

БИОКОНЗЕРВИСАЊЕ

- Продужење периода одрживости и осигурање безбедности хране на основу активности природно присутних микроорганизама (бактерија) и/или са сврхом додатих, и/или њихових антимикробних састојака, а кроз спонтани или контролисани процес ферментације

УВОД

- БАКТЕРИЈЕ МЛЕЧНЕ КИСЕЛИНЕ– „HALLMARK“ индустрије млека
- Комерцијални значај „*dairy fermentation industry*“ – друга по реду производња (након производње алкохолних пића)
- Кључна улога - *Lactococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus*
- Велики истраживачки напор научне заједнице ка спознаји физиологије, биохемизма и генетичког „*make up*“ БМК у односу на индустријски (ТЕХНОЛОШКИ) ВАЖНА СВОЈСТВА: продукција млечне киселине, протеолиза протеина млека, осетљивост на бактериофаге, као и друга својства која детерминишу квалитет финалних производа - продукција ектополисахарида, метаболизам цитрата – продукција ароматичних једињења, синтеза бактериоцина
- ОВА СВОЈСТВА СУ „PLASMID-BORNE“
- „**GENE-CLONING SYSTEM**“ - стабилна и контролисана експресија „*dairying-relevant genes*“ по њиховој инсерцији у хромозом бактеријског домаћина (рекомбинација)

УВОД

ПРОМЕНЕ

- снажно и дефинисано тржиште
- аутоматизација и рационализација индустрије млека
- потрошач осетљив на многа „HEALTH and ENVIRONMENTAL ISSUES“, уз захтев већег и боље информисаног избора
- ТРАНСЛАЦИЈА АКУМУЛИРАНОГ ЗНАЊА У БИОТЕХНОЛОШКУ РЕАЛНОСТ – ОПТИМИЗАЦИЈА ПРОИЗВОДЊЕ кроз СТАРТЕРЕ СТАБИЛНИХ ПЕРФОРМАНСИ

УВОД

- Изузетна финансијска помоћ ЕУ кроз спонзорисање тзв. „LONG-TERM RESEARCH“ кроз неколико сукцесивних програма под капом BIOTECHNOLOGY PROGRAMME – 56 лабораторија из 42 истраживачке институције партиципирале у интегрисаном „STARLAB “ пројекту
 1. Cell engineering of *L. lactis*
 2. LAB with modified proteolytic properties in milk fermentation
 3. Control of bacteriophage development in LAB
 4. The molecular biology and genetics of thermophilic LAB
 5. LAB as cell factories for the production and delivery of mucosal immunogens
 6. Carbon catabolite control in food grade lactobacilli

ПОТРАГА

- КОНВЕНЦИОНАЛНЕ МЕТОДЕ ПОБОЉШАЊА– временски дуги „*screening*“ протоколи у циљу селекције сојева или мутаната који испољавају нова и/или побољшана својства
- Практична апликација– употреба *BACTERIOPHAGE INSENSITIVE MUTANTS (BIM)* у индустрији
- И даље опстаје и користи се у циљу повећања ГЕНЕТИЧКОГ „*POOL-a*“ стартера (дуге, захтевне процедуре и тешко за предвидети како ће се селекционисани сојеви показати у комерцијалној производњи)
- Касне 1980. – апликација рекомбинантне ДНА технологије; модификација сојева на веома прецизан начин и генерисање „*custom-designed*“ стартера са специјализованим функцијама

ФЕРМЕНТАЦИЈА

- Најстарији начин конзервисања хране – ПРИНЦИП ПРОБЕ И ПОГРЕШКЕ –киселокоагулишући сиреви – претеча свих осталих врста сирева
- Микробна ферментација хране – 6000 BC

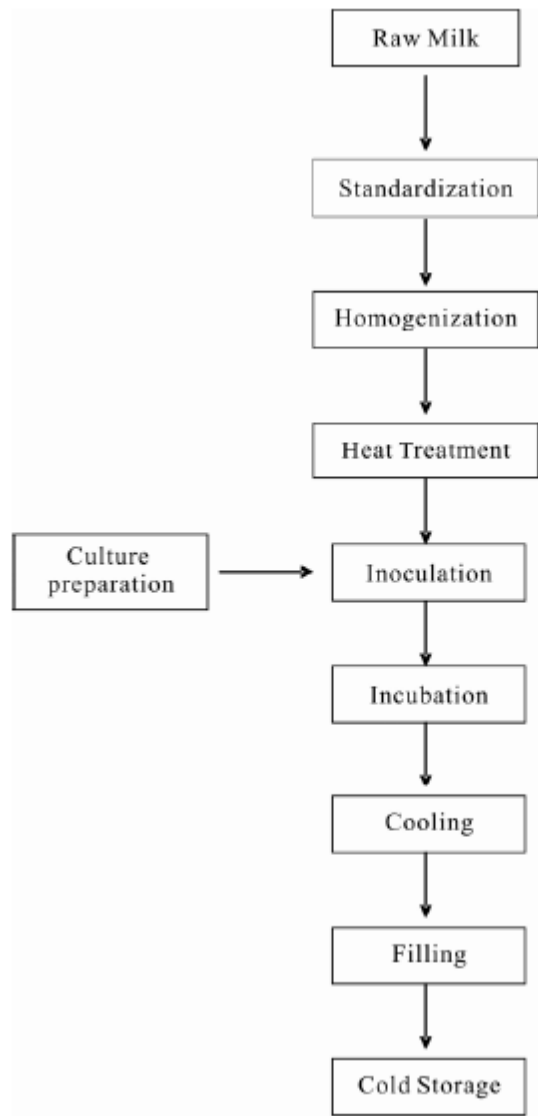
WHY FERMENTED PRODUCTS ?

- сварљивост
- Предигестија УХ – боља толеранција јогурта код лактоза интолерантних особа
- Предигестија протеина– извор биолошки активних компоненти –пептиди са опоидном, антиканцерогеном, антихипертензивном, имуномодулаторном активношћу
- Репресија патогена и МО квара: снижење рН на основу продукције органских киселина, конкуренција за хранљиве материје, снижавање редокс потенцијала, продукција специфичних инхибиторних једињења - бактериоцини

СТАТИСТИКА

- Bulletin No. 35 IDF – 22 кг по глави становника (просечна годишња потрошња ферментисаних производа у Европи)
- 8,5 билиона кг ферментисаног млека/години
- 10^8 CFU/g – $8,5 \times 10^{20}$ БМК
- 4×10^{-12} g – 3 400 тоне ћелија БМК годишње у Европи (ферментисана млека)

„the annual per-capita consumption of fermented milk products (including yogurt) in Europe (35–45 L/person/ year), particularly in Scandinavian countries and the Netherlands, which is considerably higher than that in North America (4–5 L/person/year)“ (Saxelin, 2008)



СЛЕД ТЕХНОЛОШКИХ
ПОСТУПАКА У ПРОИЗВОДЊИ
ФЕРМЕНТИСАНИХ ПРОИЗВОДА

СТАРТЕРИ

- Стартер култура – микробни препарат; садржи велики број ћелија најмање једне врсте МО; са намером се додаје термички обрађеном супстрату како би добили ферментисани производ и то убрзавањем и контролисањем процеса ферментације (метаболичка активност)
- Производња ферментисаних производа – БИОПРОЦЕСИРАЊЕ
- Спонтане ферментације – активност аутохтоних сојева пореклом из сировине и окружења

ПРАВИЛНИК О КВАЛИТЕТУ ПРОИЗВОДА ОД МЛЕКА И СТАРТЕР КУЛТУРА

(„Службени гласник РС“, бр. 33 од 18. маја 2010, 69 од 24. септембра 2010, 43 од 17. маја 2013 - др. правилник, 34 од 26. марта 2014.)

Члан 72.

Стартер културе су културе једног или више сојева једне врсте или више сојева две или више врста микроорганизама, које својом активношћу усмеравају технолошки процес производње ферментисаних производа од млека и истовремено им дају одређена сензорска својства. Постоје два типа стартер култура, и то: мезофилни и термофилни.

Члан 73.

Стартер културе могу бити течне, лиофилизоване или смрзнуте.

ПОДЕЛА

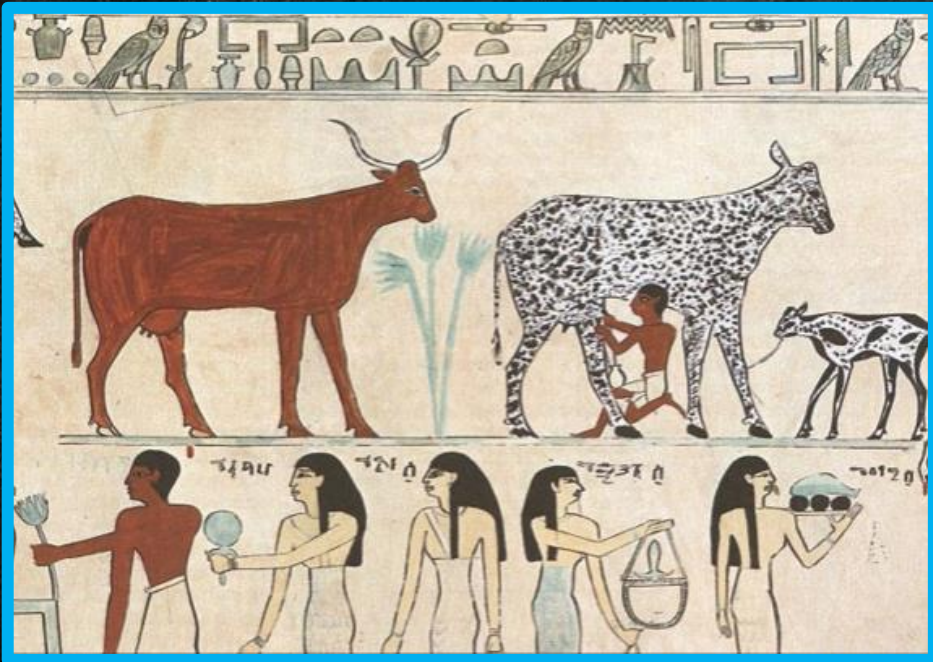
- СЕЛЕКЦИОНИСАНЕ И ПРЕЦИЗНО ДЕФИНИСАНЕ

предвидљива и поновљива стопа ацидификације, и развијања специфичних сензорних карактеристика – КОНТРОЛА ПРОЦЕСА ФЕРМЕНТАЦИЈЕ И ДОБИЈАЊЕ ПРОИЗВОДА СТАНДАРДНОГ КВАЛИТЕТА; моно и мешовите културе, мезофилне и термофилне, 2 типа бактерија – продуценти киселине и продуценти аромогених материја

- НЕДЕФИНИСАНЕ, ТРАДИЦИОНАЛНЕ КУЛТУРЕ

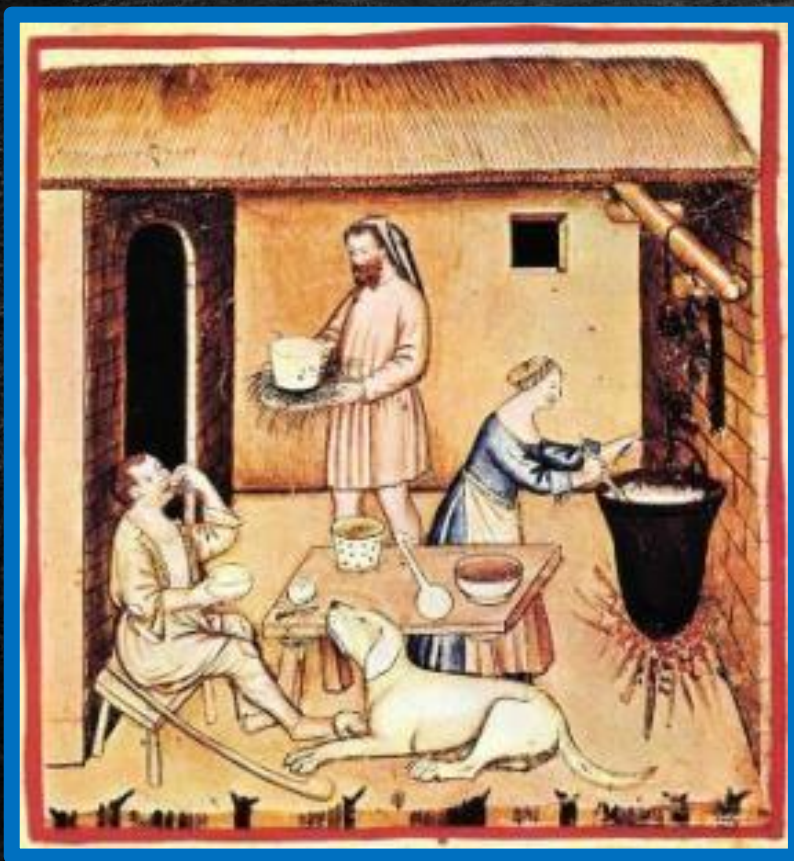
природне, “*wild-type*” БМК; иницирају процес у одсуству комерцијалних стартера; непоновљивост укуса код традиционалних производа – НСБМК – не представљају део стартера, али се у великој биомаси успостављају током периода зрења, као секундарна микробиота

ИСТОРИЈАТ



- ✓ Земља 4,5 милијарди година стара, БМК 3 милијарди година
- ✓ популација БМК се прогресивно шири појавом сисара пре 65 милиона година
- ✓ узгајање сточе – пре 8000 година – пракса производња ферментисане хране
- ✓ први сликовни запис на стели из доба Птолемеја у старом Египту
- ✓ Библија – патријарх Аврам – пред три анђела износи грушано млеко (Genesis VIII)

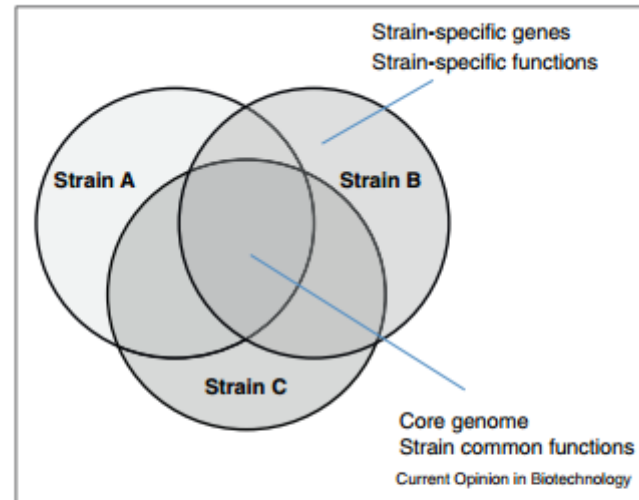
ИСТОРИЈАТ



- ✓ Хомер – Одисеја – први произвођач сира *Polyfemus* – (Aristotel, Varro, Columella)
- ✓ Римске легије – инструментал ширења технологије израде сирева
- ✓ CASEALE – засебне просторије
- ✓ Средњи век – манастири, велики феудални посједи
- ✓ Доба Ренесансе – сир није здрав, популарност се враћа почетком 19. века
- ✓ систематска употреба стартер култура – средином XX столећа /Christian Hansen
- ✓ ферментација са селекционисаним интестиналним МО – 1935. Shirota Institute for Research on Protective Bacteria
- ✓ индустријска примена пробиотских МО – после 1990. године

- Доступност геномских секвенци БМК баца ново светло на еволуцију ових МО кроз млеко као супстрат (микросредину – хабитат – екосистем); губитак и инактивација гена ПЛУС хоризонтални трансфер гена ПЛУС метаболичка симплификација

Figure 1



The pangenome.

The pangenome of a species consists of the entire gene set present within the species. The core genome contains those genes common to all strains, while group and strain-specific genes may reflect niche specific evolution. Genome and pangenome comparisons provide a powerful avenue to the discovery of new biological functions, and, where they can be linked to function, to unravelling complex biological mechanisms.

БМК (Lactic Acid Bacteria / LAB)


- Група Грам позитивних, неспорогених МО функционално повезаних на основу способности да продукују млечну киселину током хомо- или хетероферментације; факултативно анаеробни са ферментативним метаболизмом
- Каталаза негативни /у ретким случајевима активност псеудокаталазе
- Морфолошки облици кока, штапића, кокобацили, хемоорганотрофи
- Слабо протеолитични и липолитични, комплексни нутритивни захтеви (пуринске и пиримидинске базе, АК, вит Б групе)

Кључ за диференцијацију БМК и компарација са тадашњом таксономијом

Rod	Oblik	Katalaza	Redukcija nitrata	Fermentacija	Sadašnji rodovi
<i>Betabacterium</i>	štapić	-	-	hetero	<i>Lactobacillus</i> <i>Weisella</i>
<i>Thermobacterium</i>	štapić	-	-	homo	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	štapić	-	-	homo, hetero	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	koka	-	-	homo	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	koka	-	-	hetero	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weisella</i>
<i>Microbacterium</i>	štapić	+	+	homo	<i>Brochothrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	koka	+	+	homo	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY
MICROBIOLOGY Volume 70, Issue 4


Research Article

A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* 

Jinshui Zheng^{1,†}, Stijn Wittouck^{2,†} , Elisa Salvetti^{3,†}, Charles M.A.P. Franz⁴, Hugh M.B. Harris⁵ , Paola Mattarelli⁶ , Paul W. O'Toole⁵ , Bruno Pot⁷, Peter Vandamme⁸ , Jens Walter^{9,10} , Koichi Watanabe^{11,12} , Sander Wuyts² , Giovanna E. Felis^{3,†} , Michael G. Gänzle^{9,13,†} , Sarah Lebeer^{2,†}

[+ View Affiliations](#)First Published: 15 April 2020 | <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Info

[Sections](#) Get Access

Tools



Share

The genus *Lactobacillus* comprises 261 species (at March 2020) that are extremely diverse at phenotypic, ecological and genotypic levels. This study evaluated the taxonomy of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* on the basis of whole genome sequences. Parameters that were evaluated included core genome phylogeny, (conserved) pairwise average amino acid identity, clade-specific signature genes, physiological criteria and the ecology of the organisms. Based on this polyphasic approach, we propose reclassification of the genus *Lactobacillus* into 25 genera including the emended genus *Lactobacillus*, which includes host-adapted organisms that have been referred to as the *Lactobacillus delbrueckii* group, *Paralactobacillus* and 23 novel genera for which the names *Holzzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* and *Lentilactobacillus* are proposed. We also propose to emend the description of the family *Lactobacillaceae* to include all genera that were previously included in families *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. The generic term 'lactobacilli' will remain useful to designate all organisms that were classified as *Lactobacillaceae* until 2020. This reclassification reflects the phylogenetic position of the microorganisms, and groups lactobacilli into robust clades with shared ecological and metabolic properties, as exemplified for the emended genus *Lactobacillus* encompassing species adapted to vertebrates (such as *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensensii*, *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus acidophilus*) or invertebrates (such as *Lactobacillus apis* and *Lactobacillus bombicola*).

Received: 02/10/2019 Accepted: 26/02/2020 Revised: 15/12/2019 Published Online: 15/04/2020

https://4cau4jsaler1zglkq3wnmje1-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2020/08/Lactobacillus_scientist_linked.pdf

ISAPP/INTERNATIONAL SCIENTIFIC ASSOCIATION FOR PROBIOTICS and PREBIOTICS

- Based on this polyphasic approach, the authors reclassified the genus *Lactobacillus* into 25 genera including the emended genus *Lactobacillus*, which includes host-adapted organisms that have been referred to as the *L. delbrueckii* group; *Paralactobacillus*; as well as 23 novel genera: *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, and *Secundilactobacillus*.

<http://lactotax.embl.de/wuyts/lactotax/>

Enter a species name

Basonym (old species name)

Lactobacillus plantarum

Search

or

New name

e.g. Fructilactobacillus sanfranciscensis

Search

Lactiplantibacillus plantarum subsp. *plantarum*

Type strain: ATCC 14917 = CCUG 30503 = CIP 103151 = DSM 20174 = IFO (now NBRC) 15891 = JCM 1149 = LMG 6907 = NCIMB 11974 = NRRL B-4496

Basonyms (old species names): *Lactobacillus plantarum*, subsp. *plantarum*

DOI for name rejection: [10.1099/ijsem.0.004141](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004141)

Accession numbers

Genbank 16S rRNA gene accession number: [AJ965482](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ965482)

Genbank genome accession number: [AZEJ00000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenBank/GenBank.html)

Additional information

Year of valid or effective publication: 1919

DOI: [10.1099/ijms.0.63333-0](https://doi.org/10.1099/ijms.0.63333-0) / not sure

Properties of the genus

Meaning of the genus name: Lactobacilli related to plants

Type species: *L. plantarum*

Genus properties: Homofermentative, nonprotein-resistant organisms with a nonacid lifestyle that ferment a wide range of carbohydrates.

Индустријска примена БМК

- Стартери
- Заштитне културе
- Пробиотици - функционална храна
- **GRAS статус** (“Generally Recognised As Safe”); FOOD GRADE organisms
- **QPS концепт** (“Qualified Presumption of Safety”) (Evropa)

МЕХАНИЗМИ АНТАГОНИЗМА БМК

КОМЕТИЦИЈА/АНТАГОНИЗАМ

инхибиција других (МО квара или патогена) организама путем конкуренције за хранљиве материје, или продукцијом метаболита са антимикробним деловањем

МИКРОБНА ИНТЕРФЕРЕНЦИЈА

ефикасни неспецифични механизам контроле уобичајен за све популације и средине (нише) укључујући и храну; инхибиција раста одређених МО од стране других чланова хабитата и то на основу конкуренције за хранљиве материје, остваривања неповољне средине те конкуренције за адхезиона места

АНТИМИКРОБНО ДЕЛОВАЊЕ БМК

ПРОДУКТ	ГЛАВНИ <i>target</i> ОРГАНИЗМИ
<p>ОРГАНСКЕ КИСЕЛИНЕ</p> <p>Млечна киселина</p> <p>Сирћетна киселина</p>	Трулежне и Грам негативне бактерије, поједини квасци и плесни, клостридије,
<p>H₂O₂</p>	Патогени и МО квара посебно у храни богатој на садржају беланчевина
<p><u>ЕНЗИМИ</u></p> <p>Лактопероксидаза систем са H₂O₂</p> <p>ЛИЗОЗИМ</p>	Патогени и МО квара
<p>МЕТАБОЛИТИ МАЛЕ МОЛЕКУЛСКЕ МАСЕ</p> <p>Reuterin (3-ОН-propionaldehyd)</p> <p>Диацетил</p> <p>Масне киселине</p>	Широки спектар бактерија, квасци и плесни
<p><u>АНТИМИКРОБНЕ КОМПОНЕНТЕ ВЕЛИКЕ МОЛЕКУЛСКЕ МАСЕ</u></p> <p>БАКТЕРИОЦИНИ/НИЗИН</p>	СРОДНИ МО – поједине БМК и друге Грам позитивне бактерије, посебно спорогени МО

СТАРТЕРИ

Starter cultures for fermented foods

Microorganisms	Foods
Bacteria	
<i>Lactobacillus</i> spp., e.g. <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. brevis</i> , ssp. <i>linens</i> , <i>Lb. sanfrancisco</i> , <i>Lb. sake</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Butter, cheese, bread, vegetables, sausage, yoghurt
<i>Lactococcus</i> spp., e.g. <i>Lact. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lact. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Butter, cheese
<i>Leuconostoc</i> spp., e.g. <i>Lc. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> , <i>Lc. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. oenos</i> (<i>Oenococcus oeni</i>)	Butter, cheese, wine, fermented vegetables
<i>Pediococcus</i> spp., e.g. <i>Ped. acidilactici</i> , <i>Ped. pentosaceus</i>	Sausage, olives
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Yogurt
<i>Micrococcus</i> spp.	Sausage
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Sausage
<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>P. freudenreichii</i>	Cheese (e.g. Emmental type cheese)
<i>Brevibacterium linens</i>	Cheese (Limburger type)
Yeasts	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Beer, wine, bread
Fungi	
<i>Penicillium roqueforti</i> , <i>P. camemberti</i> , <i>P. nalgiovense</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	Cheese, sausage
<i>Aspergillus oryzae</i>	Cheese
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Soy sauce
	Tempeh

“Screening” ТЕСТОВИ



ГЕНЕРАЛНИ КРИТЕРИЈУМИ ЗА СТАРТЕРЕ

- 1. БЕЗБЕДНОСТ
- 1.1. Starter организам не посједује активност патогена и/или токсичну активност
- 1.2. Нису носиоци преносивих гена који кодирају својство резистенције на антибиотике
- 2. ТЕХНОЛОШКА ЕФИКАСНОСТ
- 2.1. Starter МО доминирају над поспратном микробиотом
- 2.2. Starter МО испољавају потребну метаболичку активност
- 3. ЕКОНОМСКИ АСПЕКТ
- 3.1. Пропагација култура мора бити исплатива са економске тачке гледишта
- 3.2. Могућност конзервације поступцима замрзавања или сушења уз мали (занемарљив) губитак активности
- 3.3. Важна биотехнолошка својства су стабилна под дефинисаним условима складиштења у периоду од неколико месеци
- 3.4. Употреба култура што је могуће једноставнија

ГЕНЕРАЛИЗОВАНА ШЕМА ФЕРМЕНТАЦИЈЕ ХЕКСОЗА КОД БМК - ХОМОФЕРМЕНТАЦИЈА

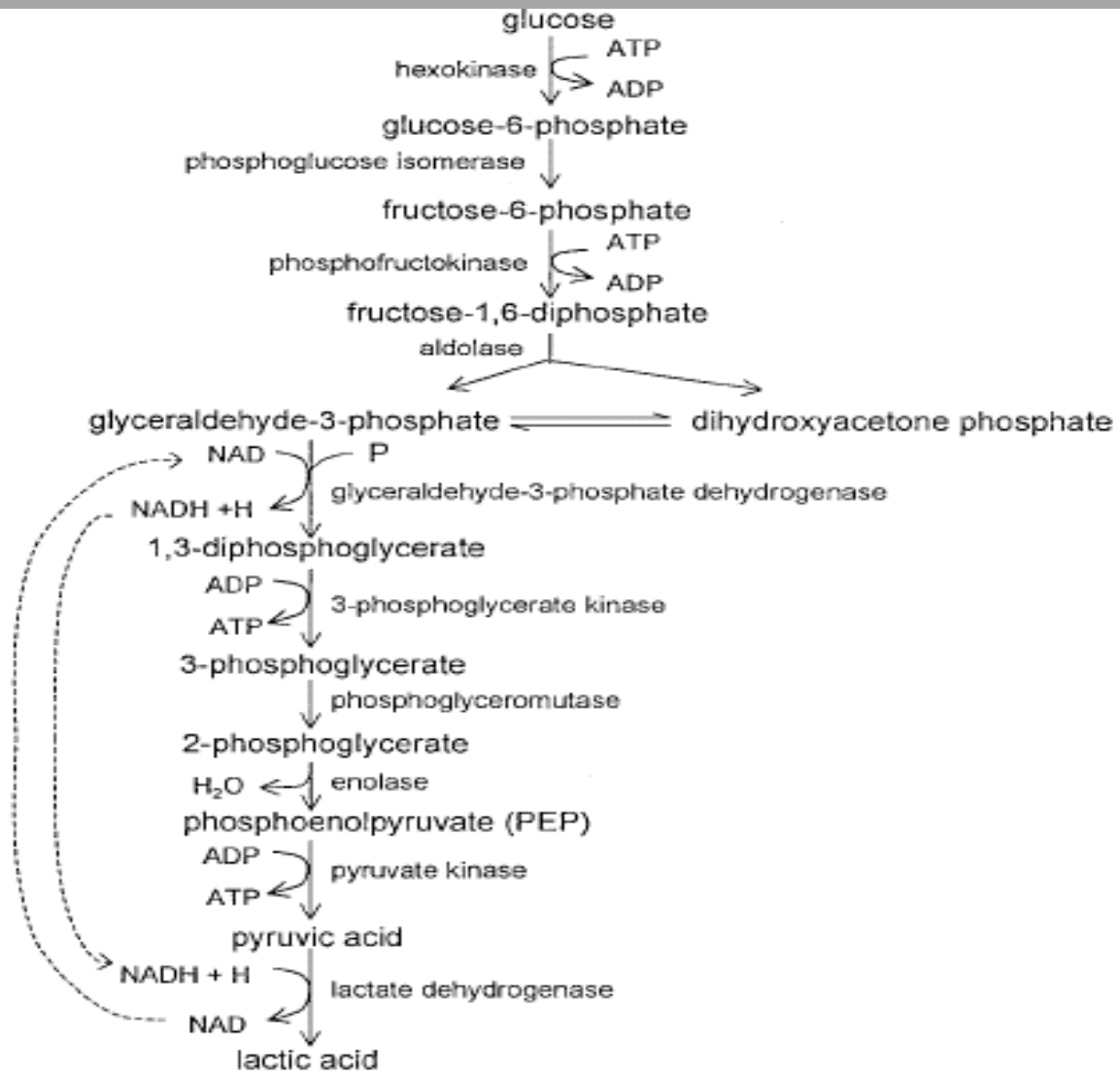
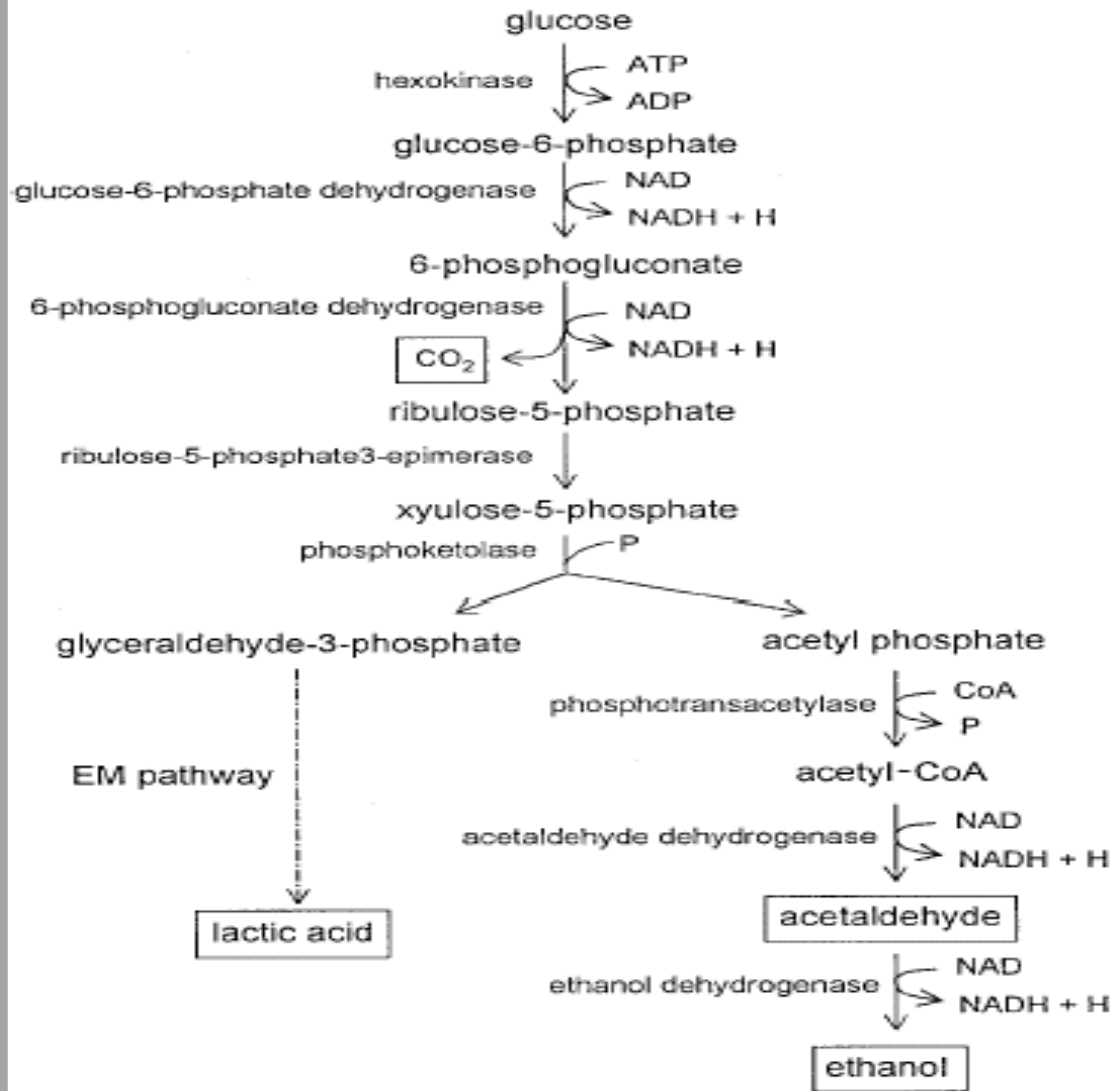


Figure 1 The Embden-Meyerhoff pathway used by homofermentative lactic acid bacteria.

Streptococcus spp.
Lactococcus spp.
Enterococcus spp.
Pediococcus spp.
Lactobacillus spp.

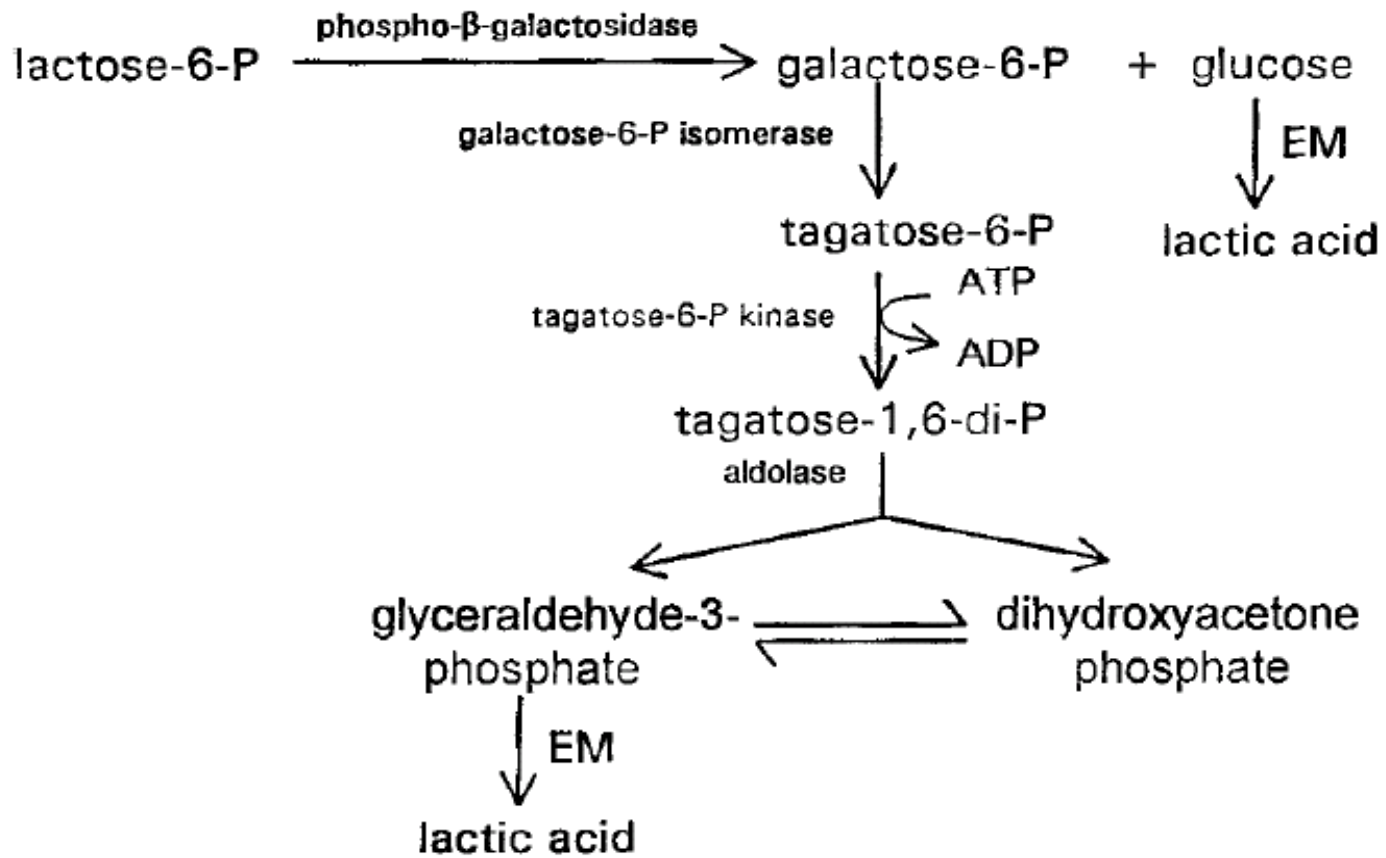
ГЕНЕРАЛИЗОВАНА ШЕМА ФЕРМЕНТАЦИЈЕ ХЕКСОЗА КОД БМК - хетероферментација



Leuconostoc spp.
Weissella spp.
Lactobacillus spp.

Figure 2 The phosphoketolase pathway used by heterofermentative lactic acid bacteria.

ПЕП / зависни ПТС систем



ЛАКТОЗА ПЕРМЕАЗА/ β ГАЛАКТОЗИДАЗА СИСТЕМ

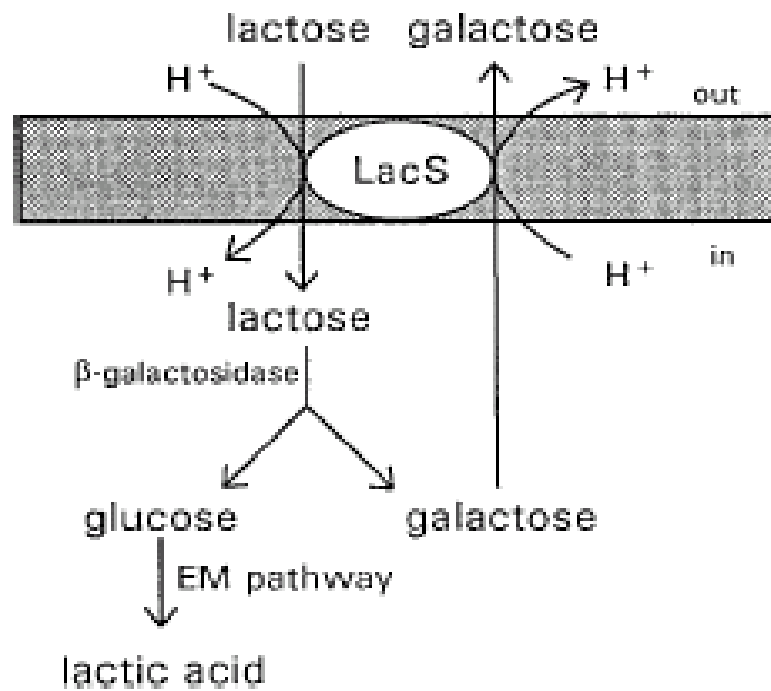
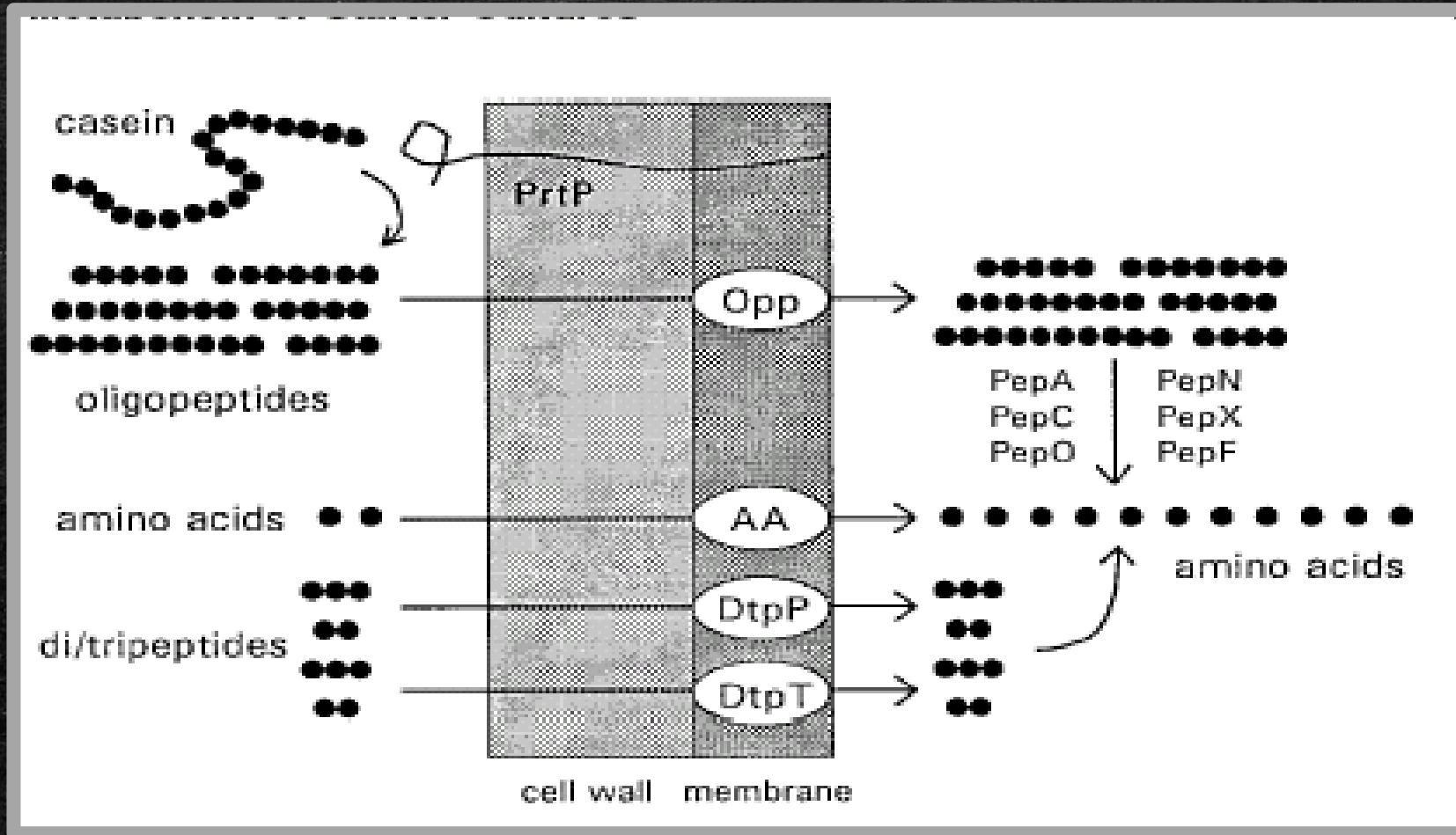


Figure 6 Lactose transport and hydrolysis by *S. thermophilus*. Lactose uptake is driven by galactose efflux; both solutes may be transported in symport with a proton.

ПРОТЕОЛИТИЧКИ СИСТЕМ ЛАКТОКОКА



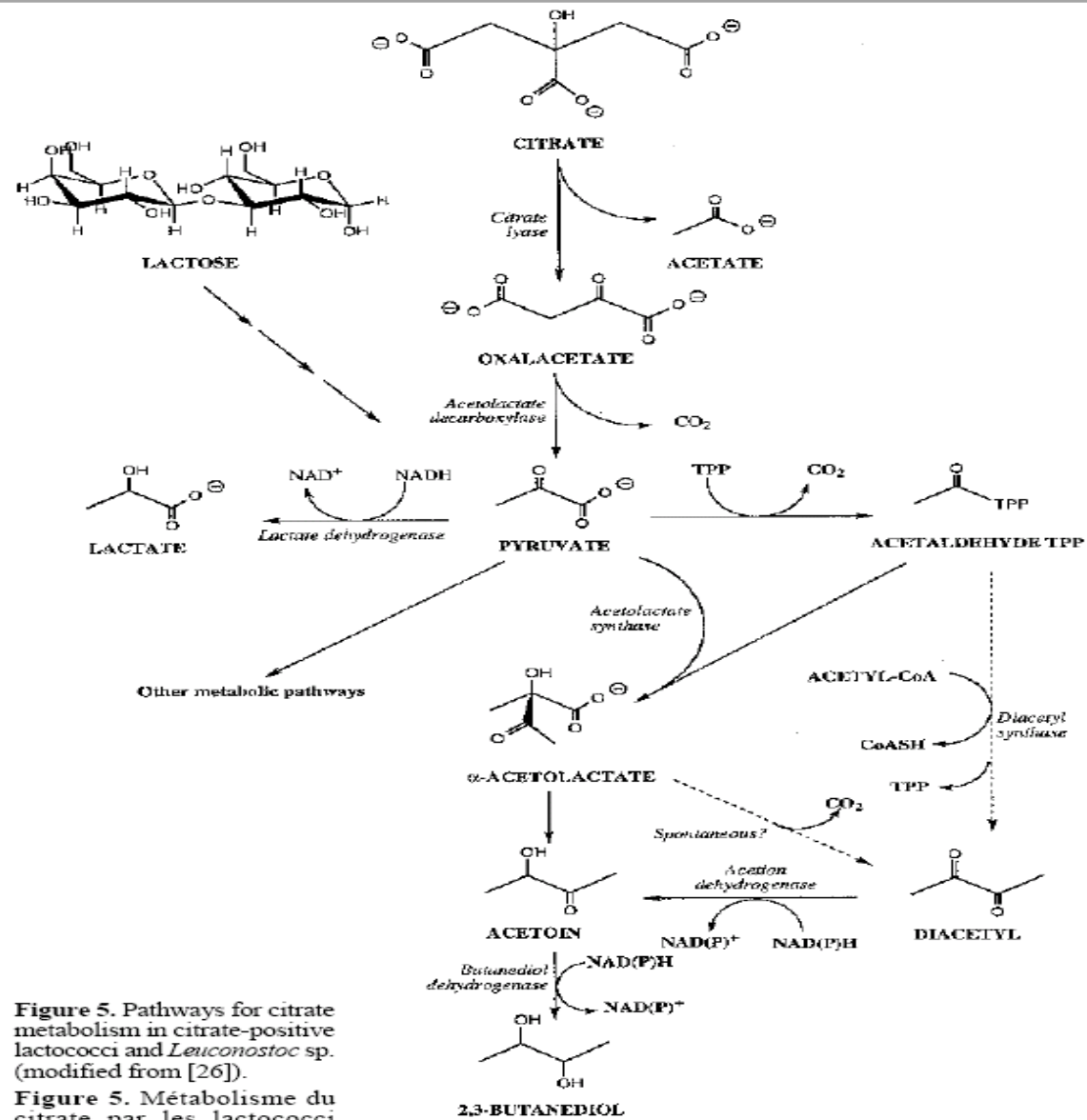


Figure 5. Pathways for citrate metabolism in citrate-positive lactococci and *Leuconostoc* sp. (modified from [26]).

Figure 5. Métabolisme du citrate par les lactococci citrate-positives et *Leuconostoc* sp. (d'après [26]).

МЕТАБОЛИЗАМ ЦИТРАТА

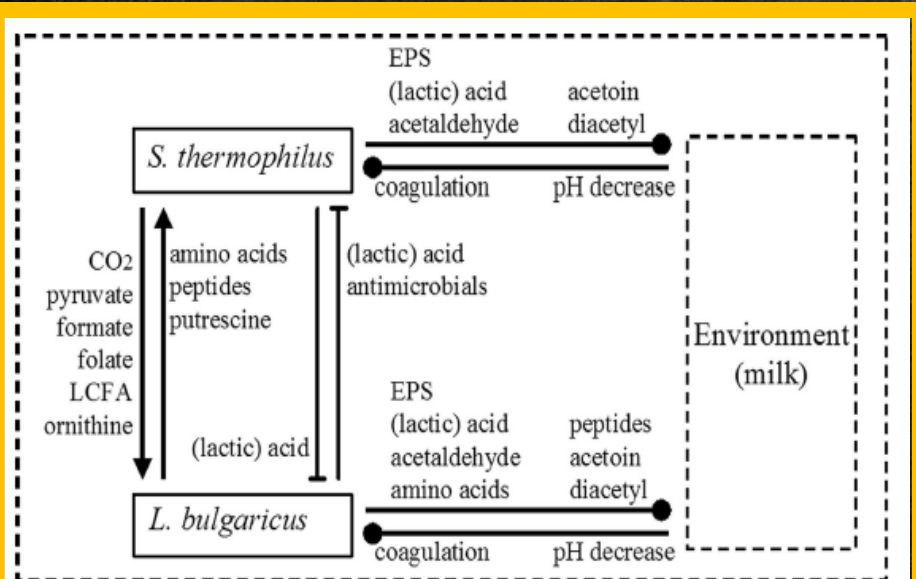


FIG. 1. Schematic representation of the validated and hypothesized interactions that occur between *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, their environment, and the compounds relevant for yogurt characteristics. ▼, positive interactions; ⊥, negative interactions; ●, interactions that do not specifically promote or decrease the growth of the other species. LCFA, long-chain fatty acids. See text for references.

КООПЕРАЦИЈА – ПРОТОКООПЕРАЦИЈА

јогуртна култура /*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* и *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*