjem delovanja ova dva enzima na  $\kappa$ -kazein utvrđeno je da oni vrše hidrolizu peptidnih veza u supstratu na više različitih mesta. Prilikom digestije  $\kappa$ -kazeina himozinom u trajanju od 60 minuta sa različitim koncentracijama enzima, u produktima reakcije su detektovana samo dva fragmenta, iz čega se zaključuje da je himozin specifično hidrolizovao samo peptidnu vezu Phe105 – Met106. U istim uslovima reakcije, proteinaza *Cryphonectria parasitica* je oslobađala tri, a proteinaza *Mucor miehei* čak sedam fragmenata  $\kappa$ -kazeina. Pored toga, enzim iz *Mucor miehei* je ispoljavao i slabiju sposobnost koagulacije uz sporije formiranje gruš. Ovo se objašnjava time što enzim, pored odvajanja hidrofilnog C-terminalnog dela, hidrolizuje i para- $\kappa$ -kazein, hidrofobni deo molekula  $\kappa$ -kazeina. Para- $\kappa$ -kazein svojim prisustvom u strukturi micela ubrzava njihovu agregaciju zahvaljujući hidrofobnim interakcijama, dok u njegovom odsustvu dolazi do međusobnog odbijanja negativno naelektrisanih molekula  $\alpha_S$ - i  $\beta$ -kazeina, što usporava koagulaciju (Shammet et al., 1992).

Što se tiče bakterijskih proteinaza, one su u proizvodnji sireva korišćene u manjem broju slučajeva, i to isključivo eksperimentalno. Pored proteinaza poreklom iz roda *Bacillus* koje su korišćene za koagulaciju mleka (Kikuchi and Toyoda, 1969, Mašek et al., 1970), nema značajnijih podataka o primeni bakterijskih proteinaza u procesu proizvodnje sireva. Svi ovi eksperimenti sa proteinazama različitog porekla su inače rađeni da bi se, s obzirom na relativno ograničene količine himozina, pronašli enzimi koji bi bili adekvatna zamena i koji bi mogli da se komercijalno proizvode. Svi enzimi koji se trenutno koriste kao aktivna komponenta sirila pripadaju, kao i himozin, kiselim proteinazama aspartičnog tipa.

Izolat *Staphylococcus* sp. M104 je, kao što je navedeno u uvodnom delu ovog rada, svojevremeno sa uspehom korišćen kao komponenta starter kultura za izradu sireva. U kombinaciji sa laktokokama ovaj izolat je svojom proteolitičkom aktivnošću povećavao koncentraciju slobodnih aminokiselina u mleku i na taj način omogućavao njihov brži rast (Stević et al., 1973), pri čemu je u eksperimentalnoj proizvodnji sira dobijen proizvod zadovoljava-

jućeg kvaliteta uz skraćen period zrenja. Pored toga, utvrđeno je da M104 sintetiše ekstracelularnu proteinazu koja se oslobađa u medijum za rast i koja izaziva koagulaciju mleka himozinskog tipa. Pored detaljnije karakterizacije proteinaze izolata M104, cilj ovog rada je bilo formiranje veće kolekcije prirodnih izolata stafilokoka i identifikacija onih koji ispoljavaju ekstracelularnu aktivnost. Određen broj ovih izolata je odabran za dalju analizu, pri čemu se početni deo rada odnosio na utvrđivanje mogućnosti korišćenja stafilokoknih proteinaza kao zamene za sirilo. Preliminarno testiranje prirodnih izolata je već na početku rada pokazalo da proteinaze stafilokoka imaju veoma visoku i nespecifičnu proteolitičku aktivnost i da zbog toga ovi enzimi ne bi mogli da posluže kao adekvatna zamena za himozin. Elektroforetska analiza uzoraka mleka koaguliranog proteinazama stafilokoka (Slika 2) i denzitometrijsko određivanje odnosa kazeinskih frakcija posle koagulacije (Slika 3 i Tabela 4) pokazali su da ovi enzimi, pored  $\kappa$ -kazeina, u velikoj meri degradiraju i  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ -kazein. U odnosu na komercijalni preparat telećeg sirila koji u prvoj fazi koagulacije hidrolizuje isključivo  $\kappa$ -kazein, proteinaze stafilokoka dovode do značajnog stepena hidrolize glavnih kazeinskih frakcija uz visoke vrednosti koncentracije neproteinskog azota (Tabela 4). Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da prirodni izolati stafilokoka ne bi mogli da posluže kao izvor za dobijanje sirila mikrobijalnog porekla, što je u skladu sa ranije rađenim eksperimentima u kojima su bakterijske proteinaze korišćene u istu svrhu (Kikuchi and Toyoda, 1969; Mašek et al., 1970; Green, 1977). U svim ovim pokušajima, bakterijske proteinaze, uglavnom iz roda *Bacillus*, ispoljavale su previsoku i nedovoljno specifičnu proteolitičku aktivnost, što je dovodilo do znatnih gubitaka u eksperimentalnoj proizvodnji sireva.

Za detaljniju analizu su pored izolata M104 odabrani prirodni izolati F22 (izolovan iz sirovog mleka), F86 (izolovan iz UHT mleka) i izolati S2007 i S2105 (izolovani iz uzoraka silaže). Svi ovi izolati sintetišu ekstracelularne proteinaze koje se oslobađaju u medijum za rast i koje se mogu izolovati iz supernatanta tečnih kultura, što je istovremeno karakteristika sojeva kao što su *Micrococcus freudenreichii* ATCC407 (Mc Donald and Chambers, 1966), *Micrococcus caseolyticus* M96 (Desmazeaud and Hermier, 1968) i *Micrococcus* sp. MCC-135 (Prasad et al., 1986).

Prilikom testiranja supstratne specifičnosti utvrđeno je da proteinaze svih pet sojeva hidrolizuju kazein, kako njegove pojedinačne frakcije (Slika 4), tako i totalni kazein koji se nalazi u sastavu podloge za identifikaciju proteolitički aktivnih sojeva (Slika 5). Pored kazeinskih frakcija, izolati F86, S2007 i S2105 hidrolizuju i želatin i BSA (Slika 6), što ukazuje na njihovu nespecifičnost i eliminiše ih kao moguće kandidate za proizvodnju sirila mikrobijalnog porekla. Za razliku od ova tri izolata, proteinaza *Staphylococcus* sp. M104 hidrolizuje samo BSA, dok proteinaza izolata F22 ne pokazuje sposobnost hidrolize heterologih proteinskih supstrata i specifično hidrolizuje samo kazeinske frakcije.

Pored supstratne specifičnosti, određene su i optimalne vrednosti pH i temperature za aktivnost ovih enzima. U odnosu na temperaturne optimume, testirani izolati pokazuju međusobnu sličnost utoliko što najefikasnije hidrolizuju supstrat na 37°C, sa izuzetkom proteinaze izolata F22 čija optimalna temperatura iznosi 30°C. Veća raznolikost se kod stafilokoknih proteinaza primećuje u optimalnim vrednostima pH, što je u skladu sa podacima koji se odnose na ranije testirane proteolitički aktivne sojeve. U tom pogledu, proteinaza izolata M104 bi, kao i ona iz *Micrococcus freudenreichii* ATCC407 (Mc Donald and

Chambers, 1966 ), spadala u kisele proteinaze, proteinaze izolata F22 i F86 u neutralne, a proteinaze izolata S2007 i S2105 u bazne proteinaze, kao i enzim koji sintetiše soj *Micrococcus* sp. MCC-135 ( Prasad et al., 1986).

Testiranje uticaja jona i inhibitora na aktivnost proteinaza stafilokoka je pre svega imalo za cilj da odredi njihovu pripadnost odgovarajućim klasama ( Tabela 7 ). U eksperimentu u kojem su korišćeni proteinazni ekstrakti utvrđeno je da ni na jedan enzim ne deluju pepstatin i jodoacetat, inhibitori aspartičnih odnosno cisteinskih proteinaza, što eliminiše mogućnost da testirane proteinaze pripadaju jednoj od ove dve klase. Aktivnost proteinaza izolata F22 i M104 je u potpunosti inhibirana u prisustvu PMSF i 3,4 dihaloroizokumarina, što potvrđuje njihovu pripadnost serinskoj klasi. Proteinaze izolata S2007 i S2105 su inhibirane u prisustvu EDTA, EGTA i 1,10 fenantrolina, na osnovu čega se može zaključiti da oba ova enzima spadaju u metaloproteinaze sa atomom cinka u aktivnom centru. U odnosu na neke svoje osobine ( pH optimum, pripadnost klasi metaloproteinaza ) ovi enzimi su donekle slični proteinazi iz soja *Micrococcus* sp. MCC-135 ( Prasad et al., 1986 ). Proteinaza izolata F86 nije signifikantno inhibirana nijednim od specifičnih inhibitora, tako da se o njenoj pripadnosti nekoj od klasa ne može reći ništa pouzdano. Ona bi mogla da bude slična proteinazi V8 iz *Staphylococcus aureus*, koja pripada serinskoj klasi ali nije inhibirana nijednim od poznatih inhibitora, izuzev  $\alpha$  makroglobulinom, humanim serumskim proteinom koji vezuje enzim za sebe, ali ga ni on ne inaktivira ( Beynon and Bond, 1994 ). Što se tiče uticaja jona na aktivnost proteinaznih ekstrakata, joni  $\text{Cu}^{++}$  u značajnoj meri inhibiraju aktivnost svih pet testiranih enzima, dok joni  $\text{Ca}^{++}$  u određenoj meri stimulišu aktivnost proteinaza koje sintetišu izolati F22 i M104.

Molekulske mase proteinaza stafilokoka se kreću u opsegu od 20 do 32 kDa (Slika 12). Ovi podaci, dobijeni elektroforezom na nenedenaturišućem gelu, su u skladu sa molekulskim masama prethodno okarakterisanih proteinaza ( *Micrococcus caseolyticus* M96 -38 kDa, *Micrococcus* sp. MCC-135 - 28,9 kDa ) što ukazuje na činjenicu da se kod ekstracelularnih proteinaza stafilokoka generalno radi o manjim molekulima, pogotovu u odnosu na proteinaze laktokoka i laktobacila.

Na osnovu utvrđenih biohemijskih osobina proteinaza ovih izolata, izvesno je da oni ne bi mogli da budu iskorišćeni kao proizvođači zamene za sirilo, ali kao mogućnost ostaje njihovo korišćenje kao startera u cilju ubrzavanja zrenja sireva, kao i analiza proteinaza stafilokoka na genetičkom nivou.

Pored stafilokoka, u ovom radu je testiran i određen broj prirodnih izolata laktobacila koji pripadaju mezofilnim vrstama. Pošto su laktobacili, kao i druge bakterije mlečne kiseline, auksotrofi za veliki broj aminokiselina, izolovanje sojeva koji sintetišu ekstracelularne proteinaze je od velikog značaja, kako zbog upoznavanja njihovog proteolitičkog sistema, tako i zbog moguće industrijske primene ovih sojeva.

Ekstracelularne proteinaze bakterija mlečne kiseline koje su do sada proučene pripadaju serinskoj klasi proteinaza, sa izuzetkom proteinaze koju sintetiše *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ397. Aktivnost ovog enzima se smanjuje jedino u prisustvu specifičnih inhibitora cisteinskih proteinaza, na osnovu čega se može zaključiti da on pripada toj klasi ( Laloj et al., 1991 ). U kolekciji prirodnih izolata laktobacila analiziranih u ovom radu, svi proteolitički aktivni sojevi najverovatnije sintetišu proteinaze serinske klase, s obzirom na to da PMSF u potpunosti inhibira njihovu aktivnost.



Za razliku od ekstracelularnih proteinaza drugih bakterija koje se oslobađaju u medijumu za rast, zajednička osobina proteinaza laktokoka i laktobacila je i to da su vezane za ćelijski omotač. Kod laktokoka, joni  $\text{Ca}^{++}$  imaju značajnu ulogu u stabilizovanju aktivne forme enzima; u njihovom odsustvu dolazi do odvajanja proteinaze sa površine ćelije autodigestijom na C- terminusu, dok povećana koncentracija dovodi do smanjenja enzimske aktivnosti (Pritchard and Coolbear, 1993). Sličan efekat  $\text{Ca}^{++}$  jona je primećen i kod laktobacila (Zevaco and Gripon, 1988), uključujući i sojeve *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* koji su korišćeni u ovom radu. Proteinaze prirodnih izolata BGLi17 i BGLi18, kao i ranije opisanog soja HN14 ( Kojić et al., 1991 ), oslobađaju se sa ćelijskog zida tokom ispiranja u puferu bez kalcijuma. Proteinaza soja *Lactobacillus divergens* BG742 se sa površine ćelije odvaja nezavisno od prisustva  $\text{Ca}^{++}$  jona, dok u slučaju *Lactobacillus rhamnosus* BGEN1 na ovaj način nije bilo moguće dobiti aktivan proteinazni ekstrakt.

Osobine koje izdvajaju proteinazu soja BG742 od ostalih su, pored  $\text{Ca}^{++}$  - nezavisnog oslobađanja, njena specifičnost prema supstratu i pH optimum. U kolekciji od 75 testiranih prirodnih izolata mezofilnih laktobacila, *Lactobacillus divergens* BG742 jedini sintetizuje proteinazu koja hidrolizuje sve tri kazeinske frakcije. U tom pogledu ovaj enzim u određenoj meri pokazuje sličnost sa laktokokalnim proteinazama PIII tipa (Pritchard and Coolbear, 1993 ), ali se razlikuje od njih u odnosu na produkte degradacije koje formira tokom hidrolize kazeina (Slika 13). Pored toga, proteinaza soja BG742 najefikasnije hidrolizuje kazeinske frakcije na baznoj pH vrednosti ( Slika 15a), što je jedinstven slučaj među svim do sada opisanim proteinazama bakterija mlečne kiseline.

U hibridizacionim eksperimentima, signali sa laktokokalnim proteinaznim probama su dobijeni sa totalnom DNK izolovanom iz sojeva *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGLi17 i BGLi18 ( Slika 16 ). Ovi rezultati su ukazivali na postojanje sličnosti u strukturi proteinaznih regiona laktokoka i laktobacila koji pripadaju vrsti *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, što je ranije i dokazano analizom restrikcionih mapa proteinaznih regiona sojeva HN14 i NCD0151 ( Kojić et al., 1991; Holck and Nes, 1992 ). Na osnovu rezultata iznetih u ovom radu, to se takođe odnosi i na proteinazne regione sojeva BGLi17 i BGLi18 ( Slika 18). Proteinazni regioni laktokoka i navedenih sojeva laktobacila pokazuju veoma visoku međusobnu strukturnu homologiju, što može da ukazuje na identičan mehanizam aktivacije i obrade enzima ( Laan and Konings, 1989; Haandrikman et al., 1991 ) kao i na njihovo zajedničko poreklo. Ovi rezultati su posebno interesantni zbog toga što se u slučaju laktokoka radi o sojevima koji su poreklom uglavnom iz zapadne Evrope i koji se već decenijama nalaze u laboratorijskim kolekcijama ili u industrijskoj upotrebi, dok prirodni izolati laktobacila opisani u ovom radu potiču sa ograničenih i geografski izolovanih lokaliteta bivše i sadašnje Jugoslavije.

S druge strane, totalna DNK izolovana iz sojeva *Lactobacillus divergens* BG742 i *Lactobacillus rhamnosus* BGEN1 ne hibridizuje sa laktokokalnim proteinaznim probama čak ni u manje restriktivnim uslovima hibridizacije ( 45°C ). Ova dva soja sintetizuju proteinaze koje se od ostalih razlikuju i u preliminarno utvrđenim biohemijskim osobinama. Proteinaza soja BG742 ima različitu specifičnost prema kazeinskim frakcijama, različit pH optimum kao i  $\text{Ca}^{++}$  - nezavisnu aktivnost. Proteinaza soja BGEN1 ispoljava, kao drugi testirani sojevi laktobacila, specifičnost prema  $\beta$ -kazeinu kao supstratu, ali tokom digestije formira drugačije degradacione produkte ( Slika 13). Ove dve proteinaze se po svemu sudeći

razlikuju od enzima koji su do sada pronađeni kod laktokoka i laktobacila, tako da će za njihovu potpuniju biohemijsku i genetičku karakterizaciju biti neophodno uraditi dodatne eksperimente.

U odnosu na laktobacile, ekstracelularne proteinaze laktokoka su znatno detaljnije biohemijski i genetički okarakterisane, nekoliko proteinaznih regiona je klonirano i sekvencirano (Kok et al., 1988; Kiwaki et al., 1989; Vos et al., 1989). Svi proteinazni regioni laktokoka se nalaze na plazmidima, sa izuzetkom ekstracelularne proteinaze soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* BC101 (Nissen-Meyer et al., 1992). Kod ovog soja nije detektovano prisustvo plazmida, na osnovu čega se može zaključiti da se njegov proteinazni region nalazi na hromozomu.

Za razliku od laktokoka, proteinaze laktobacila su po svemu sudeći kodirane genima koji se nalaze na hromozomu. Ovo se pre svega odnosi na sojeve koji pripadaju vrsti *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Kod soja HN14 nisu primećene vidljive plazmidne trake (Kojić et al., 1991), dok se proteinazni region soja NCDO151, koji je kloniran i sekvenciran (Holck and Nes, 1992) takođe nalazi na hromozomu. U ovom radu je digerirana i nedigerirana totalna DNK sojeva HN14, BGLi17 i BGLi18 analizirana na PFGE i hibridizovana sa laktokokalnim proteinaznim probama (Slika 17). U sva tri slučaja hibridizacija je dobijena sa DNK fragmentima čija se veličina kreće između 110 i 120 kb. Linearni DNK fragmenti ove veličine su najverovatnije hromozomalnog porekla, na osnovu čega se može zaključiti da se proteinazni regioni ovih sojeva nalaze na hromozomu.

Analiza ekstracelularnih proteinaza prirodnih izolata laktobacila na ovaj način može da doprinese boljem uvidu u funkciju, genetičku organizaciju i evolutivni nastanak proteolitičkog sistema ovih bakterija. Pored toga, identifikacija sojeva koji sintetišu proteinaze različitih osobina ima i nesumnjiv komercijalni značaj, s obzirom da omogućava dobijanje novih starter kultura i njihovu primenu u industriji fermentisanih proizvoda.

## 5. Zaključci

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

1. Tokom testiranja kolekcije prirodnih izolata stafilokoka, 55 od 171 je ispoljavalo proteolitičku aktivnost koja se ogledala u sposobnosti koagulacije mleka.

2. Elektroforetska analiza ukupnih proteina mleka posle koagulacije kulturama stafilokoka pokazala je da se koagulacija odvija zahvaljujući degradaciji  $\kappa$ - kazeina pod delovanjem proteinaza stafilokoka.

3. Denzitometrijsko određivanje odnosa glavnih kazeinskih frakcija pre i posle koagulacije pokazalo je da su, u poređenju sa himozinom, proteinaze stafilokoka nedovoljno specifične u odnosu na kazeinske frakcije. S obzirom da dovode do visoke degradacije  $\alpha_{S1}$ - i  $\beta$ - kazeina, nijedan od testiranih izolata ne sintetiše proteinazu koja bi mogla da se koristi kao sirilo mikrobijalnog porekla.

4. Za detaljniju analizu su odabrani izolati F22, F86, S2007, S2105 i M104. Proteinaze svih pet izolata hidrolizuju sve tri kazeinske frakcije, BSA hidrolizuju svi osim izolata F22, dok sposobnost degradacije želatina pokazuju izolati F86, S2007 i S2105. Nijedan od testiranih izolata ne hidrolizuje hemoglobin.

5. Optimalne temperature za aktivnost proteinaza ovih izolata se kreću od 30°C do 37°C dok se optimalne pH vrednosti nalaze u opsegu od 6,5 do 8,7.

6. Na osnovu eksperimenata sa specifičnim proteinaznim inhibitorima, može se zaključiti da izolati F22 i M104 sintetišu proteinaze koje pripadaju serinskoj klasi, dok enzimi izolata S2007 i S2105 najverovatnije spadaju u klasu metaloproteinaza. Na osnovu istih eksperimenata, pripadnost proteinaze izolata F86 određenoj klasi nije bilo moguće utvrditi.

7. Svih pet izolata sintetišu prave ekstracelularne proteinaze koje se oslobađaju u medijum za rast bakterija. Elektroforezom na nenedenaturišućem gelu utvrđene su molekulske mase četiri proteinaze, i one iznose 22 kDa za izolate F86 i S2007, 20 kDa za izolat S2105 i 32 kDa za izolat M104.

8. Totalna DNK ovih pet izolata nije dala signale u hibridizaciji sa laktokokalnim proteinaznim probama.

9. U kolekciji prirodnih izolata mezofilnih laktobacila, od 75 testiranih detektovano je 17 proteolitički aktivnih izolata. Ekstracelularne proteinaze ovih izolata su inhibirane PMSF-om, iz čega se može zaključiti da pripadaju serinskoj klasi. Za detaljniju analizu su odabrani sojevi *Lactobacillus divergens* BG742, *Lactobacillus rhamnosus* BGEN1 i *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGLi17 i BGLi18.

10. Svi testirani sojevi hidrolizuju samo  $\beta$ - kazein, sa izuzetkom proteinaze soja BG742 koja hidrolizuje sve tri kazeinske frakcije. Aktivan proteinazni ekstrakt se može dobiti kod soja BGLi17, BGLi18 i BG742, ali ne i kod soja BGEN1.

11. Proteinaze soja BGLi17, BGLi18 i BGEN1 najefikasnije hidrolizuju  $\beta$ - kazein na pH 5,7, dok je proteinaza soja BG742 najefikasnija na pH 8.7.

12. Totalna DNK soja BGLi17 i BGLi18 hibridizuje sa laktokokalnim proteinaz-

nim probama. Na osnovu hibridizacionih eksperimenata konstruisane su restrikcione mape proteinaznih regiona ovih sojeva. Na tom nivou one pokazuju visoku homologiju sa proteinaznim regionima laktokoka i ranije analiziranih laktobacila.

13. Razdvajanje genomske DNK sojeva BGLi17 i BGLi18 na PFGE i hibridizacija sa laktokokalnim proteinaznim probama ukazuju na hromozomalnu lokaciju njihovih proteinaznih regiona.

## Literatura

- Alford, J.A. and W.C. Frazier. 1950. Effect of micrococci on the development of flavor when added to Cheddar cheese made from pasteurized milk. *J.Dairy Sci.* 33: 115-120.
- Barrett, A.J. and N.D. Rawlings. 1991. Proteinases. Types and families of endopeptidases. *Biochem. Soc. Trans.* 19: 707-714.
- Bautista, L., M.P. Bermejo and M. Nunez. 1986. Seasonal variations and characterization of *Micrococcaceae* present in ewes raw milk. *J.Dairy Res.* 53: 1-5.
- Benjannet, S., N. Rondeau, R. Day, M. Chretien and N.G. Seidah. 1991. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3564-3568.
- Betzel, C., A.V. Teplyakov, E.H. Harutyunyan, W. Saenger and K.S. Wilson. 1990. Thermitase and proteinase K: a comparison of the refined three-dimensional structures of the native enzymes. *Protein Eng.* 3: 161-172.
- Beynon, R.J. and J.S. Bond. 1994. In *Proteolytic enzymes, a practical approach*. Inhibition of proteolytic enzymes. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, pp. 83-104.
- Bhowmik, T. and E.H. Marth. 1988. Protease and peptidase activity of *Micrococcus* Species. *J. Dairy Sci.* 71: 2358-2365.
- Birnboim, A.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Bottazi, V. and B. Battistotti. 1966. Manufacture of Provolone cheese with micrococci. XVII Intern. Dairy Congress, D 2: 571-577.
- Carini, S., R. Lodi e R. Todesco. 1973. I cagli microbici: Caratteristiche nella degradazione della caseina e lozo impiego. *J. la Latte* 7: 13-22.
- Chandan, R.C., P.J. Argyle and G.E. Mathison. 1982. Action of *Lactobacillus bulgaricus* proteinase preparations on milk proteins. *J. Dairy Sci.* 65: 1408-1413.
- Craik, C.S., W.J. Rutter and R. Fletterick. 1983. Splice junctions: Association with variation in protein structure. *Science* 220: 1125-1129.
- De Man, J.C., M. Rogosa and J.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
- Delbaere, L.T.J., W.L.B. Hutcheon, M.N.G. James and W.E. Thiessen. 1975. Tertiary structural differences between microbial serine proteases and pancreatic serine enzymes. *Nature* 257: 758-763.
- Desmazeaud, M. and J. Hermier. 1968(a). Facteurs intervenant dans la production du systeme proteolytique chez *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 8: 419-429.
- Desmazeaud, M. and J. Hermier. 1968(b). Isolement, purification et proprietes d'une protease exocellulaire chez *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 8: 565-577.
- Desmazeaud, M. and J.J. Devoyod. 1970. Action stimulante des microcoques caseolytiques sur les bacteries lactiques thermophiles. Mise en evidence de la nature peptidique des substances stimulantes. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 10: 413-430.

- Desmazeaud, M. and J. Hermier. 1971. Specificite de la protease neutre de *Micrococcus caseolyticus*. Eur. J. Biochem. 19: 51-55.
- Dev, I.K. and P.H. Ray. 1990. Signal peptidases and signal peptide hydrolases. J. Bioenerg. Biomembr. 22: 271-290.
- Duckworth, W.C. 1988. Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. Endocrine rev. 9:319-345.
- El Soda, M., M.J. Desmazeaud, D. Le Bars and C. Zevaco. 1986. Cell wall-associated proteinases in *Lactobacillus casei* and *L. Plantarum*. Journal of food protection 49: 361-365.
- Ezzat, N., C. Zevaco, M. El Soda and J.C. Gripon. 1987. Partial purification and characterization of a cell wall-associated proteinase from *Lactobacillus bulgaricus*. Milchwissenschaft 42: 95-97.
- Ezzat, N., M. El Soda, C. Bouillane, C. Zevaco and P. Blanchard. 1985. Cell wall-associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis*. Milchwissenschaft 40: 140-143.
- Fischer, U. and K.H. Schleifer. 1980. Zum Verkommen der Gram- positiven, katalase- positiven Kokken in Rothwurst. Fleischwirtschaft 60:1046-1051.
- Foda, M.S., A.A. Ismail and M.A. Khorshid. 1976. Production of a new rennin like enzyme by *Aspergillus ochraceus*. Dairy Sci. Abstract 38: 4505-4512.
- Fusek, M., X. Lin and J. Tang. 1990. Enzymic properties of thermopsin. J. Biol. Chem. 265: 1496-1501.
- Gasson, M.J. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. J. Bacteriol. 154: 1-9.
- Gilbert, C., D. Atlan, B. Blanc, R. Portalier, J.E. Germond, L. Lapierre and B. Mollet. 1996. A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. J. Bacteriol. 178: 3059-3065.
- Gilles, A.M., A. De Wolf and B. Keil. 1983. Amino acid sequences of the active-site sulfhydryl peptide and other thiol peptides from the cysteine proteinase  $\alpha$ -clostripain. Eur. J. Biochem. 130: 473-479.
- Gorini, L. and C. Fromageot. 1950. Les facteurs physiologiques conditionnant la presence de proteinase dans le cultures de *Micrococcus lysodeicticus*. Biochim. Biophys. Acta 5: 524-534.
- Green, M.L. 1977. Rewiew of the progress of Dairy Science: milk coagulants. J. Dairy Res. 44: 159-188.
- Haandrikman, A.J., R. Meesters, H. Laan, W.N. Konings, J. Kok. and G. Venema. 1991. Processing of the lactococcal extracellular serine proteinase. Appl. Environ. Microbiol. 57:1899-1904.
- Herrman, B., M. Bucan, P.E. Mains, A.M. Frischauf, L.M. Silver and H. Lehrach. 1986. Genetic analysis of the proxymal portion of the mouse *t* complex: evidence for a second inversion within *t* haplotypes. Cell 44: 469-476.
- Hill, S.H.A. and M.J. Gasson. 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.
- Hofsten, B.V. and C.H. Tjeder. 1965. An extracellular proteolytic enzyme from a strain of *Arthrobacter*. I. Formation of the enzyme and isolation of mutant strains without proteolytic activity. Biochim. Biophys. Acta 110: 576-584.
- Holck, A. and H. Nes. 1992. Cloning, sequencing and expresion of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151. J. Gen. Microbiol. 138: 1358-1364.
- Holzappel, W.H. and E.S. Gerber. 1983. *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L(+) - lactate. Syst. Appl. Microbiol. 4: 522-534.

- Hopwood, D.A., J.M. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C. Bruton, H.M. Kieser, J.D. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward and H. Schrempf. 1985. In Genetic Manipulation of *Streptomyces*, a Laboratory Manual. Norwich, UK, The John Innes Foundation.
- Horwitz, W. 1980. In Official Methods of Analysis of the AOAC. 13<sup>th</sup> ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Husain, I. and I.J. McDonald. 1958. Characteristics of an extracellular proteinase from *Micrococcus freudenreichii*. Can. J. Microbiol. 4: 237-242.
- James, M.N.G. and A.R. Sielecki. 1987. In Active Sites of Enzymes (Jurnak, F.A. and A. McPherson eds.) Vol.3, John Wiley and Sons, Inc., New York, pp.414-482.
- Jedrychowski, L., S. Poznanski, J. Jakubowski, Z. Smietana and R. Kreft. 1975. Einsatz von enzympräparaten mikrobiellen Ursprungs zur kontinuierlichen Käseherstellung. Milchwissenschaft 30: 668-673.
- Kandler, O. 1984. Current taxonomy of lactobacilli. Ind. Microbiol. 25: 109-123.
- Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Genus *Lactobacillus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1209-1234.
- Kikuchi, T. and S. Toyoda. 1969. Studies on microbial rennet. IV. Experimental cheesemaking with crystallized microbial rennet. Dairy Sci. Abstract 32: 450-458.
- Kilpper-Baltz, R. and K.H. Schleifer. 1981. DNA- $\gamma$ RNA hybridization studies among staphylococci and some other gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 10: 357-362.
- Kiwaki, M., H. Ikemura, M. Shimizu-Kadota and A. Harashima. 1989. Molecular characterization of a cell wall-associated proteinase gene from *Lactococcus lactis* NCDO763. Molecular Microbiology 3: 359-369.
- Kloos, W. E. and K. H. Schleifer. 1986. Genus *Staphylococcus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1013-1035.
- Kocur, M. 1986. Genus *Micrococcus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2, Williams & Wilkins, Baltimore, pp.1004-1008.
- Kojić, M., D. Fira, A. Banina and L. Topisirović. 1991. Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1753-1757.
- Kojić, M., D. Fira, A. Banina and L. Topisirović. 1995. Comparative study on cell envelope-associated proteinases in natural isolates of mesophilic lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 79: 61-68.
- Kok, J., K.J. Leenhouts, A.J. Haandrikman, A.M. Ledebroer and G. Venema. 1988. Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol. 54: 231-238.
- Kok, J. and G. Venema. 1988. Genetics of proteinases of lactic acid bacteria. Biochimie 70: 475-488.
- Kortt, A.A. and T.Y. Liu. 1973. On the mechanism of action of streptococcal proteinase. II. Comparison of the kinetics of proteinase and papain-catalyzed hydrolysis of N-acylamino acid esters. Biochemistry 12: 328-337.
- Kumar, V. 1979. Rapid flavor development in cheese using selected microbial enzymes. Ph.D. dissertation, Cornell University, Ithaca, NY.
- Kuo, W.L., B.D. Gehm and M.R. Rosner. 1990. Cloning and expression of the cDNA for a *Drosophila* insulin-degrading enzyme. Mol. Endocrinol. 4:1580-1591.
- Laan, H. and W. Konings. 1989. Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3101-3106.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-686.

- Laloi, P., D. Atlan, B. Blanc, C. Gilbert and R. Portalier. 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.
- Li, S.L., S. Norioka and F. Sakiyama. 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of the  $\beta$ -lytic protease gene from *Achromobacter lyticus*. *J. Bacteriol.* 172: 6506-6511.
- Lin, X. and J. Tang. 1990. Purification, characterization and gene cloning of thermopsin, a thermostable acid protease from *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biol. Chem.* 265: 1490-1495.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MacFarlane, G.T. and S. Macfarlane. 1992. Physiological and nutritional factors affecting synthesis of extracellular metalloproteases by *Clostridium bifermentans* NCTC2914. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1195-1200.
- Mackinlay, A.G. and R.G. Wake. 1971. In *Milk Proteins*; (Ed. H.A. McKenzie). Academic Press, New York, pp 2-175.
- Macrina, F.L., D.J. Kopecko, K.R. Jones, D.J. Ayres and S.M. McCowen. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* 1: 417-420.
- Maniatis, T., E. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marceron, J.E., J. Lenoir and R. Veireyre. 1966. Microbial flora of St. Paulin-type cheese and its proteolytic activity. XVII Intern. Dairy Congress, D: 603-610.
- Martens, R. 1973. Gauda cheese made with microbial rennet derived from *Mucor miehei*. *Milchwissenschaft* 26: 87-91.
- Mašek, J., J. Havlova and M. Těplý. 1970. Technologically important factors affecting renneting activity of Czechoslovakian microbial rennets. *Prum. Potravin* 21: 247-248.
- McDonald, I.J. 1965. Distribution of proteinase in cultures of a species of *Micrococcus* in synthetic medium. *Can. J. Microbiol.* 11: 693-701.
- McDonald, I.J. and A.K. Chambers. 1966. Regulation of proteinase formation in a species of *Micrococcus*. *Can. J. Microbiol.* 12: 1175-1185.
- Millet, J., and R. Archer. 1969. Specificity of megateriopeptidase: an amino-endopeptidase with hydrophobic characteristics. *Eur. J. Biochem.* 9: 456-463.
- Mills, C. and J.N. Campbell. 1974. Production and control of extracellular enzymes in *Micrococcus sodonensis*. *Can. J. Microbiol.* 20: 81-88.
- Mizuno, K., T. Nakamura, T. Oshima, S. Tanaka and H. Matsuo. 1988. Yeast *kex2* gene encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156: 246-254.
- Moehle, C.M., R. Tizard, S.K. Lemon, J. Smart and E.W. Jones. 1987. Protease B of the lysosome-like vacuole of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to the subtilisin family of serine proteases. *Mol. Cell. Biol.* 7: 4390-4399.
- Morihara, K. and H. Tsuzuki. 1966. Substrate specificity of elastolytic and nonelastolytic proteinases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 114: 158-164.
- Morihara, K., H. Tsuzuki and T. Oka. 1968. Comparison of the specificities of various neutral proteinases from microorganisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 123: 572-580.
- Nath, K.R. and R.A. Ledford. 1971. Stimulation of the rate of acid production by lactobacilli in media containing a capsular substance from micrococci. *J. Dairy Sci.* 54: 1784-1789.



- Nissen-Meyer, J., D. Lillehaug and I.F. Nes. 1992. The plasmid-encoded lactococcal envelope-associated proteinase is encoded by a chromosomal gene in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* BC101. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 750-753.
- Obradović, D. 1983. Proteolitička aktivnost sojeva vrste *S. lactis* i soja *Micrococcus* sp. M104 u mleku kao jedan od kriterijuma za korišćenje navedenih sojeva u starterima. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Ohno, S., Y. Emori, S. Imajoh, H. Kawasaki, M. Kisaragi and K. Suzuki. 1984. Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein. *Nature* 312: 566-570.
- Pessen, H., T.F. Kumosinski and H.M. Farrel. 1989. Small-angle X-ray scattering investigation of the micellar and submicellar forms of bovine casein. *J. Dairy Res.* 56: 443-449.
- Prasad, R., R.K. Malik and D.K. Mathur. 1983. Isolation and screening of  $\beta$ -caseinolytic *Micrococcus* spp. from Cheddar cheese. *Asian J. Dairy Res.* 2: 67-75.
- Prasad, R., R.K. Malik and D.K. Mathur. 1984. Optimization of nutritional and environmental factors for the production of caseinolytic enzyme of a *Micrococcus* sp. isolated from Cheddar cheese. *Asian J. Dairy Res.* 3: 25-32.
- Prasad, R., R.K. Malik and D.K. Mathur. 1986. Purification and characterization of extracellular caseinolytic enzyme of *Micrococcus* sp. MCC-135 isolated from Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 69: 633-642.
- Pritchard, G. and T. Coolbear. 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 12: 179-206.
- Renex, D., B.A. Hemmings, J. Hofsteenge and S.R. Stone. 1991. cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue. *Biochemistry* 30: 2195-2203.
- Ritter, P. 1962. Beeinflussung der Sauerung der im Emmentalerkäse notwendigen thermophilen milchsäurebakterien durch fördernde Mikrokokken aus der Milch. XVI Intern. Dairy Congress, 2: 712-720.
- Schleifer, K.H. 1973. Chemical composition of staphylococcal cell walls. In Jeljaszewicz (Editor), *Staphylococci and Staphylococcal Infections. Recent Progress*. S. Karger, Basel, pp. 13 - 23.
- Schleifer, K.H., S.A. Meyer and M. Ruprecht. 1979. Relatedness among coagulase-negative staphylococci. Deoxyribonucleic acid reassociation and comparative immunological studies. *Arch. Microbiol.* 122: 93-101.
- Schmidt, D.G. 1982. Association of caseins and casein micelle structure. In *Developments in dairy chemistry*, 1. Proteins. P.F. Fox, ed. Appl. Sci. Publ., London, UK.
- Shammet, K.M., R.J. Brown and D.J. McMahon. 1992. Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on  $\kappa$ -casein. *J. Dairy Sci.* 75: 1373-1379.
- Sharpe, M.E. 1981. In Starr, Stolp, Truper, Balows and Schlegel (eds.). *The Prokaryotes. A Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Springer, New York, pp. 1653-1679.
- Siffert, O., I. Emod and B. Keil. 1976. Interaction of clostripain with natural trypsin inhibitors and its affinity labeling by  $N\alpha$ -p-nitrobenzyloxycarbonyl arginine chloromethyl ketone. *FEBS Lett.* 66: 114-119.
- Smith, E.L., R.J. Delaage, W.H. Ewans, M. London and F.S. Markland. 1968. Subtilisin Carlsburg. V. The complete sequence; comparison with subtilisin BPN; evolutionary relationships. *J. Biol. Chem.* 243: 2184-2192.
- Sood, V.K. and F.V. Kosikowski. 1979. Accelerated Cheddar cheese ripening by added microbial enzymes. *J. Dairy Sci.* 62: 1865-1872.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

- Stackebrandt, E. and C.R. Woese. 1979. A phylogenetic dissection of the family *Micrococcaceae*. *Curr. Microbiol.* 2: 317-322.
- Stackebrandt, E., B.J. Lewis and C.R. Woese. 1980. The phylogenetic structure of the coryneform group of bacteria. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt. II. Orig. C1*: 137-149.
- Stackebrandt, E., C. Sheyrlein and K.H. Schleifer. 1983. Phylogenetic and biochemical studies on *Stomatococcus mucilaginosus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 4: 207-217.
- Steinkraus, K.H. 1983. Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 49: 337-348.
- Štević, B., M. Šutić i M. Stojanović. 1973. Polivalentne kulture u izradi belog sira. *Arhiv za poljoprivredne nauke* 26(95): 3-14.
- Štević, B. and J.A. Awan. 1973. The metabolic compatibility in microbiocenosis-review. *Mikrobiologija (YU)* 10: 109-126.
- Stoohart, P.H. and D.J. Cebula. 1982. Small-angle scattering study of bovine casein micelles and submicelles. *J. Mol. Biol.* 160: 391-398.
- Sugimura, K. and T. Nishihara. 1988. Purification, characterization and primary structure of *Escherichia coli* Protease VII with specificity for paired basic residues: Identity of Protease VII and *OmpT*. *J. Bacteriol.* 170: 5625-5632.
- Suzuki, K., S. Imajoh, Y. Emori, H. Kawasaki, Y. Minami and S. Ohno. 1987. Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor. Activation at the cell membrane and biological function. *FEBS Lett.* 220: 271-277.
- Šutić, M. 1964. Odnosi i uloga pojedinih grupa mikroorganizama u toku zrenja kačkavalja. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Šutić, M. and J. Joksimović. 1973. A contribution to the investigations on pure and conjoint cultures of streptococci and micrococci in the ripening of sausages. XIX European Meeting of Meat Research Workers, 1629-1644.
- Šutić, M. 1966. Biocenotski odnosi bakterija mlečne kiseline i mikrokoka iz kačkavalja. *Mikrobiologija (YU)* 3: 21-31.
- Tang, J., M.N.G. James, I.N. Hsu, J.A. Jenkins and T.L. Blundell. 1978. Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature* 271: 618-621.
- Tobe, S., T. Takami, Y. Hirose and K. Mitsugi. 1975. Purification and some properties of alkaline protease from *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* 39: 1749-1755.
- Trop, M. and A. Pinsky. 1971. *Mucor pusilis* rennin as synergist to calf rennet. *J. Dairy Sci.* 54: 5-7.
- Tsuru, D., S. Shimada, S. Maruta, T. Yoshimoto, K. Oda, S. Murao, T. Miyata and S. Iwanaga. 1986. Isolation and amino acid sequence of a peptide containing an epoxide-reactive residue from the thermolysin-digest of *Scutalidium lignorum* acid protease B. *J. Biochem. (Tokyo)* 99: 1537-1539.
- Vallier, P. 1966. Secretion d'une protéinase par *Micrococcus lysodeiaticus* (*Sarcina flava*) These de Doctorat de 3 cycle. Grenoble, France.
- Van de Ven, W.J.M., J. Voorberg, R. Fontijn, H. Pannekoek, A.M.W. van den Ouweland, H.L.P. van Duijnhoven, A.J.M. Roerbroek and R.J. Siezen. 1990. Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* 14: 265-275.
- Verdi, R.J., D.M. Barbano, M.E. Dellavalle and G.F. Senyk. 1987. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cells milks. *J. Dairy Sci.* 70: 230-242.
- Von Rheinbaben, K.E. and R.M. Hadlok. 1981. Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 47: 41-51.

- Vos, P., G. Simons, R.J. Siezen and W.M. de Vos. 1989. Primary structure and organization of the gene for a pro-caryotic, cell-envelope-located serine proteinase. *J. Biol. Chem.* 171: 2795-2802.
- Walstra, P. 1990. On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.* 73: 1965-1979.
- Yamamoto, N., A. Akino and T. Takano. 1993. Purification and specificity of a cell-wall-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Biochem.* 114: 740-745.
- Yamamoto, N., A. Akino, T. Takano and K. Shishido. 1995. Presence of active and inactive molecules of a cell wall-associated proteinase in *Lactobacillus helveticus* CP790. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 698-701.
- Yoshimoto, T., J. Fukumoto and D. Tsuru. 1971. Studies on bacterial proteases: some enzymatic and physico-chemical properties of the alkaline protease from *Bacillus natto*. *Int. J. Pept. Protein Res.* 3: 285-291.
- Zevaco, C. and J.C. Gripon. 1988. Properties and specificity of a cell-wall proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Le Lait* 68: 393-408.





