

REZUMAT

IZOLAREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR METABOLIȚI SINTETIZAȚI DE BACTERII LACTICE CU IMPORTANȚĂ BIONANOTEHNOLOGICĂ

Elaborată de **Iulia – Roxana Ștefan**, sub îndrumarea **Prof. Univ. Dr. Călina Petruța Cornea**

Cuvinte cheie: bacterii lactice, bacteriocine, nisină, helveticină, exopolizaharide, strat S, probiotice, alimente funcționale

Teza de doctorat intitulată „*Izolarea și cracterizarea unor metaboliți sintetizați de bacterii lactice cu importanță bionanotehologică*” este realizată de către doctorand Iulia – Roxana Ștefan, sub îndrumarea doamnei prof. univ. dr. Călina Petruța Cornea, în cadrul Școlii Doctorale Ingineria și Managementul Resurselor Vegetale și Animale din Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București, în perioada 2015 – 2019.

Bacteriile lactice au o importanță industrială deosebită, în special în industria alimentară datorită efectelor pozitive pe care le au asupra alimentelor, dar și asupra organismului uman. Culturile vii de bacterii lactice prezente în diferite alimente fermentate contribuie la creșterea valorii nutritive a acestora, dar și la creșterea imunității și sănătății intestinului consumatorilor. În plus, bacteriile lactice au capacitatea de a conserva alimentele, dar și de a oferi anumitor produse fermentate, precum brânzeturile și iaurturile, caracteristici unice de aromă. De asemenea, bacteriile lactice prezintă numeroase efecte benefice asupra sănătății umane și animale precum imunomodularea, integritatea intestinală și rezistența la patogeni, motiv pentru care sunt intens studiate de cercetători din punct de vedere genetic, fiziologic și metabolic. Activitatea enzimatică a acestor bacterii în timpul fermentației contribuie la proprietățile organoleptice, reologice și nutriționale ale produsului fermentat. Bacteriile lactice produc numeroși metaboliți importanți, printre care proteine cu efect antimicrobian (bacteriocine), proteine de suprafață cu rol în protecție celulară (proteinele stratului S – de suprafață) și exopolizaharide (EPZ).

Scopul acestei lucrări a fost *izolarea și caracterizarea unor metaboliți importanți din punct de vedere bio(nano)tehnologic produși de către unele bacterii lactice prezente în alimente proaspete sau în produse fermentate*. Atenția a fost îndreptată către *bacteriocine, exopolizaharide și proteine de suprafață*. Principalele obiective în jurul cărora s-a conturat această lucrare sunt:

- Selectarea unor bacterii producătoare de metaboliți de interes;

- Caracterizarea bacteriocinelor produse de două tulpini de bacterii lactice aparținând unor specii diferite și efectul lor asupra unor bacterii sensibile;
- Izolarea și caracterizarea exopolizaharidelor produse de două tulpini bacteriene și rolul lor în textura produsului fermentat;
- Studii privind proteinele de suprafață sintetizate de două bacterii lactice.

Lucrarea este structurată în două părți: partea de documentare, respectiv partea de cercetări proprii, ce însumează șase capitole completate de *Introducere*, *Rezumat*, *Concluzii* și *Bibliografie*.

Prima parte a lucrării este alcătuită din trei capitole și urmărește prezentarea importanței bacteriilor lactice și a metaboliților sintetizați de acestea, atât în industria alimentară, cât și pentru organismul uman consumator de alimente funcționale.

Primul capitol descrie stadiul actual al cercetărilor privind metaboliții sintetizați de bacterii lactice, selectați pentru această lucrare: bacteriocine, exopolizaharide (EPZ) și strat S.

În **capitolul II** se evidențiază multiplele aplicații ale bacteriilor lactice și sunt prezentate principalele familii și genuri bacteriene utilizate în industria alimentară, precum și în alte domenii. De asemenea, în acest capitol sunt descrise efectele probiotice ale bacteriilor lactice și condițiile pe care trebuie să le îndeplinească acestea pentru a fi utilizate în preparate probiotice.

Capitolul III este menit să descrie principalii metaboliți sintetizați de bacterii lactice, punându-se accentul pe compușii cu efect antibacterian (în special, bacteriocinele), exopolizaharide, proteine de suprafață, nutraceutice, vitamine și enzime.

A doua parte a lucrării, cea de cercetări originale, începe cu **capitolul IV** în care sunt prezentate în detaliu scopul lucrării și obiectivele.

Capitolul V cuprinde metodologia utilizată pentru studiile efectuate în cadrul acestei teze. Acest capitol este structurat în cinci subcapitole. În primul subcapitol sunt descrise mediile de cultură folosite și tulpinile bacteriene producătoare de metaboliți de interes selectate, atât din colecția Laboratorului de Microbiologie a Institutului de Biologie, București, cât și tulpini nou izolate din diferite surse. Apoi, fiecare subcapitol însumează metodele utilizate pentru caracterizarea metaboliților. Bacteriocinele au fost caracterizate din punct de vedere al spectrului de activitate și influenței mediului de cultură asupra sintezei acestora de către bacteriile producătoare. După izolare și purificare, au fost realizate studii de stabilitate la diferite temperaturi, valori de pH, enzime și s-a urmărit detectarea genelor codificatoare pentru sinteza de bacteriocine. Mai mult decât atât, în cazul bacteriocinei sintetizate de *L. lactis* 19.3, s-a studiat modul de acțiune al acesteia asupra a două tulpini indicator.

Studiul exopolizaharidelor produse de bacteriile lactice selectate a cuprins izolarea și purificarea, studiul sintezei acestora în diferite condiții de stres, analiza monomerilor constituenți prin TLC și HPLC, efectul mediului de cultură asupra producerii de EPZ și efectul tulpinilor producătoare de EPZ asupra proprietăților reologice ale produselor lactate fermentate.

În sfârșit, cercetările asupra stratului S au cuprins studierea sintezei acestuia de către tulpinile bacteriene producătoare cultivate în diferite condiții de mediu, precum și rolul acestuia în protecția celulelor producătoare. Cercetările au continuat cu detectarea genei responsabile pentru sinteza proteinelor de suprafață prin PCR și studierea sintezei proteinelor de suprafață pe parcursul creșterii bacteriene.

Capitolul VI însumează rezultatele obținute în cadrul prezentei teze de doctorat și raportarea acestora la alte cercetări din domeniu. Cele două bacterii cu activitate antibacteriană, *L. lactis* 19.3 și *Lb. helveticus* 34.9 sintetizează bacteriocine din două clase diferite. *L. lactis* sintetizează nisină, o bacteriocină încadrată în clasa I, a lantibioticelor, caracterizată prin masă moleculară mică, rezistență la pH și temperaturi ridicate. Nisina produsă de *L. lactis* 19.3 are un spectru larg de acțiune, având activitate antibacteriană asupra altor bacterii lactice și asupra unor bacterii patogene sau potențial patogene. Aceasta acționează la nivelul peretelui celular al celulelor sensibile ducând, în final, la moartea acestora. Mai mult, sinteza bacteriocinei are loc și în diferite condiții de stres, inclusiv în medii acide sau în prezența sărurilor biliare, ceea ce ar putea recomanda tulpina producătoare pentru un preparat probiotic. Pe de altă parte, *Lb. helveticus* 34.9 sintetizează helveticină, o bacteriocină aparținând clasei a-III-a, fiind caracterizată prin masă moleculară mare, termolabilă, stabilă la variații de pH și inactivată de proteinaza K. Această bacteriocină s-a remarcat prin activitate antibacteriană împotriva tulpinii *Halobacillus hunanensis* 5Hum, responsabilă pentru deteriorarea unor picturi murale din mănăstirea Humor.

EPZ sintetizate de cele două tulpini bacteriene selectate au dimensiuni mari, sunt formate din glucoză și sunt sintetizate atât în condiții optime, cât și în condiții de stres, în funcție de tulpină. Vâscozitatea laptelui de vacă, respectiv de soia, fermentat cu cele două tulpini producătoare de EPZ a fost variabilă, valoarea acesteia neputând fi corelată în toate cazurile cu cantitatea de polimer, fiind influențată, probabil, și de proprietățile specifice ale EPZ.

Cele două tulpini bacteriene producătoare de strat S selectate pentru această lucrare sunt capabile să producă aceste proteine atât în condiții optime, cât și în condiții de stres. Sinteza maximă de strat S de către *Lb. helveticus* 34.9 are loc la 37° C (temperatura optimă) urmată de cultivarea la 42°C, apoi de celelalte condiții de cultivare. Pe de altă parte, în cazul tulpinii *Lb. brevis* FV 403, sintetizarea stratului S este mai intensă în condiții de stres (cultivare la temperatura de 20° C, urmată

de prezența clorurii de sodiu în mediu ori a pH-ului inițial scăzut) decât în condiții optime de cultivare. Proteinele stratului S au un rol protector față de celula bacteriană producătoare, iar eliminarea acestui înveliș prin tratament cu LiCl 5M, crește sensibilitatea și mortalitatea celulelor, în special în medii cu pH acid sau în prezența sărurilor biliare. Amplificarea cu primeri specifici pentru gena care codifică proteinele de suprafață (*slpA*) a dus la obținerea unor produși de reacție cu greutate moleculară specifică pentru această genă pentru ambele tulpini testate. Se observă că proteinele de strat S sunt prezente pe toată durata creșterii tulpinii *Lb. helveticus* 34.9, în condiții optime de cultivare, benzi proteice mai intense fiind observate în faza de creștere exponențială sugerând rolul protector al stratului S în timpul diviziunii celulare.

Concluziile formulate subliniază principalele caracteristici ale metaboliților sintetizați de tulpinile bacteriene selectate pentru această lucrare. Datele prezentate pot contribui la dezvoltarea unor noi produse alimentare sau industriale cu proprietăți îmbunătățite.