

## INTRAĆELIJSKI PROTEINSKI PROFILI KAO DODATNI KRIJERIJUM ZA IZBOR ČISTIH KULTURA\*

Mr Dragojlo OBRADOVIĆ, Poljoprivredni fakultet, Katedra za mikrobiologiju, Beograd

### S a ž e t a k

*Za prikazivanje razlika između tri soja streptokoka i jednog soja mikrokoka vršeno je poređenje elektroforetskih profila intraćelijskih proteina. Izneto je da određene sličnosti u elektroforetskim profilima sojeva ukazuju na sličnosti u genotipu. Navedena metoda ne predstavlja zamenu za postojeće postupke, ali može da posluži kao dodatni kriterijum za selekciju sojeva koji ulaze u sastav startera.*

Zadnja decenija odlikuje se primenom novih postupaka za determinaciju mikroorganizama, koji su doveli do izmenjenog viđenja sistematike. Od posebnog značaja su određene tehnike koje daju uvid u genotipska svojstva bakterija, a time na neki način upotpunjavaju fenotipsku karakterizaciju navedenih mikroorganizama.

Među ovim metodama najčešće se spominju određivanje sastava baza DN*a* i hibridizacija nukleinskih kiselina. Međutim, navedene metode su za rutinski rad dosta komplikovane i skupe, pogotovo kada je u pitanju veći broj uzoraka. Kao alternativno rešenje nameće se određivanje elektroforetskih profila intraćelijskih rastvorljivih proteina čiji je sadržaj genetski određen. Ova tehnika je uspešno korišćena kod diferencijacije sojeva u okviru rodova i vrsta, kao i njihovog grupisanja prema odgovarajućim sličnostima u elektroforetskim profilima (Foissy, 1973; Kersters and De Ley, 1975; Moore, 1982). Značaj navedene metode ogleda se u činjenici da postoji određena korelacija između podataka dobijenih ovim postupkom i već spomenutih metoda kao i klasičnih taksonomijskih testova. Iz tog razloga moguća je primena gel elektroforeze i kod klasifikacije bakterija mlečne kiseline, pogotovo kod sastavljanja startera.

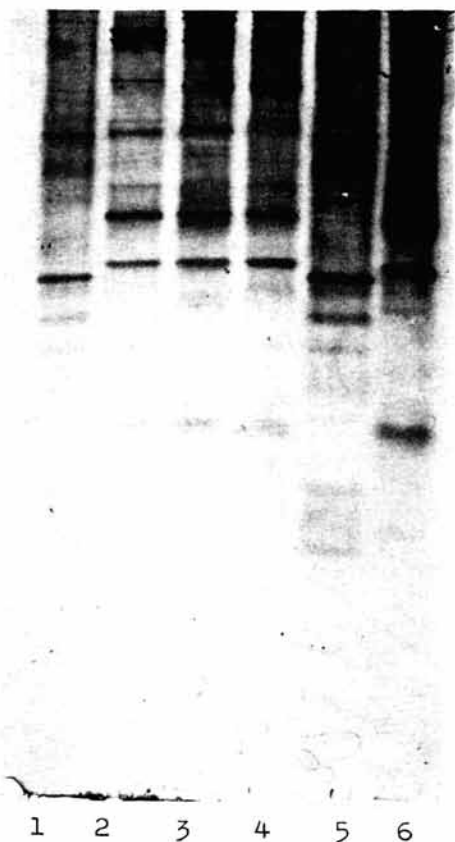
Ova ispitivanja se principijelno zasnivaju na dobijanju intraćelijskih ekstrakata, koji se zatim nanose na odgovarajuće gelove i u električnom polju razdvajaju na više komponenti na bazi različitih naelektrisanja. Za ovakvu vrstu analiza potrebno je prvo izdvojiti biomasu koja se dobija ispiranjem i centrifugacijom bujonskih kultura, koje se nalaze na kraju logaritamske ili na početku stacionarne faze.

Razgradnja ćelijskih zidova može se postići na više načina: homogenizacijom, ultrazvučnom dezintegracijom, francuskom presom, raznim enzimskim postupcima itd. Zatim se tretirana biomasa više puta ispiri i centrifugira u cilju što boljeg prečišćavanja ćelijskog ekstrakta, koji se potom čuva u smrznutom ili liofilizovanom stanju ili se odmah koristi za elektroforetska ispitivanja.

\* Referat održan na XXI Seminaru za mljekarsku industriju, Zagreb, 1983.

Pre nego što se pristupi nanošenju uzoraka od bitne je važnosti napraviti pravilan izbor gela odnosno supstanci koje su osnovni sastojci gela, a predstavljaju takozvane elektroforetske »nosače«. Za ovu svrhu danas se najviše upotrebljavaju agar, skrob, natrijumdodecilsulfat i poliakrilamid. Da bi se postigli optimalni uslovi za izdvajanje frakcija potrebno je s jedne strane voditi računa o obliku, veličini i neto naelektrisanju samih čelijskih ekstrakata, koji u stvari predstavljaju smešu proteina, a s druge o pH vrednosti gela i pufera za elektroforezu, koncentraciji gela, naponu strujnog kola, vremenu, temperaturi itd. Sledeća operacija je bojenje gela, za što se koriste specijalni rastvori boja, kao Coomassie ili amido crno, koji reaguju sa proteinima, a od gela bivaju samo adsorbovani. Zatim se vrši obezbojavanje da bi se uklonio višak boje iz gela, tako da frakcije proteina ostaju obojene, jer je za njih boja vezana.

Ovim je celokupan postupak zaokružen, a pojedinačan izbor metoda u prvom redu zavisi od svrhe ispitivanja, kao i od vrste mikroorganizama koji se ispituju.



Poliakrilamid gel proteinogrami intračelijskih ekstrakata. 1—6: *Micrococcus* M-104, *S. lactis* 763, *S. lactis* 509, *S. lactis* AK-60, *Micrococcus* M-104 i *S. lactis* 509.

Autor je vršio poređenja elektroforetskih profila tri soja vrste *S. lactis* i soja *Micrococcus* M-104. Za analize je korišćen poliakrilamid gel, koji posjeduje gustu rupičastu strukturu, što pored naelektrisanja predstavlja dodatni faktor za brzo razdvajanje proteinskih komponenata. Proteinski profili koji se odnose na sojeve *S. lactis* su imali 20—25 traka (sl. 1) od kojih su neke bile prisutne u tako malim koncentracijama, da su se primenom ove tehnike dosta teško uočavale. Dobiveni rezultati pokazuju da postoje velike podudarnosti u proteinogramima intračelijskih ekstrakata sojeva vrste *S. lactis* što je u suglasnosti sa ranije objavljenim podacima (Morchi-a et al. 1968).

Do istih konstatacija došli su Jarvis i Wolff (1979) koji su denziometrijska merenja gelova kompjuterski obradili u cilju grupisanja mlečnih streptokoka na osnovu elektroforetskih profila. Citirani autori su mišljenja, da velike sličnosti koje postoje između pojedinih bakterija ukazuju da se spomenutim postupkom mogu otkriti prave razlike između njih, koje su, ako se ovi gaje pod identičnim uslovima, gentiopske prirode. Proteinski profil *Micrococcus* M-104, koji se od ostalih u potpunosti razlikuje, kao i profil *Brewibacterium linens* sp (Foissy, 1973) samo potvrđuju gore izneta gledišta.

Za mlekarsku praksu veliki značaj ima i testiranje osetljivosti bakterija mlečne kiseline u pogledu infekcije bakteriofagima. Ovaj problem postaje još složeniji zahvaljujući velikoj razmeni kultura u svetu, tako da mnoge kulture, koje se vode pod različitim oznakama, u stvari predstavljaju izolate istih sojeva. U tom smislu od šireg interesa je postavka Jones-a i Sneath-a (1970), da veća taksonomijska bliskost dva mikroorganizma povećava mogućnost za propagiranje istih faga. To znači da kod mikroorganizama koji poseduju određenu sličnost u genotipu postoji velika verovatnoća za razmnožavanje pojedinih faga, odnosno sličnosti u elektroforetskim profilima bakterija vrlo često su indikator zajedničke osetljivosti u odnosu na specifičan fag.

Na osnovu svega što je izneto proizlazi da kod bakterija mlečne kiseline, a posebno streptokoka grupe N jedan od primarnih testova za selekciju sojeva koji ulaze u sastav startera i dalje ostaje fagotipizacija. Međutim, kako fagotipizacija pa i serotipizacija uglavnom zavise od površinskih karakteristika ćelija, primenom gel elektroforeze dobija se jasan pregled intracelularnih proteina, tako da ovaj postupak može vrlo korisno da posluži kao dodatni kriterijum kod izbora sojeva za startere namenjene proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda.

#### Summary

*A simple method, based upon the separation of cellular proteins by polyacrylamid gel electrophoresis, has been devised for distinguishing between 3 strains of lactic streptococci and one strain of micrococci. Since gel electrophoresis permits analysis of all cell compartments by scanning protein content, more similarities in protein profiles among the strains suggest a similarity in genotype. This method does not supplant other techniques, but it should be of value in selecting strains for cheese starters.*

#### Literatura

- FOISSY, H. (1973): Protein — und Enzymelektropherogram als Kriterien zur Charakterisierung von Bakterien. **Die Österreichische Milchwirtschaft**, **28**, 25—35.
- JARWIS, A. W., and WOLFF, J. M. (1979): Grouping of lactic streptococci by gel electrophoresis of soluble cell extracts. **Appl. Environ. Microbiol.** **37**, 391—398.
- JONES, D., and SNEATH, P. H. (1970): Genetic transfer and bacterial taxonomy. **Bacteriol. Rev.** **34**, 40—81.
- KERSTERS, K., and DE LEY, J. (1975): Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. **J. Gen. Microbiol.** **87**, 333—342.
- MOORE, W. E. C. (1982): Electrophoresis of soluble proteins for taxonomic purpose. XIII International Congress of Microbiology.
- MORICHI, T., SHARPE, M. E., and REITER, B. (1968): Esterases and other soluble proteins of some lactic acid bacteria. **J. Gen. Microbiol.** **53**, 405—414.