

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego - Państwowy Instytut Badawczy
w Warszawie

mgr inż. Joanna Bucka-Kolendo

**Wpływ wysokiego ciśnienia, jako czynnika
stresowego, na zmiany zachodzące w polimorfizmie
genetycznym i proteomie bakterii fermentacji
mlekowej**

Influence of high hydrostatic pressure, as a stress factor, on changes in the
genetic polymorphism and proteome of lactic acid bacteria

Praca doktorska
Doctoral thesis

Promotor:

dr hab. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego –
Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Mikrobiologii

Promotor pomocniczy:

dr inż. Anna Otlewska
Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Recenzenci:

Prof. dr hab. Waldemar Gustaw
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Dr hab. Marcin Schmidt
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Warszawa, 2022

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania
Pani Promotor dr hab. inż. Barbarze Sokołowskiej, prof. IBPRS
za możliwość rozwoju, nieustające wsparcie, mobilizację i nieocenioną pomoc merytoryczną
przy pisaniu niniejszej pracy.*

*Dziękuję Dyrektorowi prof. dr hab. inż. Arturowi H. Świergielowi
za motywację i umożliwienie wykonania pracy.*

*Dziękuję współpracownikom IBPRS-PIB, w szczególności Koleżankom i Kolegom
z Zakładu Mikrobiologii za pomoc i miłą atmosferę.*

*Szczególne podziękowania składam mojej całej Rodzinie
za nieustające wsparcie, wyrozumiałość i pomoc.*

Pracę dedykuję moim córkom Zuzannie i Zofii Kolendo, oraz mojej Mamie.

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora.

Data.....

Podpis promotora pracy

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data.....

Podpis autora pracy

Streszczenie

Wpływ wysokiego ciśnienia, jako czynnika stresowego, na zmiany zachodzące w polimorfizmie genetycznym i proteomie bakterii fermentacji mlekowej

Wysokie ciśnienia hydrostatyczne (HHP ang. *High Hydrostatic Pressure*) są wykorzystywane przemysłowo do utrwalania produktów spożywczych oraz minimalizowania ilości drobnoustrojów. Bakterie kwasu mlekowego (LAB ang. *Lactic Acid Bacteria*), ze względu na zdolności adaptacyjne do różnych środowisk, stanowią bardzo ważną grupę mikroorganizmów o znaczeniu przemysłowym. Ponieważ LAB mogą stanowić grupę mikroorganizmów zarówno pożytecznych jak i psujących produkty spożywcze, poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za zdolności adaptacyjne i zachodzące w związku z tym zmiany w proteomie i genomie bakterii, jest niezwykle istotne.

Celem pracy było, ustalenie, czy wywołane przez wysokie ciśnienie hydrostatyczne zmiany na poziomie genetycznym i proteomicznym w bakteriach kwasu mlekowego, są związane z polimorfizmem wybranych genów odpowiedzi na stres HHP, oraz czy zmiany te są na tyle istotne, że mogą w konsekwencji skutkować odmienną identyfikacją tych bakterii.

W pracy wykorzystano szczepy bakterii kwasu mlekowego wyizolowane z produktów spożywczych. Klasyczną metodą posiewów płytkowych określono przeżywalność szczepów po działaniu HHP. Wykorzystując metody molekularne oparte na analizie sekwencji nukleotydowej genu *16S* rDNA i *pheS*, kodującego podjednostkę alfa syntazy fenyloalanylo-tRNA (Phe-tRNA), dokonano identyfikacji szczepów. Aby lepiej zrozumieć mechanizm odpowiedzi na stres HHP, do dalszych analiz wybrano trzy geny uczestniczące w tym procesie (*dnaK*, *ctsR*, *hrcA*).

Następnie, dokonano analizy wpływu HHP na zmiany w proteomie badanych szczepów LAB. Wywołane przez HHP zmiany w profilach widm mas białek, mogą bezpośrednio wpływać na różnicowanie i odmienną identyfikację szczepów metodami opartymi na analizie białek, takich jak MALDI-TOF MS (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*). Przeprowadzona analiza skupień (HCA ang. *Hierarchical Cluster Analysis*) oraz wielowymiarowego skalowania (MDS ang. *Multidimensional Scaling*) demonstrowały znaczące różnice między badanymi szczepami kontrolnymi i ciśnieniowanymi, co uniemożliwiło zgrupowanie bakterii ze względu na przynależność gatunkową lub podział na grupę kontrolną lub ciśnieniowaną.

W celu scharakteryzowania blisko spokrewnionych szczepów bakterii LAB, zastosowano porównanie metod różnicujących o różnej sile dyskryminującej, aby wybrać odpowiednie metody identyfikacji bakterii, co ma szczególne znaczenie dla blisko spokrewnionych szczepów *Lactobacillus* i może korelować ze zmianami w ich fenotypie. Wykazano, że w badanych szczepach LAB, gen *pheS* ma najwyższy stopień homologii (90-98%) i niską siłę dyskryminującą. Otrzymane metodą MALDI-TOF MS zróżnicowane wyniki identyfikacji niektórych szczepów, w porównaniu z wynikami analizy genomowej, opartej na genie *16S* rDNA, dowiodły, że w przypadku analizowanych szczepów, sekwencjonowanie *16S* rDNA było najbardziej wiarygodne i charakteryzowało się największą siłą

dyskryminacyjną spośród analizowanych metod. Stwierdzono, że znacznie większa ilość molekuł zaangażowanych w mechanizm odpowiedzi na HHP i wysoki poziom interakcji pomiędzy cząsteczkami *dnaK*, *ctsR* i *hrcA*, może również wpływać na wyniki identyfikacji oparte na analizie białek.

W trzecim etapie pracy określono wpływ HHP na ekspresję genów *dnaK*, *ctsR*, *hrcA*, gdzie zaindukowane w ekspresji genów zmiany, mogą prowadzić do rozregulowania procesów biologicznych LAB. Otrzymane wyniki wykazały zróżnicowany poziom ekspresji genów, a zaobserwowane różnice wynikające z działania ciśnienia, pozwoliły wyciągnąć wniosek, że badane szczepy zachowują żywotność, ale indukowane są zmiany na poziomie transkryptomu. Zmiany ekspresji *dnaK*, *ctsR*, *hrcA* skorelowano z polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (SNP ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) w tych genach, i określono możliwość oddziaływania pojedynczych mutacji nukleotydowych na funkcjonowanie mechanizmu odpowiedzi na stres i zdolności adaptacyjne bakterii w warunkach działania wysokiego ciśnienia. Wpływ HHP na różnice w rozkładzie efektów przystosowania oraz efekty przystosowania mutacji synonimicznych i niesynonimicznych są ważne dla określenia, które zmiany przyczynią się do adaptacji bakterii do danego środowiska. Uzyskane wyniki SNP miały charakter neutralny, a niski stosunek Ka/Ks (stosunek podstawień niesynonimicznych do podstawień synonimicznych) wskazywał, że mutacje niesynonimiczne w niewielkim stopniu oddziaływały na żywotność komórek. Jednocześnie, faworyzowanie różnych białek związanych ze zmianami środowiskowymi, może wynikać z reakcji mechanizmu adaptacyjnego. Mutacje synonimiczne i niesynonimiczne wynikające z przystosowania bakterii do zmian środowiska, są ważnym elementem mechanizmu odpowiedzi na stres.

Podsumowując, ustalenie wpływu HHP na stopień polimorfizmu, filogenezę i zmienność genomową i proteomiczną LAB, stanowi ważny problem badawczy ze względu na szerokie rozpowszechnienie tych bakterii i różnorodne ich zastosowanie w przemyśle. Zrozumienie mechanizmów adaptacyjnych LAB pozwoli na właściwe postępowanie z tymi bakteriami, zarówno w celach umożliwiających ich wykorzystanie w biotechnologii i medycynie, ale również tam, gdzie są one niepożądane ze względu na właściwości psujące produkty. Wskazane są dalsze badania nad zmiennością wynikającą z wpływu czynników zewnętrznych oraz analizy dalszych, możliwych dróg ewolucyjnych, szczególnie pod kątem zdolności adaptacyjnych do różnych środowisk. Badania nad mechanizmami adaptacyjnymi LAB na różne warunki stresowe, jak i ich potencjał w trakcie przetwarzania i przechowywania żywności, są bardzo ważne ze względu na określenie podatności na zmiany warunków technologicznych, które mogą mieć poważny wpływ, na jakość i bezpieczeństwo żywności. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wyraźnie pokazują, w jak zróżnicowany sposób LAB reagują na zmiany wywołane działaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Na podstawie przeprowadzonych badań określono, że HHP wpływa na struktury genetyczne i proteomiczne badanych bakterii.

Przeprowadzona analiza polimorfizmu SNP wybranych genów związanych ze stresem pozwoliła stwierdzić, że zaistniałe w wyniku działania HHP mutacje są neutralne i w niewielkim stopniu oddziałują na żywotność komórek.

Zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki badań znacząco podnoszą zakres wiedzy na temat wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na aspekty genetyczne i proteomiczne bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i ich mechanizmów adaptacyjnych. Mogą pomóc w lepszym zrozumieniu działania HHP, jako czynnika utrwalającego żywność, na bakterie kwasu mlekowego i ich zdolności adaptacyjne.

Słowa kluczowe: bakterie kwasu mlekowego (LAB), wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP), polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP), MALDI-TOF MS, gen *dnaK*, *hrcA*, *ctsR*

Abstract

Influence of high hydrostatic pressure, as a stress factor, on changes in the genetic polymorphism and proteome of lactic acid bacteria

High Hydrostatic Pressures (HHP) are used in the food industry to preserve products and minimize the number of microbes. Lactic acid bacteria (LAB), due to their adaptability to various environments, are found to be an essential group of microorganisms of industrial importance. Since LABs can constitute a group of microorganisms, both beneficial and spoilage of food products, it is crucial to understand the mechanisms responsible for the adaptive abilities and the consequent changes in the proteome and genome of bacteria.

The study aimed to determine whether the changes caused by high hydrostatic pressure at the genetic and proteomic levels in lactic acid bacteria are related to the polymorphism of selected stress response genes and whether the changes are significant enough to result in a different identification of these bacteria.

At work, lactic acid bacteria isolated from food products were used. The survival of the strains after the HHP treatment was determined by the classical method of plate inoculation. Strains were identified using molecular techniques based on the analysis of the nucleotide sequence of the *16S* rDNA gene and *pheS*, encoding the alpha subunit of phenylalanyl-tRNA synthase (Phe-tRNA). To better understand the mechanism of the HHP stress response, three genes involved in this process (*dnaK*, *ctsR*, *hrcA*) were selected for further analysis.

Then, the influence of HHP on changes in the proteome of the tested LAB strains was analyzed. HHP-induced changes in protein mass spectral profiles can directly influence the differentiation and different identification of strains by methods based on protein analysis, such as MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry). The performed cluster analysis (HCA) and multidimensional scaling (MDS) (Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) demonstrated significant differences between the tested control and pressure strains, making it impossible to group bacteria due to species affiliation or division into a control or pressure group.

To characterize closely related LAB bacterial strains, a comparison of differentiating methods with different discriminating strengths was used to select appropriate methods of bacterial identification, which is of particular importance for closely related *Lactobacillus* strains and may correlate with changes in their phenotype. In the tested LAB strains, the *pheS* gene has the highest degree of homology (90-98%) and low discriminating power. The different results of identification of some strains obtained by the MALDI-TOF MS method, compared to the results of the genomic analysis based on the *16S* rDNA gene, proved that in the case of the analyzed strains, *16S* rDNA sequencing was the most reliable and had the highest discriminant power among the analyzed methods. In addition, it was found that the

much larger number of molecules involved in the HHP stress response mechanism and the high level of interaction between *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* molecules could also influence the protein-based identification methods used.

In the third stage of the work, the influence of HHP on the expression of *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* was determined, where changes induced in gene expression may lead to dysregulation of LAB biological processes. The obtained results showed a different level of gene expression, and the observed differences resulting from the effect of pressurization allowed to conclude that the tested strains remain viable, but changes are induced at the transcriptome level. Changes in the expression of *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* were correlated with the Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in these genes. The possibility of the influence of single nucleotide mutations on the functioning of the stress response mechanism and adaptability of bacteria under high pressure conditions was determined. The impact of HHP on differences in the distribution of adaptation effects and the adaptation effects of synonymous and non-synonymous mutations are important in determining which changes will contribute to the adaptation of bacteria to a given environment. The obtained SNP results were neutral, and the low K_a / K_s ratio (ratio of nonsynonymous to synonymous substitutions) indicated that nonsynonymous mutations had little effect on cell viability. At the same time, favoring different proteins related to environmental changes may result from the response of the adaptive mechanism. Therefore, synonymous and non-synonymous mutations resulting from the adaptation of bacteria to environmental changes are a critical element of the stress response mechanism.

Summing up, determining the influence of HHP on the degree of polymorphism, phylogenesis, and genomic and proteomic variability of LAB is undoubtedly an important research problem due to the wide distribution of these bacteria and various industrial applications. Understanding the adaptive mechanisms of LABs will allow for better management of these bacteria, both for purposes enabling their use in biotechnology and medicine and where they are undesirable due to their spoilage properties. Further research is required on the variability resulting from the influence of external factors and the analysis of other possible evolutionary paths, especially in terms of adaptability to different environments. Research on LAB adaptive mechanisms to various stress conditions and their durability during food processing and storage is essential due to the determination of susceptibility to technological changes, which may severely impact food quality and safety. The results obtained in this study clearly show how differently the LABs respond to changes caused by the action of high hydrostatic pressure. Based on the conducted research, it was determined that HHP influences the genetic and proteomic structures of the tested bacteria.

The analysis of the SNP polymorphism of selected stress-related genes allowed to conclude that the mutations occurring due to HHP activity are neutral and have little effect on cell viability.

The research results presented in this dissertation significantly increase the scope of knowledge on the influence of high hydrostatic pressure on the genetic and proteomic aspects of *Lactobacillus* bacteria

and their adaptation mechanisms. In addition, they can help better understand the effects of HHP as a food preservative on lactic acid bacteria and their adaptability.

Keywords: lactic acid bacteria (LAB), high hydrostatic pressure (HHP), single nucleotide polymorphism (SNP), MALDI-TOF MS, gene *dnaK*, *hrcA*, *ctsR*.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	13
2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA.....	14
3. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA.....	16
3.1 Bakterie kwasu mlekowego.....	16
3.1.1. Klasyfikacja i charakterystyka	16
3.2. Metody utrwalania	17
3.3. Identyfikacja LAB	18
3.3.1. Molekularne techniki identyfikacji LAB.....	18
3.3.2. Proteomiczne techniki identyfikacji LAB	19
3.4. Fizjologia odpowiedzi LAB na stres.....	20
3.4.1. Mechanizmy odpowiedzi na stres.....	22
3.4.2. Regulacja odpowiedzi na stres	24
3.4.3. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu SNP w genach <i>dnaK</i> , <i>hrcA</i> , <i>ctsR</i>	26
4. HIPOTEZY I CEL PRACY	29
4.1. HIPOTEZY	29
4.2. CEL PRACY	30
5. ZAKRES WYKONYWANYCH BADAŃ.....	31
6. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ BADAWCZYCH PRZEDSTAWIONYCH DO OCENY ...	36
7. REALIZACJA CELÓW, WERYFIKACJA HIPOTEZ i WNIOSKI.....	41
8. BIBLIOGRAFIA	45
9. CYKL PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ	52
10. OŚWIADCZENIA.....	112
11. DOROBEK NAUKOWY	120

ANEKS

WYKAZ SKRÓTÓW

AAI – average amino acid identity/ średnia tożsamość aminokwasowa

ANI – average nucleotide identity/ średnia tożsamość nukleotydowa

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool/ lokalne przyrównywanie sekwencji aminokwasów białek lub nukleotydów DNA

cAAI – core-gene average amino acid identity/ średnia tożsamość aminokwasowa genów rdzeniowych

CIRCE – Controlling Inverted Repeat for Chaperon Expression/ konserwatywne odwrócone powtórzenia dla ekspresji chaperonów

EPS – exopolysaccharides/ egzopolisacharydy

HCA – hierarchical cluster analysis/ hierarchiczna analiza skupień

HCCA – α -cyano-4-hydroxycinnamic acid /kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy

HHP – high hydrostatic pressure/ wysokie ciśnienie hydrostatyczne

Ka/Ks – ratio of nonsynonymous to synonymous substitutions/stosunek podstawień niesynonimicznych do podstawień synonimicznych

LAB – lactic acid bacteria/ bakterie kwasu mlekowego

MALDI-TOF MS – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry/ spektrometria mas (MS) z analizą czasu przelotu metodą desorpcji/jonizacji laserowej wspomaganej matrycą

MDS – multidimensional scaling/ skalowanie wielowymiarowe profili widm mas

MRS Agar – De Man, Rogosa, Sharpe Agar/ selektywna pożywka do hodowli Lactobacilli

MSP – mass spectra profile/ profil widm mas

NCBI – The National Centre for Biotechnology Information/ Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej

NSS – non-synonymous substitution/ podstawienia niesynonimiczne

OCS – One-Component Systems/ system jednoskładnikowy

pheS – gen kodujący podjednostkę alfa syntazy fenyloalanylo-tRNA (Phe-tRNA)

PPI – protein-protein interaction/ interakcja białko-białko

qRT-PCR – quality Real Time – PCR/ PCR ilościowy w czasie rzeczywistym

SNP – single nucleotide polymorphysm/ polimorfizm pojedynczego nukleotydu

SS – synonymous substitutions/ podstawienia synonimiczne

STRING – a Search Tool for the Retrieval of Instances of Neighbouring Genes/ narzędzie do wyszukiwania przykładowych sąsiadujących genów

TCS – Two-Component Systems/ system dwuskładnikowy

UBA – Universal Beer Agar/ uniwersalna pożywka agarozowa do izolacji mikroorganizmów z piwa

UPGMA – unweighted pair group method with arithmetic mean/ aglomeracyjna hierarchiczna metoda grupowania

VBNC – viable but nonculturable / żywe, ale niehodowalne

WGS – whole genome sequencing/ sekwencjonowanie całego genomu

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelni biblioteki Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie.

.....
(czytelny podpis autora)

1. WSTĘP

Bakterie kwasu mlekowego (LAB ang. Lactic Acid Bacteria) są ważnymi mikroorganizmami probiotycznymi, starterowymi, komensalnymi i patogennymi. Dogłębne badania dotyczące fizjologii stresu LAB są w dużej mierze spowodowane technologicznymi implikacjami oporności tych bakterii w procesach stosowanych w przemyśle spożywczym, przeżywalności u gospodarza i zachowań stresowych. w naturalny sposób są one wystawione na różnego rodzaju czynniki stresowe (temperatura, pH, tlen, etc.), co może przyczyniać się do uzyskania przez nie dużych zdolności adaptacyjnych. Zmiany w środowisku mogą wywołać aktywację mechanizmów adaptacyjnych, a co za tym idzie zmiany w genomie, proteomie, transkryptomie czy metabolomie prowadzące do uszkodzeń i śmierci komórki. Wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP ang. High Hydrostatic Pressure), jako nietermiczna metoda utrwalania produktów spożywczych, zmniejsza liczbę drobnoustrojów zapewniając jednocześnie „świeżą” żywność. Dotychczas nie ma wielu doniesień naukowych, w jaki sposób HHP wpływa na LAB, a duża i wciąż rosnąca liczba znanych gatunków należących do tej grupy oraz ich różnorodność biochemiczna i genetyczna sprawia, że klasyfikacja taksonomiczna i różnicowanie nie jest zadaniem łatwym.

Głównym powodem podjęcia niniejszego tematu badawczego było, lepsze zrozumienie zależności między fizjologią bakterii kwasu mlekowego, a działaniem mechanizmów związanych ze stresem. Dokładność identyfikacji blisko spokrewnionych gatunków LAB wymaga zastosowania narzędzi o wysokim poziomie dyskryminacji, szczególnie przy zmiennych parametrach hodowli, które mogą skutkować zmianami na poziomie transkryptomu i proteomu i stanowić dużą przeszkodę we właściwej identyfikacji mikroorganizmów. Analiza molekularna mechanizmów związanych ze stresem pozwala na opracowanie narzędzi do badań przesiewowych pod kątem szczepów tolerancyjnych lub wrażliwych oraz oceny zdolności adaptacyjnych szczepów do trudnych warunków. Polimorfizm genów, który może wynikać z działania HHP może wpłynąć na zmiany w procesach transkrypcji i translacji, które determinują ekspresję genów i wpływają na zmiany sekwencji aminokwasowej białka.

Podsumowując, odpowiedź na stres u bakterii fermentacji mlekowej pod wpływem działania HHP jest procesem bardzo złożonym i zarazem dotychczas mało poznanym. Wyjaśnienie tych zależności może być związane ze złożonością mechanizmów odpowiedzi na stres w szczepach LAB, a zrozumienie mechanizmów regulujących odpowiedź oraz przystosowania szczepów LAB do trudnych warunków środowiskowych, jest ważne dla ulepszenia strategii przemysłowych z wykorzystaniem szczepów LAB i HHP.

2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO PRZEDKŁADANEGO DO OCENY

Na cykl publikacji stanowiących rozprawę doktorską pt.: „Wpływ wysokiego ciśnienia, jako czynnika stresowego, na zmiany zachodzące w polimorfizmie genetycznym i proteomie bakterii fermentacji mlekowej” składa się spójny tematycznie zbiór 5 publikacji zgodny z wymaganiami art. 13 ust. 2 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 ze zm.):

1. **Bucka-Kolendo Joanna**, Sokołowska Barbara (2017) Lactic acid bacteria stress response to preservation processes in beverage and juice industry. *Acta Biochimica Polonica*, vol.63, 3, 459-464. DOI:10.18388/abp.2017_1496. (IF₂₀₁₇ = **1,239**; MNiSW₂₀₁₇ = **15**). Liczba cytowań wg Scopus = 24
Mój udział w realizacji przedstawionej publikacji wynosi 80% i obejmuje: opracowanie koncepcji pracy, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje oraz korespondencję z redakcją – autor korespondencyjny.
2. **Bucka-Kolendo Joanna**, Sokołowska Barbara, Winiarczyk Stanisław (2020) Influence of High Hydrostatic Pressure on the Identification of *Lactobacillus* by MALDI-TOF MS Preliminary Study. *Microorganisms*, 8(6), 813. DOI: 10.3390/microorganisms8060813. (IF₂₀₂₀ = **4,128**; MNiSW₂₀₂₀ = **20**). Liczba cytowań wg Scopus = 8
Mój udział w realizacji przedstawionej publikacji wynosi 90% i obejmuje: opracowanie koncepcji pracy, analizy mikrobiologiczne, analizy statystyczne i bioinformatyczne, opracowanie i interpretację wyników, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje oraz korespondencję z redakcją – autor korespondencyjny.
3. **Bucka-Kolendo Joanna**, Sokołowska Barbara (2021) Porównanie metod identyfikacji bakterii *Lactobacillus*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2 (127), 49-60. DOI: 10.15193/zntj/2021/127/377. (MEiN = **20**).
Mój udział w realizacji przedstawionej publikacji wynosi 90% i obejmuje: opracowanie koncepcji pracy, analizy mikrobiologiczne i genetyczne, analizy statystyczne i bioinformatyczne, opracowanie i interpretację wyników, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje oraz korespondencję z redakcją – autor korespondencyjny.

4. **Bucka-Kolendo Joanna**, Juszcuk-Kubiak Edyta, Sokołowska Barbara (2021) Effect of High Hydrostatic Pressure on Stress-Related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* Expression Patterns in Selected *Lactobacilli* Strains. *Genes*, 12 (11), 1720. DOI: 10.3390/genes12111720. (IF₂₀₂₁ = **4,141**; MEiN = **100**). Liczba cytowań wg Scopus = 1

Mój udział w realizacji przedstawionej publikacji wynosi 85% i obejmuje: opracowanie koncepcji pracy, analizy mikrobiologiczne i genetyczne, analizy statystyczne i bioinformatyczne, opracowanie i interpretację wyników, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje oraz korespondencję z redakcją – autor korespondencyjny.

5. **Bucka-Kolendo Joanna**, Sokołowska Barbara (2022) Impact of High Hydrostatic Pressure (HHP) on the Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) of stress-related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* in the *Lactobacillus* strains. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, Vol. 14 No. 4: 54-66, DOI:10.15586/qas.v14i4.1132 (IF₂₀₂₁= **1,672**; MEiN = **40**).

Mój udział w realizacji przedstawionej publikacji wynosi 90% i obejmuje: opracowanie koncepcji pracy, analizy mikrobiologiczne i genetyczne, analizy statystyczne i bioinformatyczne, opracowanie i interpretację wyników, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje oraz korespondencję z redakcją – autor korespondencyjny.

Spójny tematycznie zbiór publikacji stanowiący podstawę do ubiegania się o tytuł doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, zawiera 5 publikacji o łącznym współczynniku **IF = 11,18** dla roku publikacji, oraz **195 pkt MNiSW/MEiN**.

Oświadczenie współautorów o ich udziale w realizacji materiału naukowego przedstawionego w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską zawarto w **Punkcie 10**.

3. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

3.1. Bakterie kwasu mlekowego

3.1.1. Klasyfikacja i charakterystyka

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) należą do grupy najlepiej zbadanych mikroorganizmów, ze względu na wykorzystanie w produkcji żywności oraz w medycynie. Na przestrzeni ostatnich 30, 40 lat, fizjologia, biochemia, genetyka i ewolucja LAB była elementem zainteresowań naukowców na całym świecie [1]. Na początku taksonomia LAB opierała się na cechach morfologicznych i fizjologicznych. Są to bakterie Gram-dodatnie, nietworzące przetrwalników, mikroaerofilne lub beztlenowe, które wytwarzają kwas mlekowy, jako główny produkt końcowy fermentacji cukru, nie posiadają katalazy i cytochromów, tolerują zarówno obecność tlenu, jak i kwasów. LAB generalnie mają niską zawartość GC (50 mol %), jednak niektóre pałeczki kwasu mlekowego osiągają do 57 mol% [2]. Spośród LAB najczęściej wiązane z żywnością rodzaje to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* i *Weissella*. Chociaż uważa się, że LAB są heterogeniczną grupą bakterii i może nie istnieć ich uniwersalna definicja, wykazano, że wszystkie wyżej wymienione rodzaje oddzieliły się od wspólnego przodka. Bakterie LAB są w stanie stworzyć bakteriostatyczne, a nawet bakteriobójcze środowisko dla bakterii psujących i chorobotwórczych poprzez obniżenie pH matrycy podczas fermentacji mlekowej. Fermentacja mlekowa w połączeniu z odpowiednimi procesami technologicznymi prowadzi do powstania bezpiecznych produktów spożywczych o wydłużonym okresie przydatności do spożycia. Odgrywają one również ważną rolę w rozwoju właściwości organoleptycznych produktów fermentowanych, poprzez swoją aktywność metaboliczną (np. lipolizę i proteolizę), wytwarzając ważne związki zapachowe i smakowe (acetoina, diacetyl), mogą również przyczyniać się do zmian w teksturze produktów spożywczych (np. poprzez produkcję egzopolisacharydów – EPS ang. exopolysaccharides) [1]. Długotrwała ewolucja LAB, adaptacja do różnych środowisk, i wynikające z tego zmiany w genomach i szlakach metabolicznych doprowadziła do powstania auktotroficznych szczepów LAB, które utraciły różne szlaki biosyntezy. Z drugiej strony, pozyskiwanie genów pozwoliło na uzyskanie ważnych właściwości technologicznych [3]. Ciągła presja selekcyjna na wysokiej jakości produkty, wywierana przez konsumentów, doprowadziła do powstania dzisiejszych szczepów. Jednak nie wszystkie LAB są związane z fermentacją żywności, nawet powierzchowne badanie taksonomii LAB ujawnia, że kilka gatunków to komensale i patogeny. Fakt ten nie zawsze znajdował odzwierciedlenie w literaturze. Często mikrobiologia

i technologia żywności skupia się na pożytecznych LAB, pozostawiając patogenne LAB, niezależnie od leżących u ich podstaw relacji filogenetycznych. Należy pamiętać, że probiotyczne szczepy LAB mogą pochodzić z fermentowanej żywności lub mogą być komensalami. Niemniej jednak istnieje kilka groźnych oportunistycznych patogennych LAB, tj. komensali, które mogą stać się zjadliwe w odpowiednich warunkach. Gatunki takie występują głównie w rodzajach *Streptococcus* i *Enterococcus* [4]. Jednocześnie niektóre LAB mogą wytwarzać w napojach i sokach diacetyl, który nadaje tym produktom gorzki smak i aromat [5]. Bakterie *Leuconostoc mesenteroides* i *Weisella confusa* mogą syntetyzować związki, które powodują ciągliwość produktu końcowego, jak piwo [6]. W napojach alkoholowych mogą wpływać na gorzki smak poprzez przekształcanie glicerolu w aldehyd 3-hydroksypropionowy, który może przekształcić się w akroleinę i wiązać się z polifenolami tworząc gorzkie związki [7,8,9].

3.2. Metody utrwalania

Techniki fizycznego utrwalania żywności stosuje się w celu zmniejszenia liczby lub zapobiegania rozwojowi niepożądanego mikroflory w produktach [9]. Tradycyjne techniki prewencyjne stosowane w przemyśle napojów obejmują obróbkę termiczną i filtrację. Obróbka termiczna jest najbardziej wydajną techniką utrwalania żywności. Może zapobiegać nie tylko wzrostowi niepożądanego mikroflory, ale także tłumić niepożądaną aktywność enzymatyczną [6]. Procesy wykorzystujące wysokie temperatury niszczą wiele związków bioaktywnych i aromatycznych, powodując modyfikację smaku, koloru i wartości odżywczej. Wzrost zapotrzebowania konsumentów na „świeżą” żywność niesie nowe wyzwania dla technik stosowanych w konserwacji żywności. Obecnie coraz częściej stosuje się techniki wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP), ponieważ mogą one zmniejszyć liczbę drobnoustrojów w płynnych produktach spożywczych, takich jak napoje, soki, napoje alkoholowe – piwo, wino czy cydr [5]. Wiele czynników wpływających na bakterie podczas procesu utrwalania może być dla nich potencjalnymi efektorami stresu. Wysokie ciśnienie hydrostatyczne może wywołać w bakteriach zmiany, fizjologiczne [10,11], w ekspresji genów [12,13,14], w transkrypcji białek [15,16], oraz może prowadzić do uszkodzenia komórek [17] i śmierci [18,19]. HHP nie powoduje zerwania wiązań kowalencyjnych, dzięki temu podstawowa struktura białek i kwasów tłuszczowych pozostaje nienaruszona [20,21]. Cząsteczki, takie jak witaminy, aminokwasy, związki smakowe i inne małe cząsteczki pozostają nietknięte przez HHP, podobnie jak właściwości organoleptyczne żywności. W wyniku działania HHP niektóre

białka ulegają indukcji, a kilka z nich jest również zaangażowanych w różnego rodzaju reakcje na stres, w tym – ochronę krzyżową [22,23]. Bakterie LAB nie są w naturalnych środowiskach narażone na HHP, dlatego nie można oczekiwać odpowiedzi stresowej na ten czynnik [24]. Zdolność bakterii do reagowania na HHP można wyjaśnić systemem ochrony krzyżowej na różne czynniki stresowe [5,19,24]. Odpowiedź LAB w zakresie ochrony krzyżowej na HHP nie jest jeszcze dobrze udokumentowana w literaturze. U *Lactobacillus plantarum* zaobserwowano wyższą wrażliwość na HHP przy jednoczesnym zastosowaniu szoku cieplnego. Jak wykazała Sokołowska i wsp., [25,26] LAB należą do grupy organizmów odpornych na działanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego i mogą być stosowane, jako organizmy taksonomiczne do oceny trwałości produktów utrwalanych tymi metodami [27].

3.3. Identyfikacja LAB

3.3.1. Molekularne techniki identyfikacji LAB

Wiedza o LAB została zrewolucjonizowana wraz z rozwojem sekwencjonowania genomu, oraz w ostatnich latach razem z rozwojem nauk meta – omicznych, które pozwalają na monitorowanie ich zachowania w złożonych środowiskach oraz kompleksach mikroorganizmów. Zarówno gen *16S* rRNA, jak i filogeneza całego genomu ujawniły, że „rdzeniowe” gatunki LAB tworzą odrębną gałąź *Lactobacillales* w klasie *Bacilli* z gromady *Firmicutes* [1,3,28,29]. Od 1983 r., jako podstawę klasyfikacji i nomenklatury w taksonomii bakterii stosuje się podobieństwo genów *16S* rRNA.

W 2020 r. Zheng i wsp., w swojej pracy [30] dokonali ponownej oceny pokrewieństwa genetycznego i filogenezy gatunków w obrębie obecnego rodzaju *Lactobacillus* i jego pokrewnych taksonów *Lactobacillaceae* i *Leuconostocaceae*. w zaproponowanej re-klasyfikacji wzięto pod uwagę średnią tożsamość nukleotydów (ANI ang. average nucleotide identity), średnią tożsamość aminokwasów (AAI ang. average amino acid identity), średnią tożsamość aminokwasów w genach rdzenia (cAAI ang. core-gene average amino acid identity), filogenezę genomu rdzenia, geny sygnaturowe oraz kryteria metaboliczne lub ekologiczne. Tożsamość sekwencji genów *16S* rRNA i wartości AAI pozwoliła na łatwe przypisanie nowych gatunków do jednego z 26 rodzajów *Lactobacillaceae*. Stwierdzono, że gatunki, które wykazują identyczność genu *16S* rRNA, która jest większa niż 94,5%, w stosunku do typowego rodzaju i jest integralna z tym rodzajem przy użyciu filogenezy genu *16S* rRNA, są ogólnie przypisywane prawidłowo, nawet przy braku dalszych analiz. Jednakże, tożsamość genów i filogeneza *16S* rRNA powinny być uzupełnione filogenezą genomu rdzenia w połączeniu

z analizą podobieństwa całego genomu, aby potwierdzić taksonomię na poziomie rodzaju. Wykorzystanie genów konstytutywnych staje się alternatywą dla przewyciężenia tych problemów [31,32,33]. Badania *in silico* oparte na kompletnych genomach dostarczyły podstaw do stworzenia zestawów genów konstytutywnych, które mogą dokładnie przewidywać pokrewieństwo genomu i poprawiać dokładność identyfikacji gatunków. Zapotrzebowanie na alternatywne markery genomowe, które zapewniają wyższy poziom dyskryminacji niż gen *16S* rRNA, doprowadziło do bardziej systematycznego sekwencjonowania i identyfikowania blisko spokrewnionych gatunków.

Ponieważ geny markerowe powinny dostarczać informacji z odpowiednim stopniem ufności oraz zapewnić wystarczającą zmienność różnicowania gatunków w obrębie danego rodzaju, muszą być obecne w jednej kopii, ewoluować szybciej niż geny rRNA i być szeroko rozpowszechnione wśród genomów bakteryjnych [34]. Jedną z takich alternatyw dla sekwencjonowania genu *16S* jest analiza genu *pheS*, kodującego podjednostkę alfa syntazy fenyloalanylo-tRNA (Phe-tRNA). Analiza sekwencji genu *pheS*, uznawana jest za wiarygodną metodę dyskryminującą [31,35,36], i jest obecnie powszechnie stosowanym narzędziem do identyfikacji bakterii LAB. W ostatnich latach, sekwencjonowanie całych genomów (WGS ang. Whole Genome Sequencing) stało się powszechnie dostępne, a średnie tożsamości nukleotydów (ANI) genów wspólnych dla dwóch genomów bakteryjnych zostały wprowadzone, jako złoty standard do wyznaczania nowych gatunków bakterii.

3.3.2. Proteomiczne techniki identyfikacji LAB

Idea klasyfikacji i identyfikacji bakterii metodą spektrometrii mas (MS) z analizą czasu przelotu metodą desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganej matrycą (MALDI-TOF ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) do analizy dużych biomolekuł [37], był przełomem w analizie złożonych układów biologicznych, takich jak komórki bakteryjne [37]. Ze względu na sukces w diagnostyce medycznej wprowadzenie MALDI-TOF MS uważa się za „postępującą rewolucję w bakteriologii” [38]. Pozwoliło to na szerokie zastosowanie MALDI-TOF MS także w kontroli jakości produkcji żywności oraz w przemyśle farmaceutycznym i biotechnologicznym, a także w badaniach ekologicznych i środowiskowych oraz systematyce. Technika ta zapewnia wyraźnie identyfikowalne widma jonów molekularnych w nienaruszonych komórkach makrocząsteczek. Widma mas MALDI-TOF bakterii mają największe znaczenie taksonomiczne i odtwarzalność, gdy dominują w nich piki białek

rybosomalnych. Analiza „odcisku palca” białek rybosomalnych, charakterystycznych dla danej rodziny, rodzaju, gatunku, a nawet dla poszczególnych szczepów, umożliwia identyfikację profili widm mas badanych szczepów, poprzez porównanie ich z biblioteką zawierającą referencyjne widma odniesienia - superspektra [39]. Ograniczenia w identyfikacji MALDI-TOF MS blisko spokrewnionych gatunków, jak w przypadku LAB, mogą wynikać z braku referencyjnych widm mas w bazie danych przynależnej do aparatu, z błędów technicznych powstałych podczas przygotowania próbki do analizy lub z różnych warunków hodowlanych, które mogą oddziaływać na wynik analizy [34,40]. Jakość widm, ich odtwarzalność i dokładność mas muszą być znacznie wyższe w przypadku różnicowania szczepów, niż w przypadku identyfikacji na poziomie gatunku. Różnicowanie i identyfikacja taksonomiczna dobrze zdefiniowanych gatunków bakterii jest niewątpliwie mocną stroną MALDI-TOF MS, w porównaniu z wydajnością analizy sekwencji genów *16S* rRNA. Odchylenie od optymalnych warunków hodowli może powodować powstawanie białek stresu, które mogą dominować w widmach mas. Takie ograniczenie może stanowić dużą przeszkodę we właściwej identyfikacji mikroorganizmów, szczególnie nowych, nie występujących w danej bazie danych [39]. Zmiana parametrów wzrostu może skutkować zanikiem specyficznych dla szczepu różnic widm mas w taki sposób, że nie można rozpoznać pojedynczych szczepów [37,41].

3.4. Fizjologia odpowiedzi LAB na stres

LAB, podobnie jak inne mikroorganizmy, są narażone na stresujące warunki, zarówno na stesy abiotyczne, jak i biotyczne [1]. Stesy biotyczne występują u gospodarza lub w złożonych ekosystemach. Natomiast do stresów abiotycznych zaliczane są głównie te powstające podczas produkcji żywności i tworzenia kultur starterowych lub probiotycznych. Na przestrzeni lat przyjęto szereg podejść eksperymentalnych do badania fizjologii stresu bakteryjnego. W praktyce stres definiuje się jako stan, który powoduje zmniejszony wzrost lub przeżycie komórek bakteryjnych. Testy wzrostu i przeżycia wymagają wcześniejszego określenia optymalnych warunków, które mają być użyte jako kontrole dla porównania. Obecnie uważa się, że stres to każde przejście komórki bakteryjnej z jednego stanu w drugi, które powoduje zmiany w genomie, transkryptomie, proteomie i/lub metabolomie komórki, prowadzące do zmniejszenia potencjału wzrostu lub przeżycia [42]. Pod wpływem stresu komórki przystosowują się poprzez odpowiednie reakcje molekularne, próbując złagodzić negatywne skutki i przywrócić potencjał wzrostu lub przeżycia. Podczas gdy adaptacja jest ogólnym terminem opisującym wysiłek organizmu, aby oprzeć się i przetrwać pod wpływem

stresu, jest ona również powiązana ze specyficzną konfiguracją eksperymentalną, w której komórki są przejściowo wystawione na łagodne nieśmiertelne warunki stresowe, które skutkują zwiększoną przeżywalnością. Ten rodzaj reakcji adaptacyjnej jest najczęściej wyzwalany szybko, w ciągu pierwszych minut lub godzin od ekspozycji na łagodny stres. Istnieją dwie główne odmiany tego typu eksperymentów. Pierwszy, komórki można pozostawić w nieoptymalnych warunkach znacznie dłużej niż jest to konieczne do wywołania adaptacji. Ten rodzaj jest najlepiej opisany jako habituacja, termin rzadko używany dla LAB [1,43]. Mechanizmy molekularne leżące u podstaw przejściowej adaptacji i habituacji do określonego stresu mogą w pewnym stopniu pokrywać się, ale nie są całkowicie identyczne. Może to wyjaśniać szereg sprzecznych wyników uzyskanych dla niektórych gatunków LAB, ponieważ te dwie odpowiedzi były czasami uważane za identyczne.

Alternatywnie, komórki są przejściowo przystosowywane do stresu, a śmiertelna prowokacja jest przeprowadzana z innym czynnikiem stresowym. Takie działanie często skutkuje zwiększoną przeżywalnością, zjawiskiem znanym jako ochrona krzyżowa. Konkretna kombinacja dwóch stresów, która prowadzi do ochrony krzyżowej, zależy od gatunku, a nawet podgatunku. Ochrona krzyżowa sugeruje indukcję mechanizmów molekularnych podczas ekspozycji na pierwszy stresor, który chroni komórki przed następną śmiertelną prowokacją, i może mieć szczególne znaczenie dla LAB, ponieważ często są one ekspozowane kolejno na różne czynniki stresowe [5].

Istnieją również fenotypy wykazujące uogólnioną odporność na wiele stresów jednocześnie. Jeden z takich fenotypów obserwuje się, gdy komórki wchodzi w fazę stacjonarną. Komórki wchodzi w fazę stacjonarną z powodu wyczerpania składników odżywczych i/lub akumulacji toksycznych produktów przemiany materii w swoim środowisku podczas wzrostu. Warunki środowiskowe fazy stacjonarnej stają się tak stresujące, że śmiertelność komórek ulega przyspieszeniu [43,44]. Przejściu od fazy wykładniczej do fazy stacjonarnej towarzyszy indukcja wielu regulonów, co skutkuje zdolnością radzenia sobie z wieloma innymi naprężeniami. Taki fenotyp zwiększa prawdopodobieństwo przeżycia do czasu przywrócenia warunków wzrostu i jest szczególnie ważne dla LAB, które w przeciwieństwie do innych bakterii Gram-dodatnich, nie są w stanie tworzyć zarodników. Innym fenotypem oporności na działanie kilku czynników wywołujących stres komórek, jest wytwarzanie biofilmu. Niektóre gatunki bakterii są naturalnie podatne na tworzenie się biofilmów, ale tworzenie tych struktur może być również efektem stresu. Biofilmy są istotne dla wszystkich typów LAB, w tym związanych z żywnością, probiotycznych, komensali i patogenów [1]. Wykazano, że podczas fazy stacjonarnej, tworzenia biofilmu i innych stresujących warunków, niektóre

bakterie są zdolne do życia, ale niehodowalne (VBNC ang. Viable But Non-Culturable). W tym stanie fizjologicznym komórki są aktywne metabolicznie i odporne na wiele stresów, ale nie mają zdolność do proliferacji. Komórki VBNC mogą regenerować się w określonych warunkach lub w obecności określonych molekuł. Przejście w VBNC jest uważane za strategię adaptacyjną dla długoterminowego przeżywania [45]. Istnieje szereg badań dotyczących stanu VBNC u LAB. Jednakże, ponieważ komórki uszkodzone i komórki VBNC mogą mieć podobne fenotypy, nie jest jasne, czy LAB rzeczywiście wykazuje odpowiedź adaptacyjną jako VBNC. Jednocześnie, komórki przetrwałe to subpopulacje komórek opornych na wiele antybiotyków. W przeciwieństwie do komórek opornych, które mogą rosnąć w obecności antybiotyków, komórki przetrwałe mogą opierać się śmiertelnym dawkom antybiotyków przy braku wzrostu. Niedawno zasugerowano, że stan VBNC wykorzystuje stan uśpienia jako główny tryb odporności na stres. Rozwój i filologia spoczynku u LAB są słabo poznane i z pewnością zasługują na dalsze badania.

W większości badań nad fizjologią stresu LAB, szczepy poddawane są tylko jednemu czynnikowi stresowemu, aby lepiej przeanalizować mechanizmy filologiczne i molekularne leżące u podstaw odpowiedzi [1,43]. W rzeczywistości LAB przebywają głównie w środowiskach wielostresowych i w związku z tym występować może u nich krzyżowa odpowiedź na stres. Te reakcje adaptacyjne lub stresowe są głównym przedmiotem badań fizjologii stresu LAB. Bakterie stale monitorują zmiany w swoim środowisku i reagują w razie potrzeby. Odpowiedzi na stres zostały skorelowane z określonymi fenotypami, dzięki czemu można je indukować w kontrolowany i powtarzalny sposób. Najczęściej pojawiającym się w literaturze fenotypem jest zaadoptowana komórka. Badania prowadzone na reakcjach LAB na różne warunki stresowe są bardzo ważne z różnych powodów. Jednym z najważniejszych aspektów jest ich wytrzymałość w trakcie przetwarzania i przechowywania żywności. Podatność na zmiany warunków technologicznych może mieć poważny wpływ na jakość i bezpieczeństwo żywności.

3.4.1. Mechanizmy odpowiedzi na stres

Odpowiedzi adaptacyjne bakterii opierają się głównie na mechanizmach epigenetycznych, ponieważ ponowny wzrost przystosowanych komórek w optymalnych warunkach znosi każdy fenotyp odporności [1]. Chociaż może upłynąć kilka pokoleń, zanim opór zaniknie, sprawność populacji ostatecznie wraca do podstawowych poziomów. U bakterii mogą również wystąpić mutacje wywołane stresem; komórki wystawione na pewne stresy mogą wejść w stan wysokiej

zmienności, zwiększając w ten sposób różnorodność populacji klonalnej, co może prowadzić do nowych genotypów umożliwiających przeżycie w warunkach, które w przeciwnym razie byłyby szkodliwe dla typu dzikiego [46]. Zwiększone tempo mutacji można osiągnąć przez podatne na błędy polimerazy DNA, błędy podczas transkrypcji i/lub translacji oraz aktywację elementów zdolnych do mobilizacji. Istnieją pewne dowody na to, że mutacje adaptacyjne występują w LAB jako odpowiedź na pewne stesy [47,48]. Reakcje adaptacyjne, epigenetyczne lub nie, są ostatecznym sposobem zapewnienia przetrwania bakterii w warunkach stresu. Przekonujące dowody sugerują, że takie reakcje nie są obojętne, ale charakteryzują się pewnym stopniem plastyczności. Szereg badań pokazuje, że różne fenotypy odporne na stres mogą chronić przed tym samym czynnikiem wywołującym stres, mimo że zaangażowane mechanizmy molekularne mogą się nieznacznie lub nawet znacznie różnić [43,49]. Komórki mogą wykorzystywać liczne i nakładające się na siebie mechanizmy odporności, aby zapobiegać uszkodzeniom lub je naprawiać i utrzymywać się przy życiu. Badania wskazują, że molekularne mechanizmy odpowiedzi adaptacyjnej na stres mogą być specyficzne gatunkowo, a nawet szczepowo [34], uważa się, że niektóre fenotypy zależą od poziomu ekspresji genów, a nie od ich obecności lub nieobecności.

Podstawowym problemem nieodłącznie związanym z badaniem fizjologii stresu bakteryjnego jest określenie sposobu przeżycia. Komórki określane są jako żywe lub martwe w zależności od tego, czy są zdolne do proliferacji w określonej pożywce i w określonych warunkach. W rzeczywistości tylko komórki nadające się do hodowli można dokładnie zliczyć na podstawie wzrostu, podczas gdy liczbę martwych komórek można wywnioskować pośrednio z nietraktowanej populacji kontrolnej. Istnieje jednak co najmniej jeden dodatkowy stan fizjologiczny po ekspozycji populacji komórek na stres, a mianowicie stan „uszkodzonej” komórki [50]. Uszkodzone komórki są aktywne metabolicznie, ale uległy uszkodzeniu w stopniu, który powoduje przejściową lub nawet trwałą utratę zdolności do proliferacji [1,43]. Czasami wymagają dłuższych czasów naprawy lub mogą naprawiać się tylko w specyficznych warunkach. Uszkodzone komórki można w pewnym sensie uznać za VBNC, ale nie są one wynikiem odpowiedzi adaptacyjnej. Nieodzowną rolę zarówno w warunkach stresu, jak i bez stresu odgrywa kontrola jakości białek, w tym ponowne fałdowanie lub degradacja uszkodzonych białek. Białka komórkowe są nieustannie modyfikowane, aby sprostać wyzwaniom wynikającym ze zmian w środowisku. Synteza białek opiekuńczych i proteaz jest szybko indukowana w warunkach stresowych i wykorzystywana do zwalczania potencjalnie szkodliwej agregacji zdenaturowanych białek. Podczas gdy zadaniem białek opiekuńczych jest ochrona białek funkcjonalnych i ponowne fałdowanie tych nieprawidłowo sfałdowanych,

proteazy zapewniają ostatnią linię obrony usuwając nieodwracalnie uszkodzone białka, po czym aminokwasy są ponownie wykorzystywane. W zmieniających się warunkach proteoliza usuwa również funkcjonalne białka w celach regulacyjnych lub dlatego, że nie są już potrzebne.

3.4.2. Regulacja odpowiedzi na stres

Bakterie wykorzystują szeroką gamę mechanizmów do monitorowania środowiska wewnątrzkomórkowego i zewnątrzkomórkowego oraz do regulowania fizjologii komórki w celu radzenia sobie ze zmianami środowiskowymi [5].

Wyjaśnienie struktury, funkcji i dynamiki rozwoju bakterii w ich naturalnym środowisku, a także pod wpływem różnego rodzaju stresu jest jednym z największych wyzwania [51].

Wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP) jest jednym z wielu czynników wywołujących stres, które mogą wpływać na poziom ekspresji genów. LAB należą do grupy bakterii opornych na HHP, dlatego ocena mechanizmów reakcji stresowej na HHP jest cennym narzędziem oceny trwałości produktów utrwalonych tą metodą. Jednak odpowiedź LAB na HHP jest trudniejsza do zidentyfikowania w porównaniu z innymi czynnikami stresowymi [52], ponieważ ich zdolność do reagowania na HHP pochodzi z systemu ochrony krzyżowej [5]. Tam, gdzie ochrona krzyżowa w LAB została opisana jako narażenie na pojedynczy czynnik stresu, który jest powszechnie związany z tolerancją krzyżową na inne stresory, takie jak kwas, ciepło itp., adaptacja może mieć znacznie większe znaczenie w poprawie funkcjonowania bakterii w nieoptymalnych warunkach. [53]. W związku z tym potrzebne są dalsze badania, aby określić, ile jest specyficznych gatunkowo/szczepowo i jak/czy specyficzność koreluje z tolerancją na stres u szczepów *Lactobacillus*. Zróżnicowana ekspresja genów zaangażowanych w reakcję na stres może skutkować zmianami na poziomie fenotypowym [1,54,55]. Choć geny skorelowane z odpowiedzią na stres w LAB są wysoce konserwatywne [55], w tym silnie konserwatywny regulon klasy I [5,56], mechanizmy odpowiedzi na stres nie są zachowane [54], co wskazuje, że warunki środowiskowe wpływają na reakcję na stres. Zrozumienie złożoności sieci regulacji genów związanych ze stresem oraz przystosowanie szczepów LAB do trudnych warunków środowiskowych jest ważne dla ulepszenia strategii przemysłowych z wykorzystaniem szczepów LAB i HHP.

Systemy transdukcji sygnału można ogólnie podzielić na dwie główne kategorie: systemy jednoskładnikowe (OCS ang. One-Component Systems) i systemy dwuskładnikowe (TCS ang. Two-Component Systems) [57]. W mechanizmie jednoskładnikowym (OCS) funkcje są

zlokalizowane w tym samym polipeptydzie, podczas gdy w systemie dwuskładnikowym (TCS) są one zlokalizowane na oddzielnych polipeptydach. Ponadto inne cząsteczki, takie jak kwasy nukleinowe i lipidy, również mogą pełnić rolę czujników. Niektóre z nich, głównie cząsteczki RNA, mogą same wywołać odpowiedź, podczas gdy inne przekazują sygnały do sąsiadujących białek, które je przekazują lub wywołują odpowiedź. Inne dane sugerują, że czynniki stresowe, takie jak czynniki sigma σ , które są odpowiedzialne za reakcję na stres u wielu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, nie mają znaczenia w LAB. Najbardziej uderzającą różnicą jest brak czynnika sigma σ , podczas gdy kilka białek stresu, takich jak DnaK, GroEL, Clp itp. oraz ich regulatory HrcA i CtsR są zachowane.

Regulacja genów odpowiedzi na stres cieplny u bakterii Gram-dodatnich została opisana jako zależna od HrcA lub CtsR [5]. Obecnie te dane są nadal aktualne dla bakterii *Bacillus subtilis* i blisko spokrewnionych z nimi *Clostridium perfringens* lub *Listeria monocytogenes* [24,58,59]. W zależności od rodzaju regulacji, geny są klasyfikowane w sześciu grupach [5,51].

Początkowo mechanizm odpowiedzi LAB na warunki stresowe porównano z dobrze udokumentowanymi gatunkami modelowymi – *B. subtilis* i *E. coli*. Najlepiej poznane mechanizmy odpowiedzi na stres występują u gatunków *B. subtilis*, gdzie, jak wykazali Castaldo i wsp. [60], w wysokich temperaturach dochodzi do ekspresji ponad 200 genów. Okazało się jednak, że istnieją pewne różnice w mechanizmach, Ricciardi i wsp. [61] wykazali regulację genów odpowiedzi na stres należące do Klasy I i Klasy III, różniące się u *Lactobacillus plantarum* od organizmu modelowego bakterii Gram-dodatnich *B. subtilis*.

U LAB reakcja na stres jest regulowana przez jednoskładnikowy system regulacyjny (OCS). Klasy I i III są kontrolowane przez dwa typy represorów transkrypcji: HrcA i CtsR. Pierwsza klasa genów szoku cieplnego obejmuje operony dnaK i groEL i kodują one białka należące do dwóch kompleksów opiekuńczych, odpowiednio DnaK-GrpE-DnaJ i GroES-GroEL [24,60]. Indukcja tych genów koreluje ze stresem osmotycznym, głodowym, temperaturowym i związanym z kwasem, etanolem, zimnem. W regionach promotorowych operonów groE i dnaK, które kodują dwa kompleksy opiekuńcze GroES-GroEL i HrcA-DnaK-GrpE-DnaJ zostało znalezione wysoce konserwatywne odwrócone powtórzenia CIRCE (ang. Controlling Inverted Repeat for Chaperon Expression), które wiąże represor HrcA [51,62]. Operony HrcA i CtsR są regulowane przez białko represorowe HrcA, które w warunkach bezstresowych wiąże się z operatorem CIRCE. *hrcA* znajduje się w operonie dnaK, a jego ekspresja jest pod kontrolą autorepresji. W niektórych LAB stwierdzono, że sekwencje CIRCE znajdują się powyżej *hrcA-grpE-dnaK* [63], a analiza mRNA wykazała szybkie poziomy indukcji po szoku cieplnym [54,63]. Badania nad mutantami *dnaK* sugerowały, że w indukcji przez czynnik stresowy

(niskie pH) mogą pośredniczyć regulatory szoku cieplnego, HrcA i CtsR [63], a u mutantu *dnaK L. paracasei* wrażliwość na stres koreluje z regulacją genu w górę [55]. Geny kodujące białka szoku cieplnego i geny represorowe klasy I – HrcA, są wykorzystywane do celów taksonomicznych w kilku gatunkach, w tym *Lactobacillus* [5].

Ekspresja genów klasy II jest zależna od czynnika sigma σ_B , którego synteza i aktywność wzrasta pod wpływem różnych czynników stresowych [5]. U LAB geny z klasy III (regulowane przez represor CtsR) są mniej konserwatywne. Sugeruje się, że CtsR jest szeroko rozpowszechnionym represorem transkrypcji zaangażowanym w regulację szoku cieplnego [51,64], a u bakterii Gram-dodatnich (+) jest uważany za główny regulator jakości białek komórkowych i odpowiada za kontrolę ekspresji genów zaangażowanych w proteostazę. Represor CtsR szoku cieplnego klasy III wiąże się bezpośrednio z określoną powtarzaną sekwencją (CtsR Box: a/ggtcaaaNaNa/ggtcaaa) [5]. Sekwencja ta została znaleziona u innych bakterii Gram-dodatnich (+), takich jak: *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Leuconostoc oenos*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus lactis*, *Clostridium* [5].

U mikroorganizmów reakcja na stres jest kombinacją różnych mechanizmów transkrypcyjnych, które nakładają się i prowadzą do złożonych sieci regulacyjnych. W tym kontekście kluczową rolę odgrywa krzyżowa regulacja między regulonami CtsR i HrcA i jest ważna w mechanizmach krzyżowej ochrony u LAB, które są narażone na surowe czynniki środowiskowe. Vogel i wsp. [18] stwierdzili, że brak alternatywnego czynnika sigma u LAB może umożliwić bakteriom przystosowanie się do różnych stresów w różnych środowiskach. Mechanizmy aktywatora transkrypcji klasy IV nie są dobrze udokumentowane.

Geny klasy V podlegają regulacji dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału (TCS), ponieważ regulacja klasy VI jest wciąż nieznana [5].

3.4.3. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu SNP w genach *dnaK*, *hrcA*, *ctsR*

Wewnątrzgatunkowa zmienność fenotypowa bakterii może być przypisana pojedynczym polimorfizmom nukleotydu (SNP ang. Single Nucleotide Polymorphism), czyli pojedynczym zmianom zasad występujących z częstotliwością większą niż 1% w danej populacji [65]. SNP mogą występować w całych genomach, zarówno w regionach kodujących, jak i poza sekwencjami kodującymi. SNP występujące poza regionami kodującymi mogą występować w sekwencjach między genowych, regionach nieulegających translacji, intronowych, lub

w powiązanych regionach niekodujących, jak sekwencje promotorowe i miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych. Spośród zmian pojawiających się w obrębie regionu kodującego, można wyróżnić dwie grupy: synonimiczne (SS ang. Synonymous Substitutions) i niesynonimiczne (NSS ang. Non-Synonymous Substitutions). SNP w regionie kodującym, który powoduje zmianę w transkrybowanym kodonie powodującą włączenie innego polipeptydu, jest określany jako mutacja NSS. Z kolei mutacje SS nie zmieniają sekwencji aminokwasowej białka, a co za tym idzie ich wpływ na dostosowanie się do zmian wynika ze zmian w procesach transkrypcji i translacji, które determinują ekspresję genów [66]. Efekty zmian wynikające z SS są często tak zmienne, jak te wynikające z NSS, i mogą być one zarówno szkodliwe dla komórki, jak i korzystne. Mutacje synonimiczne mogą mieć duży wpływ na sprawność i mieć istotny wkład w możliwości adaptacyjne. Efekty dostosowania mogą się znacznie różnić w zależności od różnych typów genów i organizmów, w których występują, jednakże nie można ich zignorować. Coraz więcej dowodów wskazuje na fakt, że mutacje synonimiczne mają wpływ na dostosowanie poprzez ewolucję adaptacyjną, poprzez wpływ SS na ekspresję genów i fałdowanie białek. Wiele prac donosi o wpływie SS na proces adaptacji w badanych populacjach, jednak zwykle nie występują one z dużą częstotliwością. W literaturze najczęściej podawanym wyjaśnieniem dopasowania mutacji synonimicznych jest błąd kodonów, jeśli SS spowodują powstanie nowych kodonów, które będą lepiej dopasowane do genów o większej ekspresji w innych częściach genomu, może wpłynąć to na wzrost sprawności. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tego może być większa pula dostępnych tRNA, a co się z tym wiąże mniejszy koszt produkcji białek przez komórkę. Różne prace wykazały [66,67,68], że wprowadzenie kodonów, które są rzadsze lub bardziej powszechne, od tych występujących w genach o wysokiej ekspresji, mogą zmniejszać kondycję, sugerując, że użycie kodonów może podlegać selekcji stabilizującej. Badania te, wykazały również, że zmiany w kodonach, wynikające z pojedynczych mutacji synonimicznych, rzadko wykazują wpływ na efektywność. Ponadto wyniki sugerują, że jest małe prawdopodobieństwo, aby błąd w sekwencji kodonów był czynnikiem adaptacyjnym podstawień synonimicznych, w krótkim czasie [66,69,70]. Mutacje SS mogą wpływać na szybkość i wierność translacji poprzez zmianę drugorzędowej struktury transkryptów mRNA. Zmniejszona stabilność termodynamiczna mRNA, może sprawić, że transkrypt będzie bardziej dostępny dla rybosomu podczas translacji, co może prowadzić do szybszej translacji i wysokiego dopasowania [66,71]. Odkrywanie różnorodnych sposobów, w jakie SS mogą wpływać na dopasowanie, stanowi ważny element badań nad mechanizmami odpowiedzi na stres. Mutacje SS są rzadko odzyskiwane z krótkoterminowych eksperymentów w nowych lub stresowych środowiskach, gdyż

początkowe etapy adaptacji są często napędzane zmianami genetycznymi jak mutacje utraty funkcji i amplifikacja genów, które nie wymagają mutacji synonimicznych. Lepsze zbadanie długoterminowych odpowiedzi adaptacyjnych może dać dowody na rosnący odsetek mutacji synonimicznych przyczyniających się do adaptacji w czasie. Wykorzystanie zmian środowiskowych, jak HHP, do modulowania rozkładów efektów przystosowania oraz efekty przystosowania mutacji synonimicznych i niesynonimicznych mogą być ważne dla określenia, które zmiany przyczynią się do adaptacji [72]. W badaniach [66,69] zaobserwowano, że SS w jednej części genu może implikować dopasowania późniejszych mutacji SS w innej części tego genu. Jednocześnie, zaobserwowano, że mutacje w jednym genie wpływają na ekspresję innych sąsiednich genów [66,69,73], co sugeruje, że nie należy skupiać się tylko na jednym genie. W przypadku bakterii, gdzie geny są często zgrupowane w operony i razem transkrybowane, określenie w jaki sposób mutacje wpływają na całą jednostkę transkrypcyjną, może pozwolić zbliżyć się do zidentyfikowania mechanizmów odpowiedzialnych za efekty dopasowania mutacji synonimicznych wpływających na adaptację.

Przyszłe prace będą koncentrować się na poszukiwaniu wpływów mutacji synonimicznych ze skutkami w przystosowaniu w różnych regionach genów (domeny funkcjonalne, lokalizacja z operonem), w celu określenia wzorców skutków dopasowania SS w populacjach. Wyniki analiz szczepów i gatunków LAB, z wykorzystaniem analiz całych genomów, pozwolą na lepsze zrozumienie ogólnego znaczenia wpływu mutacji SS w ewolucji adaptacyjnej.

4. HIPOTEZY I CEL PRACY

4.1. HIPOTEZY

W literaturze brakuje informacji dotyczących odpowiedzi na stres związany z wysokim ciśnieniem hydrostatycznym (HHP) u bakterii fermentacji mlekowej (LAB), oraz wpływu tego czynnika na aspekty genetyczne i proteomiczne u tych bakterii. Duża oporność LAB na różne rodzaje czynników stresowych występujących w przetwórstwie spożywczym stała się podstawą założeń i ukierunkowała podjęte w niniejszej pracy doktorskiej badania naukowe. Uwzględniając dotychczasową wiedzę na temat mechanizmów odpowiedzi na stres u bakterii LAB, których dotyczy niniejsza rozprawa doktorska, postawiłam następujące hipotezy:

Hipoteza 1

- Wysokie ciśnienie hydrostatyczne wpływa na zmiany profili widm mas białek LAB, co może prowadzić do zróżnicowanej identyfikacji metodą MALDI-TOF MS

Hipoteza 2

- Wysokie ciśnienie hydrostatyczne indukuje rozregulowanie procesów biologicznych w LAB, co wiąże się ze zmianą profilu ekspresji genów uczestniczących w odpowiedzi na stres

Hipoteza 3

- Poznanie mechanizmów odpowiedzi na stres u LAB umożliwi ich lepszą selekcję przy wyborze do zastosowań w przemyśle spożywczym

4.2. CEL PRACY

Głównym celem pracy było ustalenie czy wywołane przez wysokie ciśnienie hydrostatyczne zmiany na poziomie genetycznym i proteomicznym w bakterii kwasu mlekowego, wiążą się z polimorfizmem wybranych genów odpowiedzi na stres, oraz czy zmiany te są na tyle istotne, że mogą w konsekwencji skutkować odmienną identyfikacją tych bakterii.

Do osiągnięcia celu głównego sformułowano następujące cele szczegółowe, które posłużyły do weryfikacji stawianych hipotez:

Cel 1 - Określenie molekularnych mechanizmów związanych z odpowiedzią na stres u bakterii LAB. (**Publikacja 1**)

Cel 2 - Określenie wpływu HHP na zmiany w profilach proteomicznych LAB uzyskanych metodą MALDI-TOF MS. (**Publikacja 2**)

Cel 3 - Określenie siły dyskryminacyjnej identyfikacji LAB metodami genetycznymi (geny *16S* rDNA, *pheS*) oraz opartych na profilach widm mas białek uzyskanych metodą MALDI-TOF MS. (**Publikacja 3**)

Cel 4 - Analiza wpływu HHP na ekspresję genów *dnaK*, *hrcA* i *ctsR* związanych z odpowiedzią na stres, oraz określenie zależności pomiędzy działaniem HHP a polimorfizmem (SNP) genów *dnaK*, *hrcA* i *ctsR*. (**Publikacja 4 i Publikacja 5**)

5. ZAKRES PRAC

Cele szczegółowe były realizowane poprzez wykonanie następujących etapów badań:

Etap 1 Izolacja i charakterystyka szczepów LAB, pochodzących z produktów spożywczych

- Wstępna identyfikacja mechanizmów odpowiedzi na stres u LAB oraz wybór genów do dalszych prac badawczych.
- Izolacja szczepów LAB i charakterystyka z użyciem klasycznych metod mikrobiologicznych.
- Identyfikacja LAB z wykorzystaniem analizy sekwencji nukleotydowej genu kodującego podjednostkę *16S* rDNA oraz genu *pheS*, kodującego podjednostkę alfa syntazy fenyloalanylo-tRNA (Phe-tRNA).
- Analiza podobieństw sekwencji *16S* rDNA i *pheS* z wykorzystaniem programu BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*).

Etap 2 Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na aspekty proteomiczne w badanych szczepach LAB

- Wyznaczenie parametrów HHP stymulujących reakcje odpowiedzi na stres u badanych LAB.
- Określenie wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na profile proteomiczne badanych szczepów.
- Określenie zmian w profilach widm mas białek uzyskanych metodą MLADI-TOF MS pod wpływem działania HHP.
- Określenie potencjalnych mechanizmów odpowiedzi na stres wywołany HHP i możliwościach identyfikacyjnych LAB.

Etap 3 Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na aspekty genetyczne w badanych szczepach LAB

- Identyfikacja genów uczestniczących w mechanizmie odpowiedzi na stres u LAB.
- Określenie wpływu HHP na genetyczne elementy mechanizmów obronnych LAB:
 - Ocena wpływu HHP na ekspresję genu *dnaK* w badanych szczepach.
 - Ocena wpływu HHP na ekspresję genu *hrcA* w badanych szczepach.
 - Ocena wpływu HHP na ekspresję genu *ctsR* w badanych szczepach.
- Określenie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w genach *dnaK*, *hrcA* i *ctsR* pod wpływem działania HHP.

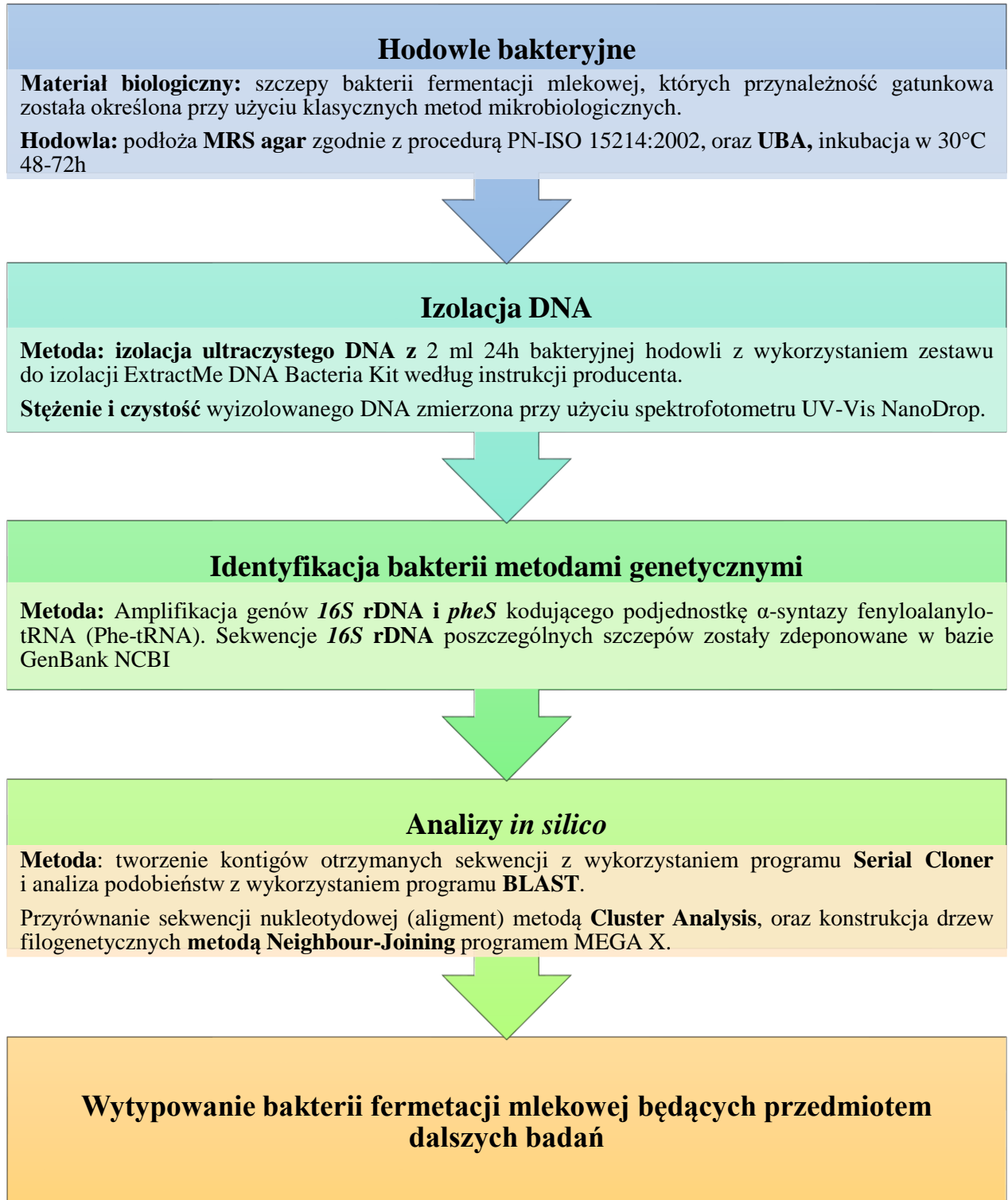
W badaniach wchodzących w zakres pracy doktorskiej, wykorzystano łącznie 15 szczepów bakterii fermentacji mlekowej (LAB) należących do rodzaju *Lactobacillus*. Szczepy LAB izolowano z produktów spożywczych stosując pożywkę MRS Agar (De Man, Rogosa, Sharpe Agar) wg procedury PN-ISO 15214:2002. W przypadku izolacji bakterii z piwa zastosowano pożywkę UBA (Universal Beer Agar). Wyizolowane szczepy zostały zidentyfikowane na podstawie cech morfologicznych, fizjologicznych oraz genetycznych i proteomicznych, w Zakładzie Mikrobiologii, Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie (IBPRS-PIB). Badane szczepu po scharakteryzowaniu na podstawie analizy sekwencji nukleotydowej genu kodującego podjednostkę *16S* rDNA zostały umieszczone w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych, gdzie nadano im nr KKP. Sekwencje *16S* rDNA poszczególnych szczepów zostały zdeponowane w bazie GenBank NCBI (The National Centre for Biotechnology Information) (Tabela 1).

Tabela 1. Wykaz analizowanych szczepów LAB.

Szczep	Nr dostępu w GenBank	Źródło	Identyfikacja wg <i>16S</i> rDNA	Nowa nomenklatura
KKP 3565	102 OK2913330	Piwo	<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Loigolactobacillus backii</i>
KKP 3566	103 OK287375	Piwo	<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Loigolactobacillus backii</i>
KKP 3567	253 OK288023	Piwo	<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	<i>Secundilactobacillus paracollinoides</i>
KKP 3568	1178 OK291331	Chleb	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
KKP 3569	863 OK297672	Sok pomidorowy	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
KKP 3570	975 OK297673	Sok pomidorowy	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
KKP 3571	133 OK297679	Probiotyk	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
KKP 3572	259 OK287403	Lody	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
KKP 3573	3/16/1 OK287291	Piwo	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
KKP 3574	3/16/2 OK287283	Piwo	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
KKP 3575	489 OK298397	Piwo	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
KKP 3576	557 OK298392	Piwo	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
KKP 3577	738 OK287356	Piwo	<i>Lactobacillus rossiae</i>	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>
KKP 3578	432 OK298400	Sok z kiszonych ogórków	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
DSM 6235	115	Piwo	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>

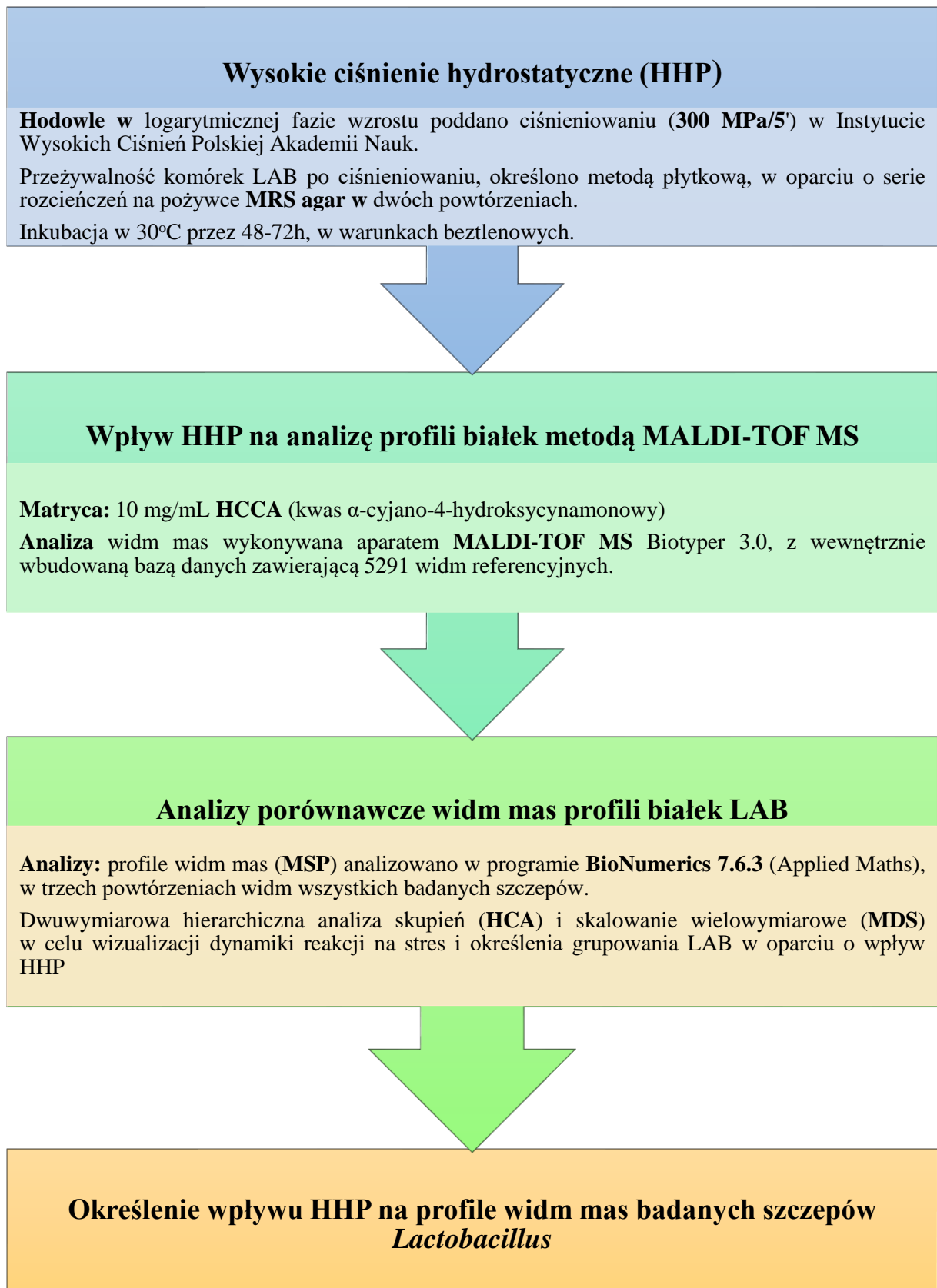
Schematy postępowania oraz metodykę przedstawiono na poniższych Rysunkach.

Etap 1. Izolacja i charakterystyka szczepów LAB, pochodzących z produktów spożywczych.



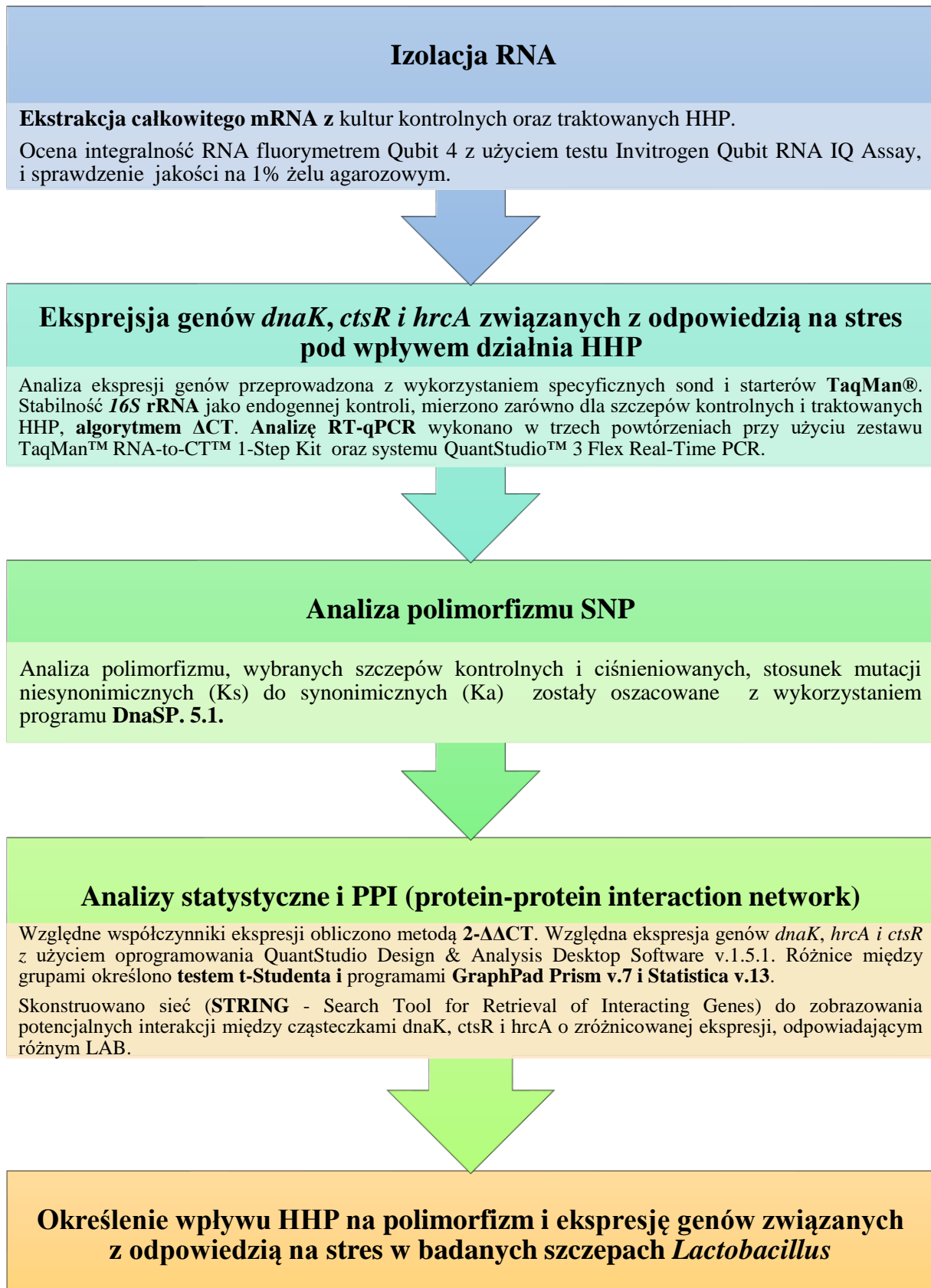
Rysunek 1. Schemat postępowania i metodyka izolacji i identyfikacji genetycznej LAB.

Etap 2. Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na aspekty proteomiczne w badanych szczepach LAB



Rysunek 2. Schemat analiz proteomicznych.

Etap 3. Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na aspekty genetyczne w badanych szczepach LAB.



Rysunek 3. Schemat analiz genetycznych.

6. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ BADAWCZYCH PRZEDSTAWIONYCH DO OCENY

W **Publikacji 1**, która stanowi przegląd literatury, dokonano omówienia i charakterystyki mechanizmów zaangażowanych w reakcję na różnego rodzaju stres, co stanowiło podstawę osiągnięcia **1 celu szczegółowego**. Ponieważ wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP), jest nietermiczną metodą utrwalania żywności, która znajduje coraz szersze zastosowanie, to wiedza o molekularnych podstawach reagowania na ten czynnik stresu u LAB jest bardzo ważna. HHP nie jest powszechnym czynnikiem stresu dla LAB, ponieważ w normalnych warunkach środowiskowych nie są one na nie narażone. Obecnie zasób wiedzy na ten temat jest nadal ograniczony, a mechanizmy nie zostały do końca poznane. Aby scharakteryzować stan fizjologiczny komórek po ekspozycji na wysokie ciśnienie, ważne jest zapewnienie wglądu zarówno w ich proteom i genom. Na podstawie dokonanego przeglądu literatury dotyczącego podstawowych mechanizmów i genów odpowiedzi na stres bakterii fermentacji mlekowej, występujących w przemyśle soków i napojów, scharakteryzowano genetyczne podstawy odpowiedzi na stres różnego rodzaju, które są zaangażowane w procesach adaptacyjnych komórek LAB. Biorąc pod uwagę obecny stan wiedzy dotyczący krzyżowej tolerancji na stres, wybrano trzy geny: *dnaK*, *ctsR* i *hrcA*, które zostały uwzględnione w dalszych etapach prac badawczych i stanowiły podstawę kolejnych publikacji należących do cyklu rozprawy doktorskiej.

Istotnym elementem pracy, co zostało przedstawione w **Publikacji 2** i stanowiło realizację **2 celu szczegółowego**, było określenie w jaki sposób metoda utrwalania, jaką jest HHP, wpływa na profil widm mas białek badanych szczepów LAB, i w jaki sposób przekłada się to na możliwości identyfikacyjne tej metody. Chemotaksonomiczne metody analizy białek rybosomalnych charakterystycznych dla danej rodziny, rodzaju, gatunku, a nawet szczepów, takie jak MALDI-TOF MS, umożliwiają identyfikację profili widm mas (MSP ang. mass spectra profile) badanych szczepów, poprzez porównanie ich z biblioteką zawierającą referencyjne widma odniesienia. Pozwala to na wykorzystanie metody MALDI-TOF MS, jako narzędzia identyfikacyjnego mikroorganizmów. W **Publikacji 2** zaprezentowano wyniki dotyczące wpływu HHP na badane szczepy LAB poprzez ewaluację profili widm mas białek, oraz wynikającą z tego możliwość identyfikacji badanych szczepów, z wykorzystaniem metody MALDI-TOF MS. W celu wizualizacji dynamiki odpowiedzi na stres, a zwłaszcza zgrupowania szczepów w oparciu o ich powiązanie gatunkowe lub wpływ HHP, przeprowadzono analizę skupień metodą UPGMA (ang. Unweighted Pair Group Method with

Arithmetic mean), dwuwymiarową hierarchiczną analizę skupień (HCA ang. Hierarchical Cluster Analysis) oraz stworzono mapę cieplną, utworzoną w oparciu o korelację podobieństw widm mas, ciśnieniowaniach i kontrolnych szczepów, do wartości m/z.

Wyniki prac przeprowadzonych na tym etapie badań pozwoliły zidentyfikować szczepy należące do rodzaju *Lactobacillus* metodą MALDI-TOF MS, oraz ocenić czy działanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego może mieć istotny wpływ na możliwości identyfikacji bakterii metodą opartą na analizie profilu widm mas białek. Wykazano, że spośród badanych szczepów wysoce wiarygodną identyfikację do poziomu gatunku (przedział ufności 2,30-3,00) otrzymano dla 46% kontrolnych oraz 61,6% ciśnieniowanych szczepów, oraz wysoką wiarygodność do poziomu rodzaju i prawdopodobieństwo identyfikacji do gatunku (w przedziale 2,00-2,29) dla 46% kontrolnych oraz 38,4% ciśnieniowanych szczepów.

Na przykładzie porównania profili widm mas trzech szczepów: KKP 3571 (133), KKP 3577 (738) i KKP 3578 (432), zaobserwowano, że pomiędzy widmem kontrolnym, a ciśnieniowanym istnieją różnice w uzyskanych pikach, co mogło przyczynić się do rozbieżnej identyfikacji tych szczepów.

Hierarchiczna analiza skupień (HCA) widm obliczona przy użyciu współczynnika korelacji Pearsona przypisała szczepy w klastry, które jednak nie zostały zgrupowane na wysokim poziomie pokrewieństwa względem ich zróżnicowania w zależności od gatunku oraz wpływu HHP. Może to świadczyć o tym, że, pomimo iż MSP są na tyle charakterystyczne dla szczepów aby je zidentyfikować, to w większości przypadków zmiany, które zaszły pod wpływem działania HHP były na tyle istotne, że uniemożliwiło to zgrupowanie poszczególnych szczepów w oddzielne klastry. Uzyskane widma zostały przyrównane i zgrupowane z tolerancją liniową 300 ppm i stałą tolerancją 0,5. Największe powinowactwo wykazał szczep KKP 3575 (489), który został przypisany do jednego klastra z kontrolnym szczepem KKP 3569 (863) na poziomie 96%. Również szczep KKP 3568 został wyodrębniony w klaster na poziomie 90% podobieństwa. Pięć szczepów zostało sklasyfikowanych poza klastrami, jako nieposiadające wystarczającego podobieństwa do pozostałych. Pośród nich znalazły się szczepy kontrolne KKP 3566, KKP 3577, DSM 6235, ciśnieniowany szczep KKP 3569 oraz szczep KKP 3576 zarówno kontrolny jak i ciśnieniowany. Otrzymane wyniki sprawdzono pod kątem uzyskanych różnic i podobieństw z wykorzystaniem wielowymiarowego skalowania (MDS ang. Multidimensional Scaling) profili widm mas, która to analiza jest uznana za alternatywę analizy czynnikowej, a rezultaty przedstawiono w postaci wizualizacji 3D. W analizie MDS, odległości określono na podstawie konfiguracji przestrzennej punktów w przestrzeni wielowymiarowej, w której odległości między punktami odzwierciedlały

podobieństwo między szczepami. Podobnie jak w analizie HCA, badanych szczepów nie udało się zgrupować na podstawie ich przynależności gatunkowej lub wpływu czynnika stresowego. W przeprowadzonej analizie skupień 2D i wygenerowanej mapie cieplnej określono różnice między kontrolnymi i ciśnieniowanymi szczepami LAB zgodnie z podobieństwem ich wzorów spektralnych, otrzymane wyniki pokazały, że żadne odchylenie w rozkładzie widm nie może być bezpośrednio skorelowane z wpływem HHP, co potwierdziło przedstawione wcześniej analizy skupień widm mas MALDI-TOF MS.

Identyfikacja LAB może być problematyczna ze względu na wysoki stopień zróżnicowania fenotypowego i genotypowego oraz zawartość par zasad G+C w zakresie 32 ÷ 54 % [13]. W **Publikacji 3** dokonano porównania siły dyskryminacyjnej metod genotypowych wykorzystywanych do identyfikacji LAB (gen *16S* rDNA i *pheS*) oraz metody MALDI-TOF MS, stanowiło to podstawę realizacji **3 celu szczegółowego**. Wyniki tej części pracy pozwoliły na identyfikację bakterii w oparciu o analizę sekwencji genu *16S* rDNA, który jest wyznacznikiem w określaniu filogenetycznego pokrewieństwa bakterii LAB. Jednakże, w przypadku blisko spokrewnionych gatunków LAB metoda ta ma zbyt małą rozdzielczość, a gen kodujący podjednostkę *16S* rRNA może wykazywać niewielki stopień polimorfizmu. Z tego powodu poszukiwano innych genów konserwatywnych, które mogłyby posłużyć jako wiarygodne narzędzie różnicujące o dużej czułości. Taki gen powinien charakteryzować się powszechnością występowania w genomie bakteryjnym i powinien zawierać w sobie swoisty, zmienny region, który pozwoli na jednoznaczne zróżnicowanie gatunków/podgatunków [33]. Dlatego obecnie stosuje się również sekwencjonowanie genu *pheS*, kodującego podjednostkę α -syntazy fenyloalanylo-tRNA (Phe-tRNA), jako alternatywę dla genu *16S* rDNA.

Przy użyciu programu MEGAX dokonywano przyrównania sekwencji genów *16S* rDNA i *pheS* i skonstruowano na ich podstawie drzewa z wykorzystaniem analizy Neighbor-Joining z odległościami obliczonymi metodą największej wiarygodności i z zastosowaniem algorytmu CLUSTAL W. Odległości ewolucyjne obliczano przy użyciu metody największej złożonej wiarygodności i zostały one podane w jednostkach liczby podstawień zasad przypadających na miejsce. Ostateczny zbiór danych zawierał łącznie 1480 pozycji dla genu *16S* DNA oraz 390 pozycji dla *pheS*. Przeprowadzona analiza różnorodności nukleotydowej analizowanych sekwencji LAB, wykazała, że współczynnik π był wyższy dla genu *16S* rDNA (0,86), niż dla genu *pheS* (0,16), co przekładało się na potencjał różnicujący obu genów. Identyfikacja LAB z użyciem genu *pheS* dała małe zróżnicowanie, a ponad 58% analizowanych szczepów zostało rozbieżnie zidentyfikowanych. Analizy te znalazły odzwierciedlenie również w badaniach filogenetycznych, których celem było ustalenie wzajemnego pokrewieństwa

szczepów *Lactobacillus*. na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że analiza sekwencji *16S* rDNA daje większe możliwości różnicujące.

Analizy filogenetyczne sekwencji genu *16S* rDNA wykazały homologię na poziomie 89% dla 10 szczepów, a dla 2 szczepów (*L. backii* KKP 3566 i *L. brevis* KKP 3576) stanowiła mniej niż 79% i zostały one ujęte w oddzielny klaster. Wyniki te nie korelowały z wynikami identyfikacji bakterii bazującej na sekwencjonowaniu genu *16S* rDNA, gdzie zidentyfikowano 4 szczepy *L. brevis* (DSM 6235, KKP 3573, KKP 3575, KKP 3576), po 2 szczepy *L. plantarum* (KKP 3568, KKP 3569), *L. rhamnosus* (KKP 3570, KKP 3571), *L. backii* (KKP 3565, KKP 3566) i po jednym – *L. curvatus* (KKP 3578) i *L. rossiae* (KKP 3577). Na drzewie filogenetycznym sekwencji genu *pheS*, szczepy zostały podzielone na dwa klastry. Jeden klaster zawierał 8 szczepów z homologią na poziomie 90 ÷ 98 %, a drugi – z 2 szczepami: *L. brevis* KKP 3576 i *L. curvatus* KKP 3578, których podobieństwo wynosiło poniżej 90%. W przypadku 2 szczepów *L. backii* KKP 3565 i KKP 3566 nie udało się otrzymać sekwencji genu *pheS*. Uzyskane wyniki korelują z wynikami identyfikacji bakterii na podstawie sekwencji genu *pheS*, gdzie 8 szczepów (DSM 6235, KKP 3568, KKP 3569, KKP 3570, KKP 3571, KKP 3573, KKP 3575, KKP 3577) scharakteryzowano jako *L. plantarum*, a 2 szczepy (KKP 3576 i KKP 3578) – jako *L. brevis*.

W **Publikacji 4** przedstawiono uzyskane wyniki wpływu HHP na zmiany ekspresji genów *dnaK*, *hrcA* i *ctsR*, i były one częścią **4 celu szczegółowego**. Analizę qRT-PCR (ang. quality Real Time – PCR) przeprowadzono z wykorzystaniem specyficznych dla poszczególnych genów sond i primerów TaqMan, a jako endogenną kontrolę wykorzystano gen *16S* rRNA, którego stabilność mierzono, zarówno dla szczepów kontrolnych jak i ciśnieniowanych, algorytmem $\Delta\Delta CT$. Względne współczynniki ekspresji obliczono metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$, a różnice określono przy użyciu testu t-Studenta. Spośród badanych bakterii, dla wszystkich genów u sześciu szczepów kontrolnych poziom ekspresji był poniżej poziomu oznaczalności. U czterech szczepów po ciśnieniowaniu zaobserwowano wzrost ekspresji wszystkich trzech genów, przy czym istotnie statystyczne zmiany były dla szczepu KKP 3565 dla genu *dnaK* i *ctsR*, szczepu KKP 3566 genu *dnaK* i szczepu KKP 3570 genu *ctsR*. W trzech szczepach nastąpiło obniżenie ekspresji, a istotnie statystycznie różnice były dla szczepu KKP *L. plantarum* 3569 genu *hrcA*, *L. rhamnosus* KKP 3570 genu *ctsR* i szczepu *L. rhamnosus* KKP 3571 genu *ctsR* i *hrcA*. Dla szczepu *L. plantarum* KKP 3568 zaobserwowano wzrost ekspresji dla genu *hrcA*, i obniżenie ekspresji dla genów *dnaK* i *ctsR*, natomiast dla szczepu *L.*

paracollinoides KKP 3567 wzrost ekspresji był dla genu *hrcA*, a dla dwóch pozostałych genów poziom ekspresji był poniżej poziomu oznaczalności.

Otrzymane wyniki badań świadczą, że szczepy bakterii z rodziny *Lactobacillus* mają bardzo zróżnicowaną ekspresję wybranych do badań genów związanych ze stresem, co przedstawiono w **Publikacji 4** w formie relatywnej ekspresji genów *dnaK*, *ctsR* i *hrcA*. Zastosowane ciśnienie 300 MPa przez 5 minut w przypadku pięciu szczepów nie spowodowało zmian, które byłyby w zakresie oznaczalności metody, w pozostałych szczepach zaobserwowano duże zróżnicowanie ekspresji. Może się to przekładać na bardziej skomplikowany mechanizm odpowiedzi na czynniki stresogenne, w tym celu opracowano sieć PPI (ang. Protein-Protein Interaction), która pozwoliła wyszukać potencjalne interakcje między cząsteczkami *dnaK*, *ctsR* i *hrcA* o zróżnicowanej ekspresji, odpowiadających różnym LAB. W skonstruowanej, z wykorzystaniem programu STRING (ang. a Search Tool for the Retrieval of Instances of Neighbouring Genes), sieci PPI użyto do przeprowadzenia analizy koekspresji badanych genów, a uzyskane wyniki odnoszą się do siły dowodu uzyskanego w serii eksperymentów dotyczących skorelowanej ekspresji między dwoma kodującymi genami białek w oparciu o wzorce ekspresji RNA i dane dotyczące koregulacji białek. Z zastosowanym wysokim progiem ufności (0,7), odnotowano wysoce zgrupowaną sieć (współczynnik klastrowania 0,73), zawierającą 21 węzłów, które odpowiadają białkom, z 98 krawędziami (interakcjami), gdzie oczekiwana liczba krawędzi (interakcji) wynosiła 27. W analizie wykazano znacznie więcej interakcji niż oczekiwane dla losowego zestawu podobieństwa z genomu. Analiza sieci PPI może przedstawiać sieć oddziaływań molekularnych powstających między produktami białkowymi badanych genów, geny *dnaK*, *ctsR* i *hrcA* miały wysoki stopień usieciowienia, co może wskazywać na znaczenie tych białek w powstałej sieci PPI. Przedstawione zależności funkcjonalne korelują z obecnością lub brakiem interakcji. Analiza sugeruje, że białka jako grupa są częściowo biologicznie połączone i mogą mieć ze sobą znacznie więcej interakcji niż oczekiwano.

W **Publikacji 5** zaprezentowano wyniki analizy polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) dla genów *dnaK*, *hrcA* i *ctsR* w wybranych szczepach kontrolnych i po ciśnieniu 300 MPa/5', i stanowiły one drugą część **4 celu szczegółowego**. Celem badania było porównanie czy wysokie ciśnienie hydrostatyczne wpływa na zmiany sekwencji w/w genów, co mogłoby znaleźć odzwierciedlenie w zmianach ekspresji tych genów pod wpływem HHP. W niniejszej pracy zbadano 5 szczepów: *L. backii* KKP 3565 i KKP 3566, *L. plantarum* KKP 3568 i KKP 3569 i *L. rhamnosus* KKP 3570. Dla każdego ze szczepów

zostały porównane geny w szczepach kontrolnych oraz po zastosowaniu HHP. Otrzymane sekwencje przyrównano ze sobą (alignement) oraz przeprowadzono analizę SNP, w poszukiwaniu mutacji mogących pojawiać się pod wpływem zastosowanego czynnika stresu i mogącego mieć wpływ na zdolności adaptacyjne LAB do zmieniających się warunków środowiska. Przeprowadzono analizę stosunku mutacji niesynonimicznych do synonimicznych (Ka/Ks) pod wpływem HHP, ze względu na ich różny wpływ na komórki bakteryjne. Wyniki tej pracy pokazały, że największą różnorodność nukleotydową wykazywał gen *hrcA*, co stoi w zgodzie z wynikami autorów innych prac [56]. Jednakże dla poszczególnych szczepów porównując sekwencje genów kontroli z ciśnieniowanymi szczepami, nie odnotowano znaczących różnic pomiędzy sekwencjami dla wszystkich trzech genów. Stosunkowo niewielki stopień zmienności genów *dnaK*, *hrcA*, i *ctsR*, może wskazywać na fakt, że bakterie posiadają mechanizmy ochronne przed mutacjami funkcjonalnymi, lub że mutacje, które zaistniały były neutralne. Niski stosunek Ka/Ks wskazuje, że mutacje NSS mają słaby, negatywny wpływ na żywotność komórek. Z kolei wysoki stopień NSS sugeruje, że selekcja adaptacyjna prowadzi do faworyzowania różnych sekwencji białek w zależności od zmian występujących w środowisku, mogą one być częścią mechanizmu adaptacyjnego, poprzez informowanie o funkcji genów. W badanych genach ekspresja nie wydaje się odgrywać znaczącej roli w plastyczności genomowej, natomiast na podstawie analiz sieci interakcji białko-białko (PPI) można stwierdzić, że sieć PPI ma kluczowe znaczenie dla procesów molekularnych, a nieprawidłowe usieciowanie może być podstawą wielu zmian, w tym tych związanych z reakcją na stres.

7. REALIZACJA CELÓW, WERYFIKACJA HIPOTEZ I WNIOSKI

Realizacja celów szczegółowych została osiągnięta i opisana w poszczególnych publikacjach składających się na cykl publikacji stanowiących pracę doktorską:

Cel 1 – Publikacja 1

Bakterie fermentacji mlekowej charakteryzują się dużym zróżnicowaniem odpowiedzi na stres, a wybrane do badań geny *dnaK*, *ctsR* i *hrcA* nie są jedynymi biorącymi udział w tym procesie. Mechanizm odpowiedzi na stres jest bardziej skomplikowany i może zależeć od czynnika stresowego [1,63], a co za tym idzie może wymagać bardziej dogłębnych analiz. Jak podają inni autorzy [9,23,56,64] zrozumienie mechanizmów odpowiedzi na stres, jest istotne ze względu na określenie możliwości adaptacyjnych bakterii w zmiennych warunkach środowiskowych, które mogą występować w utrwalanych produktach spożywczych.

Cel 2 – Publikacja 2

Otrzymane na tym etapie wyniki pozwoliły określić, że wysokie ciśnienie hydrostatyczne może wpływać na zmiany w proteomie bakterii LAB. Zgadzało się to z doniesieniami innych autorów [74] dotyczącymi związku HHP z efektami indukowanymi w białkach. Zmiany te mogą być na tyle istotne, aby w niektórych przypadkach prowadzić do powstania różnych profili widm mas białek uzyskanych metodą MALDI-TOF MS dla tego samego szczepu i w konsekwencji skutkować odmienną identyfikacją. Zmiana profilu widm mas białek może mieć istotne znaczenie nie tylko ze względu na funkcjonalność bakterii, ale również na możliwości poprawnej identyfikacji metodą opartą na analizie białek.

Potwierdzono prawdziwość hipotezy 1.

Cel 3 – Publikacja 2 i Publikacja 3

Na podstawie badań prowadzonych na tym etapie pracy doktorskiej wykazano, że w stosunku do analizowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej gen *pheS* miał wysoki stopień homogeniczności i niską siłę dyskryminującą, co znalazło potwierdzenie w badaniach innych autorów - Naser i wsp. [75], w odniesieniu do *Enterococcus*. Jednocześnie, uzyskane wyniki różniły się od wyników różnicowania opartych na analizie genu *pheS*, uzyskanych przez Naser i wsp. [13] dla blisko spokrewnionych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, gdzie autorzy stwierdzili, że jest to wiarygodna, alternatywna metoda różnicująca dla genu *16S* rDNA. W przypadku badań własnych stwierdziłam, że dla analizowanych szczepów LAB większą wiarygodność identyfikacyjną miał gen *16S* rDNA, w porównaniu do genu *pheS* i metody MALDI-TOF MS.

Cel 4 – Publikacja 4 i Publikacja 5

W toku przeprowadzonych na tym etapie prac, dla badanych szczepów LAB uzyskano zróżnicowany profil ekspresji genów *dnaK*, *hrcA*, i *ctsR*. Zmienna ekspresja genów zaangażowanych w reakcję na stres może skutkować zmianami na poziomie fenotypowym bakterii, co zgadza się z doniesieniami innych autorów analizujących zmiany transkryptomów bakterii pod wpływem stresu [1,18,55,56,61,63]. Dane te potwierdzają, że niektóre fenotypy zależą od poziomu ekspresji genów, a nie od ich samej obecności. Natomiast mutacje w pojedynczych genach mogą wpływać na zmiany innych, sąsiadujących genów, szczególnie gdy są one zgrupowane w jeden operon i razem transkrybowane. Identyfikacja całych jednostek

transkrypcyjnych może przyczynić się do zidentyfikowania mechanizmów odpowiedzialnych za adaptację. W krótkoterminowych eksperymentach, jak w przeprowadzonych przeze mnie z zastosowaniem HHP 300 MPa/5', które stanowią stresowe lub nowe środowisko, rzadko występują mutacje SS, które są istotnym elementem procesu początkowej adaptacji wynikającej ze zmian genetycznych, jak mutacje utraty funkcji i amplifikacja genów. Jak podaje Bailey i wsp. [66], mechanizmy molekularne odpowiedzialne za reakcje komórki, które są specyficzne dla początku genu, takiej jak inicjacja transkrypcji lub translacja, wydają się mieć wpływ na organizm i geny. Należy to jednak podkreślić, co zostało potwierdzone również przez badania własne, że choć jest to istotny związek, to jest on słaby, zaś podatność na zmiany warunków środowiskowych u LAB, może mieć poważny wpływ na jakość i bezpieczeństwo żywności.

Potwierdzono prawdziwość hipotezy 2 i 3.

Poprzez realizację celów szczegółowych osiągnięto cel główny, którym było ustalenie czy wywołane przez wysokie ciśnienie hydrostatyczne zmiany na poziomie genetycznym i proteomicznym w bakterii kwasu mlekowego, są związane z polimorfizmem wybranych genów odpowiedzi na stres oraz czy zmiany te są na tyle istotne, że mogą w konsekwencji skutkować odmienną identyfikacją tych bakterii, co pozwoliło odnieść się do postawionych w pracy hipotez.

WNIOSKI

- 1) W badaniach porównawczych metod identyfikacyjnych, opartych na genach konserwatywnych (*16S* rDNA, *pheS*) oraz profilu widm mas białek (MALDI-TOF MS), analizowanej populacji LAB, stwierdzono, że największą siłą dyskryminującą i największym potencjałem różnicującym dla analizowanej populacji LAB charakteryzował się gen *16S* rDNA.
- 2) Analizy filogenetyczne badanych genów *dnaK*, *hrcA* i *ctsR* dla szczepów kontrolnych i ciśnieniowanych były na tyle zróżnicowane, że uniemożliwiły ich zgrupowanie zgodnie z przynależnością gatunkową. Zaobserwowane w dendrogramach różnice mogą wynikać ze zmian w fenotypie bakterii wywołanych działaniem czynnika stresowego, jakim jest HHP.
- 3) W wyniku działania ciśnienia 300 MPa przez 5 min w proteomie LAB dochodzi do zmian, które są widoczne w profilach widm mas białek analizowanych metodą

MALDI-TOF MS, a różnice w profilach mogą skutkować odmienną identyfikacją analizowanych szczepów.

- 4) Ekspresja genów *dnaK*, *ctsR* i *hrcA* w obrębie badanych szczepów kontrolnych i ciśnieniowanych, charakteryzowała się dużą heterogennością i nie korelowała z uzyskanymi profilami polimorfizmów tych genów w LAB.
- 5) Polimorfizmy powstałe w wyniku działania ciśnienia miały charakter neutralny, mutacje niesynonimiczne w niewielkim stopniu oddziaływały na żywotność komórek.
- 6) Wysoki poziom interakcji pomiędzy cząsteczkami *dnaK*, *ctsR* i *hrcA* może wpływać na wyniki identyfikacji uzyskiwane metodami opartymi na analizie białek. Może się to wiązać z większą ilością molekuł zaangażowanych w mechanizm odpowiedzi na stres HHP, a faworyzowanie różnych białek związanych ze zmianami środowiskowymi, może łączyć się z mechanizmem adaptacyjnym bakterii.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Papadimitriou K., Alegría Á., Bron P. A., De Angelis M., Gobbetti M., Kleerebezem M., Lemos J. A., Linares D. M., Ross P., Stanton C., Turrone F., Van Sinderen D., Varmanen P., Ventura M., Zúñiga M., Tsakalidou E., Kok, J. Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80 (3), 837-890. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>.
2. Sun Z., Harris H.M., McCann A., Guo C., Argimon S., Zhang W., Yang X., Jeffery I.B., Cooney J.C., Kagawa T.F., Liu W., Song Y., Salvetti E., Wrobel A., Rasinkangas P., Parkhill J., Rea M.C., O'Sullivan O., Ritari J., Douillard F.P., Paul Ross R., Yang R., Briner A.E., Felis G.E., de Vos W.M., Barrangou R., Klaenhammer T.R., Caufield P.W., Cui Y., Zhang H., O'Toole P.W. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat Commun*, 2015, 6:8322. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9322>.
3. Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goodstein D.M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J.H., Diaz-Muniz I., Dosti B., Smeianov V., Wechter W., Barabote R., Lorca G., Altermann E., Barrangou R., Ganesan B., Xie Y., Rawsthorne H., Tamir D., Parker C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R., O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B., Mills D. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:15611–15616. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0607117103>.
4. Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.I. Gram-positive pathogens, 2nd ed. *American Society for Microbiology*, 2006, Washington, DC.
5. Bucka-Kolendo J., Sokołowska B. Lactic acid bacteria stress response to preservation processes in the beverage and juice industry. *Acta Biochim Pol*, 2017, 64:459–464. https://doi.org/10.18388/abp.2017_1496.
6. Back W. Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology. W. Back (ed.). 2005, Verlag Hans Carl: Nürnberg, Germany, 317 pp.
7. Sauvageot N., Gouffi K., Laplace J., Auffray Y. Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *Int J Food Microbiol*, 2000, 55:167–170. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00191-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00191-4).
8. Garai-Ibabe G., Ibarburu I., Berregi I., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Irastorza A., Dueñas M.T. Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *Int J Food Microbiol*, 2008, 121:253–261. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro..11.004.
9. Juvonen R., Virkajärvi V., Priha O., Laitila A. Microbiological spoilage and safety risks in non-beer beverages. VTT Tiedotteita-Research Notes, 2011, 2599. DOI: 10.13140/RG.2.1.3166.8562.

10. Wouters P.C., Glaasker E., Smelt J.P.P.M. Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64:509–514.
11. Korakli M., Ganzle M.G., Knorr R., Frank M., Rossmann A., Vogel R.F. Metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* under high pressure: investigations using stable carbon isotopes. *Progress in Biotechnology*, 2002, 19:287–294. [http://dx.doi.org/10.1016/S0921-0423\(02\)80114-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-0423(02)80114-9).
12. Welch T.J., Farewell A., Neidhardt F.C., Bartlett D.H. Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J Bacteriol*, 1993, 175:7170–7177.
13. Drews O., Weiss W., Reil G., Parlar H., Wait R., Görg A. High pressure effects step-wise altered protein expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Proteomics*, 2002, 2:765–774. DOI: 10.1002/1615-9861(200206)2:6<765::AID-PROT765>3.0.CO;2-V.
14. Wemekamp-Kamphuis H.H., Karatzas A.K., Wouters J.A. Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68:456–463. DOI: 10.1128/AEM.68.2.456-463.2002.
15. Sato T., Kato C., Horikoshi K. The effect of high pressure on gene expression by the lac and tac promoters in *Escherichia coli*. *J Marine Biotech*, 1995, 3: 89–92.
16. Ehrmann M.A., Scheyhing C.H., Vogel R.F. In vitro stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 32:230–234. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2001.00892.x.
17. Ulmer H.M., Herberhold H., Fahsel S. Effects of pressure induced membrane phase transition on HorA inactivation in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68:1088-1095. DOI: 10.1128/AEM.68.3.1088-1095.2002.
18. Vogel R.F., Pavlovic M., Hörmann S., Ehrmann M.A. High pressure-sensitive expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Brazilian J Med Biol Research*, 2005, 38:1247-1252. DOI: /S0100-879X2005000800013.
19. Scheyhing C.H., Hörmann S., Ehrmann M.A., Vogel R.F. Barotolerance is inducible by preincubation under hydrostatic pressure, cold-, osmotic-, and acid-stress conditions in *Lactobacillus sanfranciscensis*. DSM 2045 20451T. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39:284-289. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2004.01578.x.
20. Considine K.M., Kelly A.L., Fitzgerald G.F., Hill C., Sleator R.D. High-pressure processing effects on microbial food safety and food quality. *Microbiol Lett*, 2008, 281:1-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01084.x
21. Rendueles E., Omer M.K., Alvseike O., Alonso-Calleja C., Capita R., Prieto M. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. *LWT - Food Science and Technology*, 2010, 44:1251-1260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.001>.

22. Serrazanetti D.I., Guerzoni M.E., Corsetti A., Vogel R.F. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol*, 2009, 26:700–711. DOI: 10.1016/j.fm.2009.07.007.
23. Serrazanetti D.I., Gottardi D., Montanari C., Gianotti A. Dynamic Stresses of Lactic Acid Bacteria Associated to Fermentation Processes. *Lactic Acid Bacteria – R&D for Food, Health and Livestock Purposes*, 2013, 23:539-570. <http://dx.doi.org/10.5772/51049>.
24. Lorca G., Font de Valdez G. Lactobacillus stress Responses In Ljung A, Wadström T.(eds.) *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomic to Probiotics*. Caister Academy Press, Norfolk, UK, 2009, 115-129. DOI: 10.1002/elsc.200990012.
25. Sokołowska B., Nasiłowska J. Controlling spoilage and pathogenic microorganisms in beetroot (*Beta vulgaris*) juice by high hydrostatic pressure. *Safety Issues in Beverage Production*. Grumezescu A.M., Holban A.M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020, Volume 18, 79–104.
26. Sokołowska B., Skałupska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Rutkowska M., Dobros N., Rzoska J.S. The impact of high hydrostatic pressure (HHP) on native microflora and the colour of beetroot juice—A preliminary shelf-life study. *Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends*; Mendez-Vilas, A., Ed.; Wageningen Academic Publisher: Wageningen, The Netherlands, 2014, 380–384.
27. Mathias S.P., Rosenthal A., Gaspar A., Argao G.M.F., Slongo-Marcusi A. Prediction of acid lactic-bacteria growth in turkey ham processed by high hydrostatic pressure. *Brazilian J Microbiol*, 2013, 44(1): 23-28. DOI: 10.1590/S1517-83822013005000014.
28. Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 1998, 41:103–125. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00049-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00049-X).
29. Stiles M.E., Holzapfel W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*, 1997, 36:1–29. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0).
30. Zheng Z., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O’Toole, P.W., Pot B., Vandamme P., Walter J., et al. 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*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2020, 70, 2782–2858.
31. Naser S.M., Dawyndt P., Hoste B., Gevers D., Vandemeulebroecke K., Cleenwerck I., Vancanneyt M., Swings J. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(Pt 12):2777-2789. DOI: 10.1099/ijss.0.64711-0.
32. Santos S.R., Ochman H. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins., *Environ Microbiol*, 2004, 6(7), 754–759. DOI:10.1111/j.1462-2920.2004.00617.x .

33. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G. M., Grimont P. A., Kampfer P., Maiden, M. C., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., et al. Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52, 1043–1047.
34. Bucka-Kolendo J., Sokołowska B. Porównanie metod identyfikacji bakterii *Lactobacillus*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2021, 28, 2 (127), 49-60. DOI: 10.15193/zntj/2021/127/377.
35. Chao S.-H., Kudo Y., Tsai Y.-Ch., Watanabe K. *Lactobacillus futsaii* sp. nov., isolated from fu-tsai and suan-tsai, traditional Taiwanese fermented mustard products. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, 62 (3), 489-494.
36. Sánchez-Juanes F., Teixeira-Martín V., González-Buitrago J.M., Velázquez E., Flores-Félix J.D. Identification of species and subspecies of lactic acid bacteria present in Spanish cheeses type “Torta” by MALDI-TOF MS and *pheS* gene analyses. *Microorganisms*, 2020, 8(2), #301.
37. Schuman P., Maier T., Chapter 13 - MALDI-TOF Mass Spectrometry Applied to Classification and Identification of Bacteria, *Methods in Microbiology*, Academic Press, 2014, 41, 275-306, <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.06.002>.
38. Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P-E., Rolain J.M. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 49,4, 543-551. <https://doi.org/10.1086/600885>.
39. Bucka-Kolendo J., Sokołowska B., Winiarczyk S. Influence of High Hydrostatic Pressure on the Identification of *Lactobacillus* by MALDI-TOF MS-Preliminary Study. *Microorganisms*, 2020, 8, 813. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060813>.
40. Akimowicz M., Bucka-Kolendo J.: MALDI-TOF MS – application in food microbiology. *Acta Biochim. Pol.*, 2020, (3) 67, 327-332. https://doi.org/10.18388/abp.2020_5380.
41. Rezzonico F., Vogel G., Duffy B., Tonolla M. Application of Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Identification and Clustering Analysis of *Pantoea* Species. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76, 4497-4509. DOI:10.1128/AEM.03112-09.
42. Booth I.R. Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food Microbiol*, 2002, 78:19–30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00239-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00239-8).
43. Papadimitriou K., Pratsinis H., Nebe-von Caron G., Kletsas D., Tsakalidou E. Acid tolerance of *Streptococcus macedonicus* as assessed by flow cytometry and single-cell sorting. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73:465– 476. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01244-06>.
44. Renye J.A., Piggot P.J., Daneo-Moore L., Buttaro B.A. Persistence of *Streptococcus* mutants in stationary-phase batch cultures and biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70:6181–6187. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.10.6181-6187.2004>.

45. Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D., Faucher S.P. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol*, 2014, 5:258. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>.
46. Galhardo R.S., Hastings P.J., Rosenberg S.M. Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2008, 42:399–435. <http://dx.doi.org/10.1080/10409230701648502>.
47. Varhimo E, Savijoki K, Jalava J, Kuipers OP, Varmanen P. Identification of a novel streptococcal gene cassette mediating SOS mutagenesis in *Streptococcus uberis*. *J Bacteriol*, 2007, 189:5210–5222. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00473-07>.
48. Machielsen R., van Alen-Boerrigter I.J., Koole L.A., Bongers R.S., Kleerebezem M., Van Hylckama Vlieg J.E.T. Indigenous and environmental modulation of frequencies of mutation in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76:1587–1595. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02595-09>.
49. Martín-Galiano A.J., Overweg K., Ferrándiz M.J., Reuter M., Wells J.M., de la Campa A.G.. Transcriptional analysis of the acid tolerance response in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, 2005, 151:3935–3946. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.28238-0>.
50. Muller S., Nebe-von Caron G. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34:554–587. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00214.x>.
51. Bucka-Kolendo J., Juszczuk-Kubiak E., Sokołowska B. Effect of High Hydrostatic Pressure on Stress-Related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* Expression Patterns in Selected *Lactobacilli* Strains. *Genes*, 2021, 12, 1720. <https://doi.org/10.3390/genes12111720>.
52. Mbye M., Baig, M.A., AbuQamar S.F., El-Tarabily K.A., Obaid, R.S., Osaili T.M., Al-Nabulsi A.A., Turner M.S., Nagendra P.S., Ayyash M.M. Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2020, 19, 1110–1124.
53. Darans N., Badosa E., Frances J., Montesinos E., Bonaterra A. Enhancing water stress tolerance improves fitness in biological control strains of *Lactobacillus plantarum* in plant environments. *PLoS ONE*, 2018, 13, e0190931.
54. Koch B., Kilstrup M., Vogensen F.V., Hammer K. Induced levels of heat shock proteins in a *dnaK* mutant of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 1998, 180, 3873–3881.
55. Palud A., Scornec H., Calvin J.-F., Licandro H. New genes involved in mild stress response identified by transposon mutagenesis in *Lactobacillus paracasei*. *Front Microbiol*, 2018, 9, 535.
56. Guidone A., Parente E., Zotta T., Guinane C.M., Rea M.C., Stanton C., Ross R.P., Ricciardi A. Polymorphisms in stress response genes in *Lactobacillus plantarum*: Implications for classification and heat stress response. *Ann. Microbiol*, 2015, 65, 297–305.

57. Ulrich L.E., Koonin E.V., Zhulin I.B. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol*, 2005, 13:52– 56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2004.12.006>.
58. Chastnet A., Fert J., Msadek T. Comparative genomic reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Mol, Microbiol*, 2003, 47:1061-1073. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03355.x.
59. Chastnet A., Msadek T. ClpP of *Sreptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, 2003, 185:683-687. DOI: 10.1128/JB.185.2.683-687.2003.
60. Castaldo C., Siciliano R.A., Muscariello L., Marasco R., Sacco M. CcpA affects expression of the groESL and dnaK operons in *Lactobacillus plantarum*. *Microbial Cell Factories*. 2006, 5:35. DOI: 10.1186/1475-2859-5-35.
61. Ricciardi A., Parente E., Guidone A., Ianniello R.G., Zotta T., Abu Sayem S.M., Varcamonti M. Genotypic diversity of stress response in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantalum* and *Lactobacillus pentosus*. *Int J Food Microbiol*. 2012, 157:278-285. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.018.
62. Zuber U., Schumann W. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon dnaK of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1994, 176 (5) 1359-1363. DOI: 10.1128/jb.176.5.1359-1363.1994.
63. Van de Guchte M., Serror P., Chervaux Ch., Smokvina T., Ehrlich S.D., Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 82: 187-216. DOI: 10.1023/A:1020631532202.
64. Roncarati D., Scarlato V. Regulation of heat-shock genes in bacteria: From signal sensing to gene expression output. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41, 549–574.
65. Hunt R., Sauna Z.E., Ambudkar S.V., Gottesman M.M., Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol*, 2009, 578:23-39. DOI: 10.1007/978-1-60327-411-1_2.
66. Bailey S.F., Angela L., Morales A., Kassen R. Effects of Synonymous Mutations beyond Codon Bias: The Evidence for Adaptive Synonymous Substitutions from Microbial Evolution Experiments, *Genome Biol Evol*, 2021, 13 (9). <https://doi.org/10.1093/gbe/evab141>.
67. Agashe D., Martinez-Gomez N.C., Drummond D.A., Marx C.J. Good codons, bad transcript: large reductions in gene expression and fitness arising from synonymous mutations in a key enzyme. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(3):549-560.
68. Fuller Z.L., Haynes G.D., Zhu D., Batterton M., Chao H., Dugan S., Javaid M., Jayaseelan J.C., Lee S., Li M., Onger F., Qi S., Han Y., Doddapaneni H., Richards S., Schaeffer S.W. Evidence for stabilizing selection on codon usage in chromosomal rearrangements of *Drosophila pseudoobscura*. *G3 (Bethesda)*. 2014, 4(12):2433-49. DOI: 10.1534/g3.114.014860.

69. Lebeuf-Taylor E., McCloskey N., Bailey S.F., Hinz A., Kassen R. The distribution of fitness effects among synonymous mutations in a gene under directional selection. *eLife*, 2019, 8:e45952. DOI: 10.7554/eLife.45952.
70. Lind P.A., Berg O.G., Andersson D.I. Mutational robustness of ribosomal protein genes. *Science*, 2010, 330(6005):825-827.
71. Kudla G., Murray A.W., Tollervey D., Plotkin J.B. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science*, 2009, 324(5924):255-258.
72. Bucka-Kolendo J., Sokołowska B. Impact of High Hydrostatic Pressure (HHP) on the Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) of stress-related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* in the *Lactobacillus* strains. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2022, 14(4):54-66, DOI: 10.15586/qas.v14i4.1132.
73. Kristofich J., Morgenthaler A.B., Kinney W.R., Ebmeier C.C., Snyder D.J., Old W.M., Cooper V.S., Copley S.D. Synonymous mutations make dramatic contributions to fitness when growth is limited by a weak-link enzyme. *PLoS Genet*, 2018, 14(8):e1007615. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007615.
74. Naser S., Thompson F., Hoste B., Gevers D., Dawyndt P., Vancanneyt M., Swings J. Application of multilocus sequences analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 2005, 151, 2141-2150.

9. CYKL PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

PUBLIKACJA 1

Bucka-Kolendo Joanna, Sokołowska Barbara (2017)

Lactic acid bacteria stress response to preservation processes in
beverage and juice industry.

Acta Biochimica Polonica, vol.63, 3, 459-464.

DOI:10.18388/abp.2017_1496.

Lactic acid bacteria stress response to preservation processes in the beverage and juice industry

Joanna Bucka-Kolendo[✉] and Barbara Sokołowska

Department of Fruit and Vegetable Products Technology, prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Warsaw, Poland

In this review we summarize stress factors that affect the lactic acid bacteria (LAB) and cause different molecular stress responses. LAB belong to a group of bacteria that is very widespread in food and beverages. They are present, and desired, in fermented products like yogurts, cheese, vegetables, meat or wine. In most of them, LAB are providing positive sensory and nutritive features. However, as harmless and desired microbes in one product, LAB can cause spoilage and a bad taste of others, especially in juices and beverages. LAB are resistant to many stress factors which allows them to survive in harsh environments. The most common stress factors they have to deal with are: heat, cold, acidity, NaCl and high hydrostatic pressure (HHP). Their ability to survive depends on their skills to cope with stress factors. Under stress conditions, LAB activate mechanisms that allow them to adjust to the new conditions, which can influence their viability and technological properties. This ability to adapt to different stress conditions may come from the cross-protection systems they have, as resistance to one factor may help them to deal with the other stress effectors. LAB are highly valuable for the food industry and that is why it is important to understand their stress response mechanisms.

Key words: Lactic acid bacteria, LAB, stress factors, stress response, cross-protection

Received: 05 January, 2017; revised: 12 April, 2017; accepted: 12 April, 2017; available on-line: 09 August, 2017

[✉]e-mail: joanna.bucka@ibprs.pl

Abbreviations: HHP, high hydrostatic pressure; LAB, lactic acid bacteria

INTRODUCTION

Lactic Acid Bacteria (LAB) are the most widespread group of bacteria that is used in fermented foods. They are natural inhabitants of the human gastric intestine, and can be applied in different fermented products and probiotic foods (Ficco *et al.*, 2009). They are present in products like yogurts, sourdoughs, sour vegetables, cheese, wine or meat and play a crucial role in the development of the organoleptic and hygienic quality of fermented products (van de Gutche *et al.*, 2002). The technological benefit of Lactic Acid Bacteria depends on the ability to enhance safety, flavour, texture and nutritional value (Salminen & von Wright, 2004). Some LAB, due to their probiotic properties, can be used in the production of functional food and potential oral vaccines (Shah 2007; Siragusa *et al.*, 2007; Parente *et al.*, 2010).

At the same time, LAB can cause spoilage of food. They can grow in improperly pasteurized beverages and

juices in bottles and cans, in vacuum packed products with a deficit of oxygen. LAB can enter a given product along with the raw material, additives or with packing materials (Lawlor *et al.*, 2009). The most common species that cause spoilage of beverages are *Lactobacillus paracasei* and *Leuconostoc mesenteroides* (Back, 2005), as well as *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus perolens* and *Weissella confusa*. Many bacteria from these species are also responsible for beer spoilage.

LAB mainly ferment sucrose to lactic acid. Depending on the species and growth conditions, catabolism of sugars can also lead to the formation of ethanol, acetate, formic acid or succinate (Hammes & Hertel, 2009). Some of the bacteria can produce diacetyl that gives a bitter taste and flavour of the products. That is why LAB are undesirable in beverages and juices. It has been reported that formic acid in apple juices can indicate food spoilage (Gökmen & Acar, 2004). The *L. mesenteroides* and *W. confusa* bacteria can synthesize compounds which cause ropiness of the final product (Back, 2005). Ropiness caused by LAB is the reason why these bacteria are believed to be potentially a cider spoilage indicator (Ibarburu *et al.*, 2010).

In alcohol beverages, LAB can influence the bitter flavor by converting glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde, which can transform to acrolein and bind with polyphenols creating bitter compounds (Sauvageot *et al.*, 2000; Garai-Ibabe *et al.*, 2008; Juvonen *et al.*, 2011).

PRESERVATION METHODS

Many factors affecting bacteria during the preservation process of beverages and juices can act as potential stress effectors for them. Physical preservation techniques of food are used in order to reduce the number, or to prevent the growth of unwanted microflora in the products (Juvonen *et al.*, 2011). Traditional prevention techniques used in the beverage industry include thermal processing and filtration. Thermal processing is the most efficient technique of food preservation. It can prevent not only the growth of unwanted microflora but also can suppress unwanted enzymatic activity (Back 2005). However, processes that use high temperatures destroy many bioactive and aromatic compounds, causing modification of the flavor, color and nutritional value. The increase of consumer demands for “fresh like” foods brings new challenges for techniques used in food preservation. Nowadays, high hydrostatic pressure techniques (HHP) are used more often, as they can reduce the number of microbes in liquid food products like beverages, juices and alcohol beverages – beer, wine or cider.

High hydrostatic pressure can induce in bacteria many changes, like physiological changes (Wouters *et al.*, 1998; Korakli *et al.*, 2002), changes in gene expression (Welch *et al.*, 1993; Drews *et al.*, 2002; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002) and in protein translation (Sato *et al.*, 1995; Ehrmann *et al.*, 2001), and can also lead to cell damage (Ulmer *et al.*, 2002) and death (Vogel *et al.*, 2002; Scheyhing *et al.*, 2004). HHP does not break the covalent bindings. Thanks to this, the primary structure of proteins and fatty acids stays unaffected (Considine *et al.*, 2008; Reundueles *et al.*, 2011). Molecules, like vitamins, amino acids, flavor compounds and other small molecules stay undamaged by HHP, as well as organoleptic characteristics of food. Serrazanetti and coworkers (2009 and 2013) had shown that some proteins undergo induction as a result of HHP, and a few of them are also involved in different types of stress responses including cross-protection.

Stress response to HHP cannot be expected in LAB while it is performed in their natural environment, as those bacteria are not normally exposed to this stress factor (Lorca & Font de Valdez, 2009). Compared to other stress factors, LAB response to HHP is more complex, as some of the effects are very similar to those caused by other factors. Their ability to react to HHP can be explained by a bacteria cross-protection system to different stress factors (Scheyhing *et al.*, 2004; Lorca & Font de Valdez, 2009). However, the LAB cross-protection response to HHP is not well documented in the literature as yet. In *Lactobacillus plantarum*, higher sensitivity to HHP was observed when heat shock was used at the same time as HHP.

As shown by Sokolowska and coworkers (2012 and 2014), LAB belong to a group of organisms that are resistant to the effect of high hydrostatic pressure, and their growth can be a valuable tool to evaluate the shelf life of preserved products with this method (Mathias *et al.*, 2013).

LAB STRESS RESPONSE MECHANISMS

It is believed that environmental stress response in LAB can vary between species and depends on the type of stress that has been applied (van de Gutche *et al.*, 2002). The well-known LAB stress responses are those to heat shock (De Angelis *et al.*, 2004), bile (Bron *et al.*, 2006), and oxidative (Serrano *et al.*, 2007), low pH and ethanol stresses (Alegria *et al.*, 2004; Parente *et al.*, 2010).

Bacterial stress response is based on coordinated genes expression that affects different cellular processes (cell division, transport, cell membrane composition, DNA metabolism) (Storz & Hengge-Aronis, 2000; van de Gutche *et al.*, 2002). LAB achieve an integrated stress response through a regulatory web that allows them to react to environmental changes. Bacteria activate mechanisms allowing them to adapt to new conditions, which can influence the viability and technological properties. Adaptation to stress conditions can also cause morphological changes which affect food spoilage (Asano *et al.*, 2007). Many typical spoilages that occur in beverages, juices and alcohol beverages, like ropiness and volatile phenols formation, are related to stress. LAB have a significance in the food industry and that is why knowing their stress effectors is very important (van de Guchte *et al.*, 2002; Parente *et al.*, 2010). Under stress conditions, in order to protect cells from influence of the same or other type of stress factors, bacteria can trigger a cross-protection response (van de Guchte *et al.*, 2002; Smits & Brul, 2005; Chung *et al.*, 2006).

GENE REGULATION IN THE LAB STRESS RESPONSE

In an unfavourable environment, many forms of LAB can convert into VBNC – a viable but nonculturable state. In this state, the bacteria cannot be identified with classical microbiology methods, and this can be achieved only with the use of more advanced molecular biology techniques. Considering niche differentiation that LAB are able to colonize, a high phenotype and genotype diversity is observed (Molenaar *et al.*, 2005; Di Cagno *et al.*, 2010; Siezen *et al.*, 2010; Ricciardi *et al.*, 2012). Gene expression caused by different stress factors allows to identify biomarkers responsible for stress resistance (Juvonen *et al.*, 2011).

Depending on the type of regulation, these genes are divided into six classes (Helman *et al.*, 2001; Darmon *et al.*, 2002; Schumann, 2003; Castaldo *et al.*, 2006).

Class I and III are controlled by two types of transcriptional repressors: HrcA and CtsR. The first class is comprised by heat shock genes, including the *dnaK* and *groEL* operons. They encode proteins belonging to two chaperon complexes, DnaK-GrpE-DnaJ and GroES-GroEL, respectively (Castaldo *et al.*, 2006). Both operons are regulated by the HrcA repressor protein, which binds with the CIRCE operator (Controlling Inverted Repeat for Chaperon Expression) under the stress-free conditions. Genes encoding heat shock proteins and HrcA are being used for taxonomical purposes of several species, including *Lactobacillus* (Blaiotta *et al.*, 2008; Fiocco *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010; Guidone *et al.*, 2015).

The class II gene expression is dependent on the σ^B sigma factor, the synthesis and activity of which is increased under different stresses (Hecker *et al.*, 1996; Kruger & Hecker, 1998; Varmanen *et al.*, 2000).

Mechanisms of class IV transcriptional activation are not very well documented, while class V genes undergo regulation by a two-component signal transduction system (2CSs); for class VI, the regulation is still unknown (Schumann, 2003).

Initially, mechanism of the LAB response to stress conditions was compared with that of the documented model species – *B. subtilis* and *E. coli*. The best known stress response mechanisms are those present in the *Bacillus subtilis* species, where, at high temperatures over 200 genes are expressed (as shown by Castaldo *et al.*, 2006). However, it had turned out that there were some differences in these mechanisms. As Ricciardi and coworkers had shown, the Class I and Class III genes' stress response regulation differs in *Lactobacillus plantarum* from *Bacillus subtilis*, a model organism of Gram-positive bacteria. Other data suggest that stress response factors, like sigma factors, that are responsible for stress response in many Gram-positive and Gram-negative bacteria, are not important for LAB. The most striking difference is the lack of the σ^B sigma factor, while several stress proteins, like DnaK, GroEL, Clp etc., and their regulators HrcA and CtsR are conserved.

The LAB stress response is regulated by a one-component regulatory system. For the Class I genes, major complexes of chaperons, like GroES-GroEL and GroE-DnaK-DnaJ (Lorca & Font de Valdez, 2009), are induced. Induction of these genes correlates with acid, ethanol, cold, osmotic, starvation and temperature stresses. In some bacteria, regulation of the GroES-GroEL and GroE-DnaK-DnaJ complexes, requires the presence of a σ^A sigma factor promoter and a highly conserved inverted repeat CIRCE, which binds the HrcA repressor (Zuber and Schumann 1994).

Table 1. Response mechanisms of LAB to various stress conditions encountered during food processing and the major stress proteins or enzymes involved in the response (adapted from Ananta & Knorr, 2004; Pavlovic *et al.*, 2005; Jofre *et al.*, 2007; Franz & Holzapfel, 2011; Mota *et al.*, 2013)

Stress response	Reported cross-resistance	Stress related resistance mechanism	Stress-related proteins/enzymes involved
Acid stress response Two general types: During log growth phase (L-ATR; induced by non-lethal low pH) In stationary phase, induction of general stress response	Heat, osmotic, oxidative (varies between species)	ATP-dependent expulsion of proteins by protein pump Activation of arginine deiminase pathway-production of basic compounds (e.g. ammonia) Amino acid decarboxylation reactions & electrogenic transport Change in cell envelope composition of damaged proteins, DNA & cell components Incremental expression of regulators that promote minor or global responses Induction of heat shock proteins	F ₀ F ₁ -ATPase K ⁺ -ATPase Arginine deiminase Urease Ornithine/arginine/lysine decarboxylase Lo18 Ffh Heat shock chaperones & regulators (DnaK, GroEL, HrcA, CtsR) recA, AP endonuclease, UvrSystem
Oxidative stress response	Heat, acid, general stress resistance	Reducing intracellular environment Prevention of reactive oxygen species formation Target protection Repair of oxidative damage	Glutathione peroxidase, glutathione reductase Thioredoxin, thioredoxin reductase NADH oxidase Catalase Pseudocatalase Superoxide dismutase Methionine sulfoxide reductase Mannose phosphotransferase system FLP (FNR-like protein) RecA Phosphate ABC transporter
Cold stress response Transient adaptive response i.e. cold shock response	Heat shock, freezing (cryotolerance)	Production of cold-induced proteins (CIPs) to maintain membrane fluidity DNA supercoiling Transcriptional & translation	CIPs involved in Sugar metabolism (Hpr, CcpA, β -PGM, β -phosphoglucomutase) Chromosome structuring (HslA) Signal transduction (LlrC) Stress adaptation (OsmC) Proteolysis of misfolded proteins (ClpX ATPase) Cold shock protein (CSPs) CspA-CspG, vary in number according to species
Osmotic stress response	Heat shock	Exchange of compatible solutes to maintain osmotic balance	ATP-dependent uptake system (QacT) or ABC transporter (OpuA or BusA) (species-dependent) for uptake of glycine-betaine, carnitine and proline during hyperosmotic stress conditions, efflux by unidentified channel protein General stress proteins (GroEL, GroES, DnaK) Proteases FtsH, HtrA
Heat shock response	Acid, oxidative, cold, osmotic, alcohol	Production of heat-inducible chaperones Production of heat-inducible proteases Production of heat shock proteins	Chaperon complex DnaK-GrpE-DnaJ & GroES-GroEL HtrA/DegP protease, FtsH/HflB protease, Clp protease (ClpB,C,E,P,Q,X & Y), Lon protease Trigger factor, HrcA, HSP10, HSP23 (ClpP), HSP26, HSP33, HSP40, DnaK/HSP70, GroEL/HSP60, HSP84, HSP85, HSP100 Small heat shock proteins (sHSPs), e.g. Lo18, HSP18.5, HSP18.55, HSP19.3, HSP16.4, HSP20
Bile stress response	Heat	Metabolism of bile salts Adaptation to bile stress MDR efflux	Bile salt hydrolase (BSH) DnaK, GroEL MDR transporters
Nutrition starvation stress response	Heat, oxidative, ethanol, acid, osmotic	Modification of cell morphology Regulation of metabolism Amino acid (arginine) catabolism	General stress proteins Proteins involved in carbon metabolism (triose phosphate isomerase, putative dihydroxy-acetone kinase, Gls24 protein) Proteins involved in amino acid catabolism (carbamate kinase, putative glycine cleavage system, L-serine dehydrogenase)

Ethanol stress response	Heat, acid	Production of heat shock proteins	sHSPs, HSP18
High pressure stress response	Heat, cold	Biosynthesis of proteins preventing thermal degradation Expression of ribosomal protein genes Synthesis of translation factors Transcription factors Protein folding and stabilization Energy metabolism-glycolysis Cellular processes- adaptation to atypical conditions Nucleotide and nucleoside interconversion DNA replication, recombination and repair	Chaperones & ATP-dependent protease Translation factors (EF-G, EF-TU), genes changing translation or chaperones (GroEL, CplL) Proteins HSP60, gryA Ribosome recycling factor (Rrf)Lsa1262 Transcription antitermination protein (NusG) Lsa1674 DnaK chaperone protein (DnaK) Lsa1236 Glyceraldehyde 3-P-dehydrogenase (Gap) General stress protein Lsa0169 General stress protein Lsa0170 Universal stress protein (Usp6) Lsa0836 Universal stress protein (Usp5)Lsa0038 Cold shock protein A family (Csp1) Lsa0768 Adenylate kinase; Ec 2.7.4.3 (Adk) Lsa1744 Single-stranded DNA binding protein (Ssb) Lsa0008

Regulation of heat stress response genes in Gram-positive bacteria was described as HrcA or CtsR dependent. This statement is still valid for *B. subtilis* and closely related to them *Clostridium perfringens* or *Listeria monocytogenes* bacteria (Chastanet *et al.*, 2003, Chastanet and Msadek 2003, Lorca and Font de Valdez 2009).

The Class III heat shock genes CtsR repressor binds directly to a specific repeat sequence (the CtsR Box: a/ggtcaaaNaNa/ggtcaaa)(Derre *et al.*, 2000). This sequence was found in other Gram-positive bacteria, like: *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Leuconostoc oenos*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus lactis*, and *Clostridium acetobutylicum* (Smeds *et al.*, 1998, Derre *et al.*, 1999, Ingmer *et al.*, 1999).

In *Lactobacillus plantarum*, CtsR regulates transcription of the *ctsR-clpC* operon, *hsp1* and *ftsH* (Russo *et al.*, 2012). Deletion of CtsR influences the temperature sensitivity and changes morphology of cells under stress. It suggests that in *L. plantarum*, CtsR has a significant role in the heat shock tolerance by controlling the processes of protein quality (Fiocco *et al.*, 2009, Fiocco *et al.*, 2010). CtsR gene homologs were also identified in other bacteria: *Listeria*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* or *Clostridium*, which indicates that heat shock gene regulation by CtsR is highly conserved in those bacteria. That allows us to state that heat shock response regulation by CtsR is highly conserved in the Gram-positive bacteria (Derre *et al.*, 1999).

Stress response to HPP has been well studied in the *L. sakei* and *L. sanfranciscensis* strains (Hörmann *et al.*, 2006; Jofré *et al.*, 2007). Hörmann *et al.*, (2006) had observed changes in the expression of 16 genes in *Lactobacillus sanfranciscensis* as an effect of HPP. Nine of those genes were over-expressed and seven were silenced as a result of stress. That can suggest that in LAB the stress response to HPP is negatively regulated by a one component protein system HrcA or CtsR, and by a two-component system of signal transduction (2CSs).

An overview of different types of the LAB stresses, their reported cross-resistance and the resistance mechanisms are shown in Table 1.

CONCLUSION

Growing pressure to lower the use of thermal processes and chemical preservatives in beverages and juices leads to maintain more natural products. However, this process may cause higher contamination by unwanted compounds produced by LAB. Although they may be harmless and desired microbes in one product, LAB can cause spoilage of other products.

A comparative study of the response of different bacterial strains to the same stress factors shows their diverse characteristics. In the context of food protection treatment, it is important to take under consideration that even closely related organisms can possess their individual, specific stress response mechanisms.

That is why, for different bacterial strains, there is a cross-response to various stress factors and cross-protection to different food preservation systems, like HHP, acidic, cold, and salt treatment, which needs to be taken under consideration.

Therefore the identification of stress response regulatory genes, like HrcA, CtsR, DnaK and FtsH, is necessary to control and evaluate the relationship between polymorphism of LAB in food products and the ability to cope with stress. At the same time, as a consequence of a highly conserved status in bacteria, these genes can be used as biomarkers.

Although present molecular methods allow to better understand the LAB taxonomy, it is believed that more data is needed to understand the stress related physiological dependence of those bacteria (De Angelis & Gobetti, 2011).

Genetic diversity evaluation of lactic acid bacteria, as an effect of stress factors that can occur during beverage and juice preservation processes, is important to control LAB in those products. A better understanding of the stress response related mechanisms in LAB allows to understand the basis of adaptation response and cross-

protection mechanism they undergo (Van de Guchte *et al.*, 2002), and thus can make these bacteria more useful in industrial processes.

REFERENCES

- Alegría EG, López I, Ruiz JI, Saenz J, Fernández E, Zarazaga M, Dizy M, Torres C, Ruiz-Larrea F (2004) High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol Lett* **230**: 53–61. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00854-1
- Ananta E, Knorr D (2004) Evidence on the role of protein biosynthesis in the induction of heat tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG by pressure pre-treatment. *Int J Food Microbiol* **96**: 307–313. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.012
- Asano S, Suzuki K, Iijima K, Motoyama H, Kuriyama H, Kitagawa Y (2007) Effect of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *J Biosci Bioengin* **104**: 334–338. doi: 10.1263/jbb.104.334
- Back W (2005) Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology. Back ed. pp 317. Verlag Hans Carl: Nürnberg, Germany
- Blaiota G, Fusco V, Ercolini D, Aponte M, Pepe O, Villani F (2008) Lactobacillus strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. *Appl Environ Microbiol* **74**: 208–215. doi: 10.1128/AEM.01711-07
- Bron PA, Molenaar D, de Vos WM, Kleerebezem M (2006) DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol* **100**: 728–738. <http://dx.doi.org/10.4161/mbug.2.2.13910>
- Castaldo C, Siciliano RA, Muscariello L, Marasco R, Sacco M (2006) CcpA affects expression of the groESL and dnaK operons in *Lactobacillus plantarum*. *Microbial Cell Factories* **5**: 35. doi: 10.1186/1475-2859-5-35
- Chastnet A, Fert J, Msadek T (2003) Comparative genomic reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **47**: 1061–1073. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03355.x
- Chastnet A, Msadek T (2003) ClpP of *Sreptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **185**: 683–687. doi: 10.1128/JB.185.2.683-687.2003
- Chung HJ, Bang W, Drake M (2006) Stress response of *Escherichia coli*. *Comp Rev Food Sci Food Safety* **5**: 52–64. doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.00002.x
- Considine KM, Kelly AL, Fitzgerald GF, Hill C, Sleator RD (2008) High-pressure processing effects on microbial food safety and food quality. *Microbiol Lett* **281**: 1–9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01084.x
- Darmon E, Noone D, Masson A, Bron S, Kuipers OP, Devine KM, van Dijk JM (2002) A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsrRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**: 5661–5671. doi: 10.1128/JB.184.20.5661-5671.2002
- De Angelis M, Di Cagno R, Huet C, Crecchio C, Fox PF, Gobetti M (2004) Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1336–1346. doi: 10.1128/AEM.70.3.1336-1346.2004
- De Angelis M, Gobetti M (2011) Stress responses of lactobacilli. In *Stress responses of lactic acid bacteria*, Papadimitriou K, Tsakalidou E eds, pp 219–249. Springer, New York. doi: 10.1007/978-0-387-92771-8
- Derré I, Rapoport G, Msadek T (1999) CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **31**: 117–131. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01152.x
- Derré I, G. Rapoport G, Msadek T (2000). The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37°C. *Mol Microbiol* **38**: 335–347. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02124.x
- Derré I, Rapoport G, Devine K, Rose M, Msadek T (1999) ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**: 581–593. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01374.x
- Di Cagno R, Minervini G, Sgarbi E, Lazzi C, Bernini V, Neviani E, Gobetti M (2010) Comparison of phenotypic (Biolog System) and genotypic (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR, and amplified fragment length polymorphism, AFLP) methods for typing *Lactobacillus plantarum* isolates from raw vegetables and fruits. *Int J Food Microbiol* **143**: 246–253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.018
- Drews O, Weiss W, Reil G, Parlar H, Wait R, Görg A (2002) High pressure effects step-wise altered protein expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Proteomics* **2**: 765–774. doi: 10.1002/1615-9861(200206)2:6<765::AID-PROT765>3.0.CO;2-V
- Ehrmann MA, Scheyhing CH, Vogel RF (2001) *In vitro* stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions. *Lett Appl Microbiol* **32**: 230–234. doi: 10.1046/j.1472-765X.2001.00892.x
- Fiocco D, Collins M, Muscariello L, Hols P, Kleerebezem M, Msadek T, Spano G (2009) The *Lactobacillus plantarum* *ftsH* gene is a novel member of the CtsR stress response regulon. *J Bacteriol* **191**: 1688–1694. doi: 10.1128/JB.01551-08
- Fiocco D, Capozzi V, Collins M., Gallone A, Hols P, Guzzo J, Weidmann S, Rieu A, Msadek T, Spano G (2010) Characterization of the CtsR stress response regulon in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* **192**: 896–900. doi: 10.1128/JB.01122-09
- Franz CMAP and Holzapfel WH. (2011) Chapter 1. The Importance of Understanding the Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. In *Stress responses of lactic acid bacteria*, Papadimitriou K, Tsakalidou E eds, **530**: 13–15. Springer Science & Business Media. doi: 10.1007/978-0-387-92771-8
- Garai-Ibabe G, Ibarburu I, Berregi I, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Irastorza A, Dueñas MT (2008) Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in ciderrmaking. *Int J Food Microbiol* **121**: 253–261. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.11.004
- Gökmen V, Acar J (2004) Fumaric acid: The indicator of microbial spoilage of apple juice. *Food Additives and Contaminant* **21**: 626–631. doi: 10.1080/02652030410001712501
- Guidone A, Parente E, Zotta T, Guinane CM, Rea MC, Stanton C, Ross RP, Ricciardi A (2015) Polymorphisms in stress response genes in *Lactobacillus plantarum*: implications for classification and heat stress response. *Ann Microbiology* **65**: 297–305. doi:10.1007/s13213-014-0862-7
- Hammes W, Hertel C (2009) Genus I. *Lactobacillus beijerinckii* 1901, 212AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB eds, 2nd edn, pp 465–513. New York, Springer. doi: 10.1007/0-387-28022-7
- Hecker M, Schumann W, Volker U (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 417–428. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.396932.x
- Helmann JD, Wu MF, Kobel PA, Gamo FJ, Wilson M., Morshedi MM, Navre M, Paddon C. (2001) Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J Bacteriol* **183**: 7318–7328. doi: 10.1128/JB.183.24.7318-7328.2001
- Hörmann S, Scheyhing C, Behr J, Pavlovic M, Ehrmann M, Vogel RF (2006) Comparative proteome approach to characterize the high-pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451(T). *Proteomics* **6**: 1878–1885. doi: 10.1002/pmic.200402086
- Huang CC, Lee FL, Liou JS (2010) Rapid discrimination and classification of the *Lactobacillus plantarum* group based on a partial dnaK sequence and DNA fingerprinting techniques. *Antonie Van Leeuwenhoek* **97**: 289–296. doi: 10.1007/s10482-009-9409-5
- Ibarburu I, Aznar R, Elizaguibel P, García-Quintás N, Lopés P, Mundeate A, Irastorza A, Dueñas MT (2010) A real time PCR assay for detection and quantification of 2-branched (1,3)-D-glucan producing lactic acid bacteria in cider. *Int J Food Microbiol* **143**: 26–31. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.023
- Ingmer H, Vogensen FK, Hammer K, Kilstrop M (1999) Disruption and analysis of the clpB, clpC and clpE genes in *Lactobacillus lactis*: ClpE, a new Clp family in Gram-Positive bacteria. *J Bacteriol* **181**: 2075–2083
- Jofré A, Champomier-Vergès M, Anglade P, Baraige F, Martin B, Garriga M, Zagorec M, Aymerech T (2007) Protein synthesis in lactic acid and pathogenic bacteria during recovery from a high pressure treatment. *Res Microbiol* **158**: 512–520. doi:10.1016/j.resmic.2007.05.005
- Juvonen R, Virkajärvi V, Priha O, Laitila A (2011) Microbiological spoilage and safety risks in non-beer beverages. *VTT Tiedotteita-Research Notes* 2599. doi: 10.13140/RG.2.1.3166.8562
- Korakli M, Ganzle MG, Knorr R, Frank M, Rossmann A, Vogel RF (2002) Metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* under high pressure: investigations using stable carbon isotopes. *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology* **19**: 287–294. [http://dx.doi.org/10.1016/S0921-0423\(02\)80114-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-0423(02)80114-9)
- Kruger E, Hecker M (1998) The first gene of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon, *atsR*, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. *J Bacteriol* **180**: 6681–6688
- Lawlor K, Schuman J, Simpson P, Taormina J (2009) In *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Food Microbiology and Safety*, Sperber WH, Doyle MP eds, pp 245–283. Springer New York. doi: 10.1007/978-1-4419-0826-1
- Lorca G, Font de Valdez G (2009) Lactobacillus stress Responses In *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomic to Probiotics*, Ljung A, Wadström T eds, pp 115–129. Caister Academy Press, Norfolk, UK. doi: 10.1002/elsc.200990012
- Mathias SP, Rosenthal A, Gaspar A, Argao GMF, Slongo-Marcusi A (2013) Prediction of acid lactic-bacteria growth in turkey ham processed by high hydrostatic pressure. *Brazilian J Microbiol* **44**: 23–28. doi: 10.1590/S1517-83822013005000014

- Molenaar D, Bringel F, Schuren FH, de Vos WM, Siezen RJ, Kleerebezem M (2005) Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *J Bacteriol* **187**: 6119–6127. doi: 10.1128/JB.187.17.6119-6127.2005
- Mota MJ, Lopes RP, Delgado I, Saraiva JA (2013) Microorganisms under high pressure-adaptation, growth and biotechnological potential. *Biotechnol Adv* **31**: 1426–1434. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.06.007
- Parente E, Ciocia F, Ricciardi A, Zotta T, Felis GE, Torriani S (2010) Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. *Int J Food Microbiol* **144**: 278–289. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.005
- Rendueles E, Omer MK, Alvseike O, Alonso-Calleja C, Capita R, Prieto M (2010) Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT – Food Science and Technology* **44**: 1251–1260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.001>
- Ricciardi A, Parente E, Guidone A, Ianniello RG, Zotta T, Abu Sayem SM, Varcamonti M (2012) Genotypic diversity of stress response in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus*. *Int J Food Microbiol* **157**: 278–289. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.018
- Russo P, Mohedano ML, Capozzi V, Fernández de Palencia P, López P, Spano G (2012) Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and Δ ctsR mutant strains under physiological and heat stress conditions. *Int J Mol Sci* **13**: 10680–10696
- Salminen S, von Wright A (2004) *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*. pp 633. Marcel Dekker, New York, USA
- Sato T, Kato C, Horikoshi K (1995) The effect of high pressure on gene expression by the lac and tac promoters in *Escherichia coli*. *J Marine Biotechnol* **3**: 89–92
- Sauvageot N, Gouffi K, Laplace J, Auffray Y (2000) Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoideus*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *Int J Food Microbiol* **55**: 167–170. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00191-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00191-4)
- Scheyhing CH, Hörmann S, Ehrmann MA, Vogel RF (2004) Barotolerance is inducible by preincubation under hydrostatic pressure, cold-, osmotic-, and acid-stress conditions in *Lactobacillus sanfranciscensis*. DSM 20451T. *Lett Appl Microbiol* **39**: 284–289. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01578.x
- Schumann W (2003) The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress Chaperones* **8**: 207–217
- Serrano LM, Molenaar D, Wels M, Teusink B, Bron PA, de Vos WM, Smid EJ (2007) Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial Cell Factories* **6**: 29. doi: 10.1186/1475-2859-6-29
- Serrazanetti DI, Gottardi D, Montanari C, Gianotti A (2013) Dynamic stresses of lactic acid bacteria associated to fermentation processes. *Lactic Acid Bacteria – R&D for Food, Health and Livestock Purposes* **23**: 539–570. <http://dx.doi.org/10.5772/51049>
- Serrazanetti DI, Guerzoni ME, Corsetti A, Vogel RF (2009) Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol* **26**: 700–711. doi: 10.1016/j.fm.2009.07.007
- Shah NP (2007) Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J* **17**: 1262–1271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.014>
- Siezen RJ, Tzeneva VA, Castioni A, Wels M, Phan HTK, Rademaker JLW, Starrenburg MJC, Kleerebezem M, Molenaar D, van Hylckama Vlieg JET (2010) Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environ Microbiol* **12**: 758–773. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02119.x
- Siragusa S, De Angelis M, Di Cagno R, Rizzello CG, Coda R, Gobetti M (2007) Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7283–7290. doi: 10.1128/AEM.01064-07
- Smeds A, Varmanen P, Palva A (1998) Molecular characterization of a stress-inducible gene from *Lactobacillus helveticus*. *J Bacteriol* **180**: 6148–6153
- Smits GJ, Brul S (2005) Stress tolerance in fungi – to kill a spoilage yeast. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 225–230. doi: 10.1016/j.copbio.2005.02.005
- Sokolowska B, Skapska S, Fonberg-Broczek M, Niezgodza J, Rutkowska M, Chotkiewicz M, Dekowska A, Dobros N, Rzoska SJ (2012) Impact of high hydrostatic pressure on native microflora and colour of root vegetable juices. *Post Nauki Technol Przem Rol-Spoz* **67**: 5–15 (in Polish)
- Sokolowska B, Skapska S, Fonberg-Broczek M, Niezgodza J, Rutkowska M, Dobros N, Rzoska JS. (2014) The impact of high hydrostatic pressure (HHP) on native microflora and the colour of beetroot juice – a preliminary shelf-life study. In *Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends*, Mendez-Vilas A, pp 380–384. Wageningen Academic Publisher. doi:10.3920/978-90-8686-795-2
- Storz G, Hengge-Aronis R eds (2000) *Bacterial Stress Responses*. pp 485. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555816841
- Ulmer HM, Herberhold H, Fahsel S. (2002) Effects of pressure induced membrane phase transition on HorA inactivation in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1088–1095. doi: 10.1128/AEM.68.3.1088-1095.2002
- Van de Guchte M, Serron P, Chervaux Ch, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**: 187–216. doi: 10.1023/A:1020631532202
- Varmanen P, Ingmer H, Vogensen FK (2000) ctsR of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of clp gene expression. *Microbiology* **146**: 1447–1455. doi: 10.1099/00221287-146-6-1447
- Vogel RF, Pavlovic M, Hörmann S, Ehrmann MA (2005) High pressure-sensitive expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Brazilian J Med Biol Res* **38**: 1247–1252. doi: /S0100-879X2005000800013
- Welch TJ, Farewell A, Neidhardt FC, Bartlett DH (1993) Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J Bacteriol* **175**: 7170–7177
- Wemekamp-Kamphuis HH, Karatzas AK, Wouters JA (2002) Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* **68**: 456–463. doi: 10.1128/AEM.68.2.456-463.2002
- Wouters PC, Glaesker E, Smelt JPPM (1998) Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 509–514
- Zuber U, Schumann W (1994) CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon dnaK of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 1359–1363. doi: 10.1128/jb.176.5.1359-1363.1994.

PUBLIKACJA 2

Bucka-Kolendo Joanna, Sokołowska Barbara, Winiarczyk Stanisław

(2020)

Influence of High Hydrostatic Pressure on the Identification of
Lactobacillus by MALDI-TOF MS Preliminary Study.

Microorganisms, 8(6), 813.

DOI: 10.3390/microorganisms8060813.



Article

Influence of High Hydrostatic Pressure on the Identification of *Lactobacillus* by MALDI-TOF MS—Preliminary Study

Joanna Bucka-Kolendo ^{1,*} , Barbara Sokołowska ^{1,2} and Stanisław Winiarczyk ³

¹ Department of Microbiology, Institute of Agriculture and Food Biotechnology, 02-532 Warsaw, Poland; barbara.sokolowska@ibprs.pl

² Institute of High Pressure Physics, Polish Academy of Sciences, 01-142 Warsaw, Poland

³ Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, 20-612 Lublin, Poland; genp53@interia.pl

* Correspondence: joanna.bucka@ibprs.pl

Received: 8 May 2020; Accepted: 26 May 2020; Published: 28 May 2020



Abstract: In the present study, we assessed the ability of MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) to identify microbial strains subjected to high hydrostatic pressure (HHP) as a stress factor. Protein changes induced by HHP can affect the identification of microorganisms when the identification technique is based on the protein profile. We evaluated two methods, namely MALDI-TOF MS and 16S rDNA sequencing, as a valuable tool to identify *Lactobacillus* species isolated from spoiled food, juices and beers. The data obtained from the protein mass fingerprint analysis of some of the lactobacilli strains showed differences in unpressured and pressured mass spectrum profiles (MSPs), which influenced the results of the identification. Four out of 13 strains (30%) showed different MSP results for unpressured and pressured samples and these results did not overlap with the 16S rDNA identification results. The 16S rDNA sequencing method revealed that five unpressured strains (38%) and four pressured strains (40%) were identified correctly by MALDI-TOF MS. Both methods showed compatible results in 38% of unpressured strains and in 30% of pressured strains. Stress factors, cultivation methods or the natural environment from which the bacteria were derived can affect their protein profile and thus change the mass spectrum. It is necessary to expand the database with a wide range of mass spectra dedicated to a high-throughput study of the microorganisms derived from different environments.

Keywords: *Lactobacillus*; lactic acid bacteria; high hydrostatic pressure; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

1. Introduction

High hydrostatic pressure (HHP) treatment is considered as a promising nonthermal pasteurization method that inactivates foodborne pathogens and spoilage microorganisms [1]. HHP enables to reduce the count of spoilage-causing microflora while keeping the sensory and nutritional quality of the treated product virtually intact. Current studies on the response of lactic acid bacteria (LAB) to stress caused by HHP are focused on the changes in the structure, metabolism, growth and viability of the cells [2–5]. As reported previously [6], HHP can influence bacterial proteome and induce protein conformational changes. The increase in the pressure can lead to the reduction in the permeability of the cell membrane and change in the conformation of proteins. This might affect their properties and functions or might denature them completely [7,8]. Cell inactivation by HHP is mainly related to protein denaturation, which can cause enzyme inactivation and cell protein agglomeration [2]. LAB under stress conditions can activate their defense mechanisms, manifesting in stress-related

protein secretion. For a better understanding of the relationship between the molecular basis of the spoiling abilities of *Lactobacillus* and the microorganisms itself, it is crucial to link the function of the proteins with the molecular mechanisms of the cellular stress reaction. The strains collected from environmental samples have to be identified in a quick and reliable manner, as it is important for the manufacturers to respond rapidly and prevent further product deterioration. Higher taxonomic resolution and identification of bacteria below the species level, i.e., bacterial subtyping, are needed to ensure food safety and meet the increasing requirements of the food industry [9]. Such methods allow to track specific foodborne pathogens through the entire production process and to identify critical points where contamination/unwanted growth occurs.

The most popular genotyping methods used to identify bacteria are those based on polymerase chain reaction (PCR), especially those involving the sequencing of the 16S rDNA region. This area is a component of the 30S small subunit of prokaryotic ribosomes and is characterized by a slow rate of evolution; it encodes the 16S rRNA gene that can provide species-specific signature sequences useful in the identification of bacteria and the determination of their phylogenetic position [10]. The 16S rDNA sequencing method is relatively expensive, time- and labor-consuming, and not suitable for routine identification [11]; however, it is considered to be a decisive classification technique. The combination of molecular and spectrometric methods can have a large potential in complex taxonomic studies of bacteria [12]. Especially in the case of closely related taxa, like *Lactobacillus*, the identification at a subspecies level should be assessed by the sequencing of protein-coding genes, like *pheS*, which have a higher discriminating power than the 16S rRNA [13].

In recent years, the MALDI-TOF MS technique (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) has become a promising and reliable tool for bacterial identification [9,10,14,15]. It is a rapid, simple and cost-effective method. In the food production sector, pharmaceutical sector and hospitals, where ensuring product safety is crucial due to consumer health concerns, there is a need to develop/adopt rapid and reliable methods of product control with regard to biological hazard. However, the applicability of the MALDI-TOF MS method to identify LAB species originating from food and beverages is still limited. Because of the large and still growing number of known species belonging to this genus and because of their biochemical and genetic diversity [10,14], the taxonomic classification of lactobacilli is not an easy task. The MALDI-TOF MS technique has several limitations in differentiating bacterial species. Other studies have shown that the different experimental approaches, media, times of cultivation and the sample preparation methods or the matrices used affect the obtained mass spectra and some of the differences in closely related species and strains can be very subtle [16,17]. The MALDI-TOF MS method is based on the comparison of the peptide spectroscopic fingerprints of the analyzed materials with the available data in the database. For new strains/isolates that have not been previously fingerprinted, identification is not possible or is unreliable. Raw cultures or cell extracts are commonly used for MALDI-TOF MS microbial analysis. The chemicals present in samples are ionized to produce charged molecules, whose mass-to-charge ratio could be measured. The mass spectra generated by ribosomal proteins is assumed to be a characteristic of each bacterial species. Nevertheless, the well created and updated database is the key.

Because the cellular perception and impact of HHP on cells is largely related to effects induced on proteins [1], this pressure treatment might cause significant changes in bacterial proteome. The present study aimed to evaluate the possible effect of HHP treatment on protein-based identification by MALDI-TOF MS. The study framework also includes the assessment of complementarity of the results produced by MALDI-TOF MS with those obtained by other molecular identification methods, namely the 16S rDNA sequencing.

2. Materials and Methods

2.1. Bacteria and Growth Conditions

Thirteen strains of LAB were used in this study, of which nine strains were isolated from spoiled food (juices and beers) samples commercially obtained from clients, to determine the source of the microbial contamination of the products. Two strains were isolated from bread and diet supplements. Isolation was performed according to the ISO 15214:2000 method using MRS agar (*Lactobacillus* Agar according to DeMan, Rogosa and Sharpe, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and incubation at 30 °C for 72 h. Additionally, one reference strain isolated from spoiled beer and collected from Leibniz Institute -DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures ((Braunschweig, Germany) was used.

The strains were cultured in MRS broth medium at 30 °C for 48–72 h under anaerobic conditions. The growth kinetics of the strains were assessed in the early stationary phase by optical density measurements OD₆₀₀ (Densitometer DEN-1B, BioSan, Riga, Latvia).

2.2. Isolation of Bacterial DNA

DNA from an overnight bacterial culture (1.5 mL) was isolated using the ExtractMe DNA Bacteria Kit (Blirt SA–DNA Gdansk, Poland) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the centrifuged bacterial pellets were suspended in 300 µL of BacL Buffer and supplied with 4 µL of RNase A, mixed, and incubated at 37 °C for 10 min. Then, 10 µL of Proteinase K was added to each sample and vortexed (Multi-Vortex V-32, BioSan, Riga, Latvia), and the mixture was incubated for 10 min at 55 °C. Subsequently, the samples were incubated for 5 min at 55 °C with BacB Buffer. After incubation, the samples were vortexed for 15 s and centrifuged for 2 min at 12,000 rpm (MiniSpin plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The supernatants were transferred into purification minicolumns in collection tubes and centrifuged once again for 1 min at 12,000 rpm. The purification minicolumns were then washed twice with BacW Buffer (600 µL and 400 µL, respectively). The samples were then centrifuged to remove the buffer residues. Subsequently, the samples were added to new sterile Eppendorf tubes, and the elution was performed with the Elution Buffer pre-heated to 70 °C; the eluted samples were centrifuged for 1 min at 12,000 rpm. The purity and concentration of the nucleic acids were confirmed by gel electrophoresis and UV spectrophotometry. The isolated DNA was stored at –20 °C.

2.3. Genotypic Identification

The species affiliation of the LAB was defined on the basis of the 16S rDNA sequence analysis. The 16S rDNA gene from the *Lactobacillus* species was amplified using the specific primers designed to amplify almost the entire gene sequence (around 1500 bp). The PCR mixture and the cycle parameters were as follows: the total PCR mixture volume was 60 µL, which contained 30 µL of the Dream Taq PCR Master Mix (Thermo Scientific), 1 µL of each primer (16SF: 5'-AGACTTTGATCCTGGCTCAG-3' and 16SR: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') in the final concentration of 0.4 µM, and 10–20 ng of DNA. The amplification was run in pEqSTAR 2X thermocycler (VWR, Peqlab), and the conditions were as follows: initial denaturation for 2 min at 94 °C, followed by 40 cycles of denaturation for 30 s at 94 °C, annealing for 35 s at 51 °C and elongation for 100 s at 72 °C, with a final elongation for 2 min at 72 °C. The size of the amplified PCR products was analyzed by agarose gel electrophoresis in 1.5% (*w/v*) gel. Electrophoresis was performed at 120 V for 45 min in a 1× TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA buffer). The gel was stained with 6 µL SimplySafe (EURx, Gdansk, Poland) to visualize the amplified fragments under a UV source. Gel documentation was performed with a BioImaging Systems 06-2d.1-G: BOX (Syngene, UK). The obtained products of amplification were sequenced using a 96-capillary 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems-Life Technologies). The nucleotide sequences were analyzed and compared to the RefSeq database of the NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program.

2.4. Application of HHP

The influence of HHP on the ability to identify LAB by MALDI-TOF was assessed. Cultures from the stationary growth phase were exposed to high pressure treatment using U 4000/65 apparatus (Unipress, Warsaw, Poland). The volume of the treatment chamber was 0.95 L with the maximum working pressure of 600 MPa. A mixture of distilled water and polypropylene glycol (1:1, *v/v*) was used as the pressure-transmitting fluid. The working temperature of the apparatus was in the range between $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pressure up to 300 MPa was generated in 70–80 s, and the release time was 2–4 s. Four milliliters of each culture was subjected to HHP at 300 MPa at an ambient temperature ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) and held for approximately 5 min. The pressurization times reported did not include the come-up and come-down times. For each tested strain, the assays were performed by two independent processes. After the treatment, the samples were stored at room temperature (RT) for further analysis. Unpressurized samples were used as a control.

2.5. Species Identification by MALDI-TOF MS

The obtained isolates were analyzed with the MALDI-TOF MS technique (Bruker Daltonik, Germany). The protein extract prepared with ethanol and formic acid was used for analysis. Briefly, a loop of bacteria culture from the MRS plate was diluted in 150 μL MQ water, and 450 μL of 99.8% ethanol (POCH, Poland) was then added and the sample was carefully vortexed in RT. Then, the sample was centrifuged for 5.5 min at 13,000 rpm in RT. The supernatant was removed, and the residue was mixed with 40 μL of 70% formic acid and 40 μL of acetonitrile (Fluka, analytical grade) and vortexed in RT. After the centrifugation (13,000 rpm for 2.5 min, in RT) of the sample, 1 μL of supernatant was placed on a steel plate (Ground Steel) and allowed to air-dry in RT. Then, 1 μL of matrix solution containing 10 mg/mL of HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) was added to the plate and allowed to dry in RT.

Mass spectra were analyzed using the MALDI-Biotyper 3.0 software package (Bruker Daltonik, Germany) containing 5291 reference spectra. The results were shown as the top 10 identification matches along with confidence score (ranging from 0.00 to 3.00). On the basis of the criteria proposed by the manufacturer, a score below 1.70 does not allow for reliable identification; a score between 1.70 and 1.99 allows identification up to the genus level; a score between 2.00 and 2.29 reflects probable identification at the species level; and a score higher than 2.30 (2.30–3.00) indicates the highly probable identification at the species level. Both the untreated and HHP-treated strains were tested; the strains were analyzed in two independent experiments and each sample was run three times.

The effect of the stress factor HHP was evaluated by the dendrogram of the identified unpressured and pressured strains by using BioNumerics 7.6.3. (Applied Maths). The preprocessed mass spectra were preprocessed by smoothing and normalizing signal intensities. The triplicates of mass spectra of all strains were combined in 26 mass spectrum profiles (MSPs) and used for cluster analysis. The alignment and clustering were performed with 300 ppm linear tolerance and 0.5 constant tolerance. Cluster analysis was performed with the UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) method to visualize the dynamics of stress response and especially to determine the grouping of the *Lactobacillus* strains based either on their species affiliation or on the HHP impact.

The two-dimensional hierarchical clustering analysis (HCA) of the bacterial isolates versus their *m/z* values was performed. The cluster and heatmap were created on the basis of the similarity in their MS spectral pattern among all the unpressured and pressured strains. The heatmap was created by generating a tree for both the strains and peak classes using the UPGMA algorithm based on Spearman rank correlations. In the 2D cluster, the strains were displayed as column entries and peak classes were represented as row entries. Two dendrograms were shown: one above the bacteria entries and the other one next to the *m/z* values. In the matrix panel, the intensity of the peaks was represented by colors. Green implied low intensities and red implied high intensities.

3. Results

3.1. Identification of *Lactobacillus* Strains by 16S rDNA

All the isolates identified through the 16S rDNA sequencing revealed 99–100% homology to the sequences of the reference *Lactobacillus* strains deposited in GenBank. The 13 tested *Lactobacillus* strains obtained from the spoiled food and beverages were identified as the *Lactobacillus brevis* strains (5) (including one from the DSMZ collection), *Lactobacillus plantarum* (2), *Lactobacillus rhamnosus* (2), *Lactobacillus backii* (2), *Lactobacillus curvatus* (1), and *Lactobacillus rossiae* (1) (Table 1). According to the latest nomenclature [18], the strains will be named accordingly: *Lactobacillus brevis*—*Levitlactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*—*Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*—*Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus backii*—*Loigolactobacillus backii*, *Lactobacillus rossiae*—*Furfurilactobacillus rossiae* and *Lactobacillus curvatus*—*Latilactobacillus curvatus*. On the basis of the 16S rDNA sequencing results, the phylogenetic tree (Figure 1) was created using the neighbor-joining method with distances computed with the maximum composite likelihood method using MEGA7 [19]. As expected, strains belonging to the same *Lactobacillus* species clustered together, where the groups could be identified: the first one included all *L. brevis* (except one, 557), the second one grouped two *L. plantarum* strains, and the third group included two *L. rhamnosus* strains. Among the other strains, one *L. curvatus* strain and one *L. backii* strain showed high similarities to the two *L. rhamnosus* strains; the 738-*L. rossiae* strain was excluded from the main cluster and the 103-*L. backii* and 557-*L. brevis* strains formed another small cluster.

Table 1. Comparison of the results obtained for the unpressured and pressured samples by using the 16S rDNA sequencing and MALDI-TOF MS.

No.	Strain Number	Source	16S rDNA Sequencing Unpressured Strains	MALDI-TOF MS Unpressured Strains	Score Value	MALDI-TOF MS Pressured 300 MPa/5' Strains	Score Value
1.	1178	Bread	<i>L. plantarum</i> (99%)	<i>L. plantarum</i>	2.04	<i>L. plantarum</i>	2.10
2.	975	Tomato juice	<i>L. rhamnosus</i> (99%)	<i>L. brevis</i>	2.36	<i>L. brevis</i>	2.28
3.	863	Tomato juice	<i>L. plantarum</i> (100%)	<i>L. brevis</i>	2.35	<i>L. brevis</i>	2.35
4.	738	Beer	<i>L. rossiae</i> (99%)	<i>L. rhamnosus</i>	2.05	<i>L. brevis</i>	2.33
5.	557	Beer	<i>L. brevis</i> (100%)	<i>L. curvatus</i>	2.00	<i>L. curvatus</i>	2.02
6.	489	Beer	<i>L. brevis</i> (99%)	<i>L. brevis</i>	2.25	<i>L. brevis</i>	2.34
7.	432	Sauerkraft juice	<i>L. curvatus</i> (99%)	<i>L. rhamnosus</i>	1.95	<i>L. brevis</i>	2.23
8.	133	Probiotic	<i>L. rhamnosus</i> (99%)	<i>L. plantarum</i>	2.15	<i>L. brevis</i>	2.33
9.	DSM 6235 (115)	Beer	<i>L. brevis</i> (99%)	<i>L. brevis</i>	2.34	<i>L. brevis</i>	2.38
10.	102	Beer	<i>L. backii</i> (99%)	<i>L. brevis</i>	2.33	<i>L. brevis</i>	2.65
11.	103	Beer	<i>L. backii</i> (99%)	<i>L. brevis</i>	2.32	<i>L. brevis</i>	2.32
12.	3/16/1	Beer	<i>L. brevis</i> (99%)	<i>L. brevis</i>	2.33	<i>L. plantarum</i>	2.21
13.	3/16/2	Beer	<i>L. brevis</i> (99%)	<i>L. brevis</i>	2.27	<i>L. brevis</i>	2.35

To compare the identification level made by MALDI-TOF MS to that achieved by the 16S rDNA sequencing, a dendrogram was created using the MSPs of all the unpressured strains (Figure 2). The dendrogram showed the relationships of similarity among the strains and clustered them in one main group that comprised almost all the strains, except four strains identified by the MALDI-TOF MS as: 738-*L. rhamnosus*, DSM 6235 (115)-*L. brevis*, 103-*L. brevis*, and 557-*L. curvatus*. At a distance level of 60, all the strains were separated into a single *Lactobacillus* strain; however, the clustering showed no similarity to the 16S rDNA phylogenetic tree.

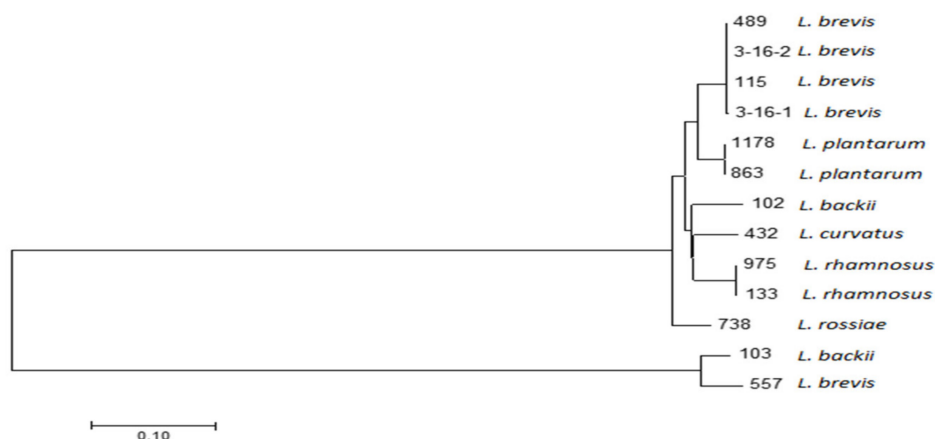


Figure 1. Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of the studied *Lactobacillus* strains. The neighbor-joining method was used to compute the evolutionary distances. The tree is drawn to scale, with the branch lengths measured in the number of substitutions per site. The tree was obtained using the MEGA7 software.

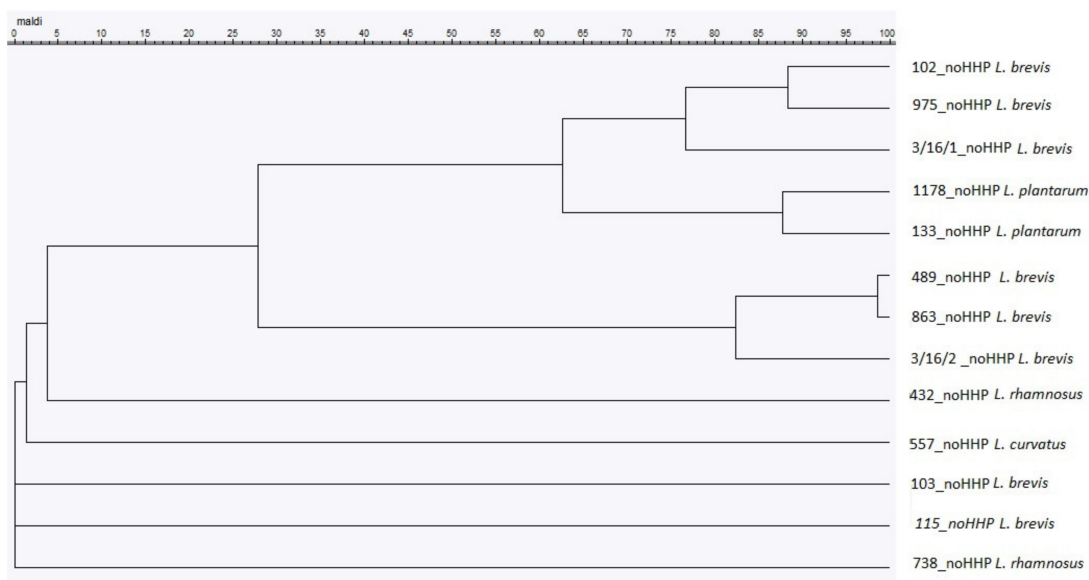


Figure 2. Cluster analysis of the MALDI-TOF MS spectra obtained from the *Lactobacillus* strains included in this study. In the MSP dendrogram, the relative distance between the strains is displayed as arbitrary units, where 100 indicates complete similarity and 0 indicates maximum dissimilarity.

3.2. Identification of *Lactobacillus* Strains with the MALDI-TOF MS Method and the Influence of HHP

Thirteen isolates were classified as bacteria of the genus *Lactobacillus* before and after pressurization. Probability scores varied for the tested samples: results in the range of 2.30–3.00 were obtained for 6 out of 13 (46%) unpressured strains (978, 863, DSM 6235 (115), 102, 103, 3/16/1) and 8 out of 13 (61.5%) pressured strains (863, 738, 489, 133, DSM, 102, 103, 3/16/2). The other strains (except for the one unpressured strain with the score value of <2.00 (432)) scored at the 2.00–2.29 level; this allowed us to classify them as highly probable identified at the genus level and probable identified at the species level (Table 1), which yielded 46% (6/13) unpressured and 38% (5/13) pressured strains, respectively.

To visualize the relationship between all unpressured and pressured strains, the hierarchical cluster analysis was performed on the basis of a similarity matrix calculated using the curve-based Pearson correlation coefficient (Figure 3). MSPs were created in relation to their mass signals and peak intensities. On the basis of the maximum dissimilarities level, the dendrogram clustered the strains into one main group, except five strains including one pressured 557 strain and four unpressured

ones: 863, 738, DSM (115), and 103. The strain 432 was clustered into one group at the distance level of 60, regardless of the difference in species identification: the unpressured one was *L. brevis* and the pressured one was *L. rhamnosus*. The strain 489 together with the unpressured strain 863 was clustered at the distance level of 96, and the strain 1178 was grouped in one cluster at the distance level of 90.

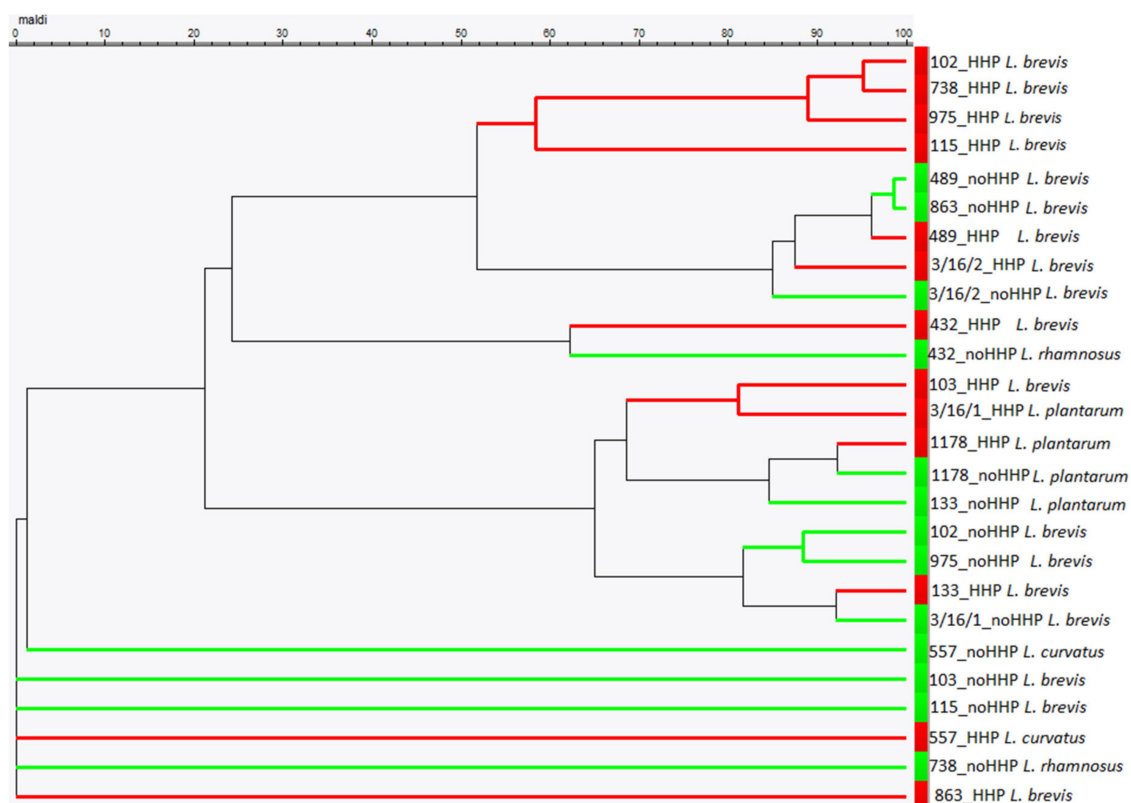


Figure 3. Dendrogram of the composite mass spectra illustrating the hierarchical clustering of the 13 unpressured (green-noHHP) and 13 pressured (red-HHP) strains identified by MALDI-TOF MS (names of strains according to MALDI-TOF MS identification). In the mass spectrum profile (MSP) dendrogram, the relative distance between the strains is displayed as arbitrary units, where 100 indicates complete similarity and 0 indicates maximum dissimilarity.

3.3. Comparison of Genotypic and MALDI-TOF MS Identification of Lactobacilli

The comparison of the results of the genomic analysis and MALDI-TOF MS allowed us to correctly identify 38% of the unpressured strains (5/13) and 31% of the pressured strains (4/13). Among the five correctly identified unpressured strains, three had the score value in the 2.00–2.29 range and the remaining two in the 2.30–3.00 range; among the four correctly identified pressured strains, one strain showed a score value in the 2.00–2.29 range and the remaining three strains in the 2.30–3.00 range. The cluster analysis based on the protein profile did not group the strains corresponding to the identification based on the 16S rDNA phylogenetic tree (Figure 1) and did not allow us to group the strains based on the influence of the stress factor (untreated or treated with HHP) (Figure 3). The dendrogram based on the mass spectra of the samples clustered the strains into two main groups: one contained different strains identified by MALDI-TOF MS as *L. brevis* and the other with few *L. brevis* and *L. plantarum* strains. Few of the analyzed strains were excluded from the cluster: 863HHP-*L. brevis*, 738noHHP-*L. brevis*, DSM 6235 (115) noHHP-*L. brevis*, 103noHHP-*L. brevis*, and 557HHP and noHHP-*L. curvatus*).

To assess the similarities and dissimilarities in the data, multidimension scaling (MDS) was used and the resulting data positions are displayed by 3D visualization (Figure 4). However, the MDS did

not show the grouping of the strains based on their affiliation or whether they were treated or not treated with HHP.

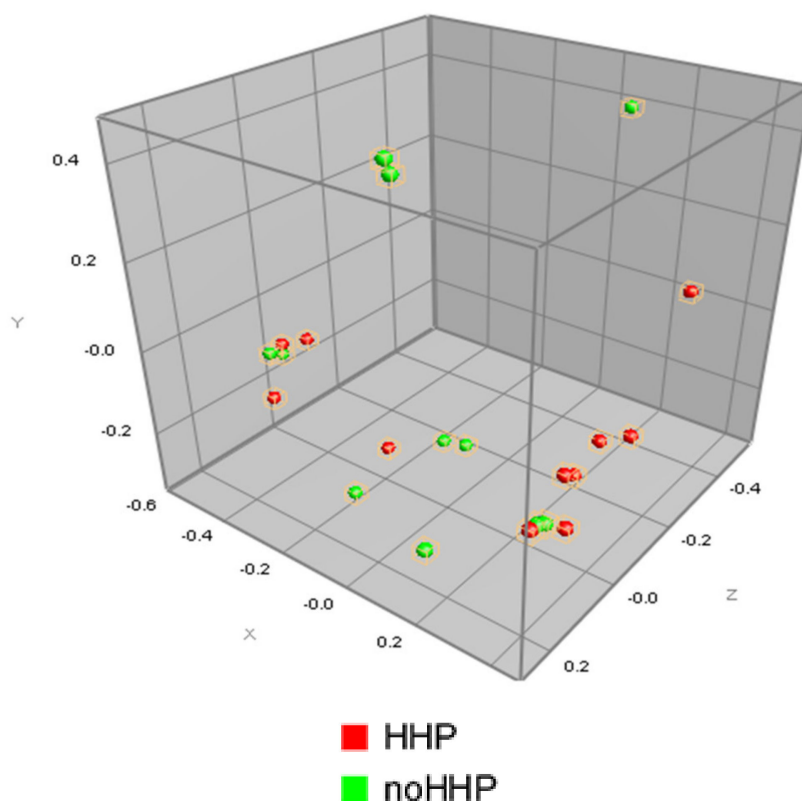


Figure 4. Multidimensional scaling representation of the mass spectra of the 13 strains of *Lactobacillus* obtained from the unpressured (noHHP -green) and pressured (HHP -red) strains.

The influence of the stress factor HHP on the protein profiles can be seen especially in MSPs of 133 and 432 strains. The data obtained with the mMass software [20] from their protein mass fingerprinting analysis (Figure 5) showed differences in the unpressured and pressured MSPs. The different protein profiles correlated with different identifications for those strains. The strains identified as *L. rhamnosus* in 16S rDNA (133), *L. curvatus* (432) and *L. rossiae* in MALDI-TOF MS identification were respectively *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *L. rhamnosus* for the unpressured and *L. brevis* for all three pressured strains.

The 2D clustering analysis was performed (Figure 6), and the heatmap was generated for all the studied strains of *Lactobacillus* versus their m/z values. The heatmap represents the differences among the unpressured and pressured strains according to the similarity in their spectral patterns. The figure shows that no bias in the distribution of the spectra can be directly correlated with the impact of HHP, which suggests that the MALDI-TOF MS data were not preferentially clustered according to the stress conditions.

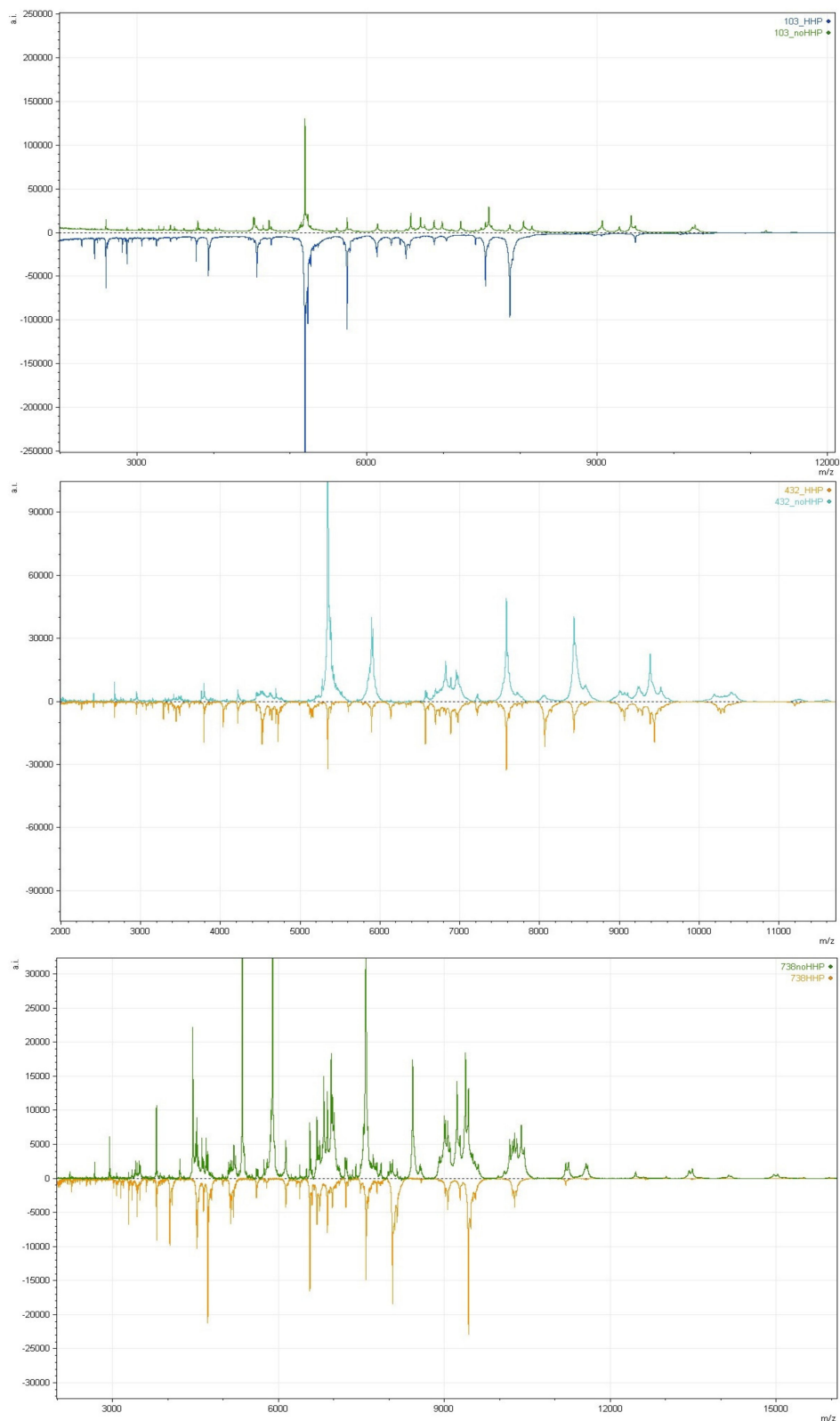


Figure 5. MALDI-TOF MS mass spectra obtained from the *Lactobacillus* strains (133, 432 and 738) that yielded different MPS identification results for the unpressured (noHHP) and pressured with 300 MPa/5' (HHP) strains.

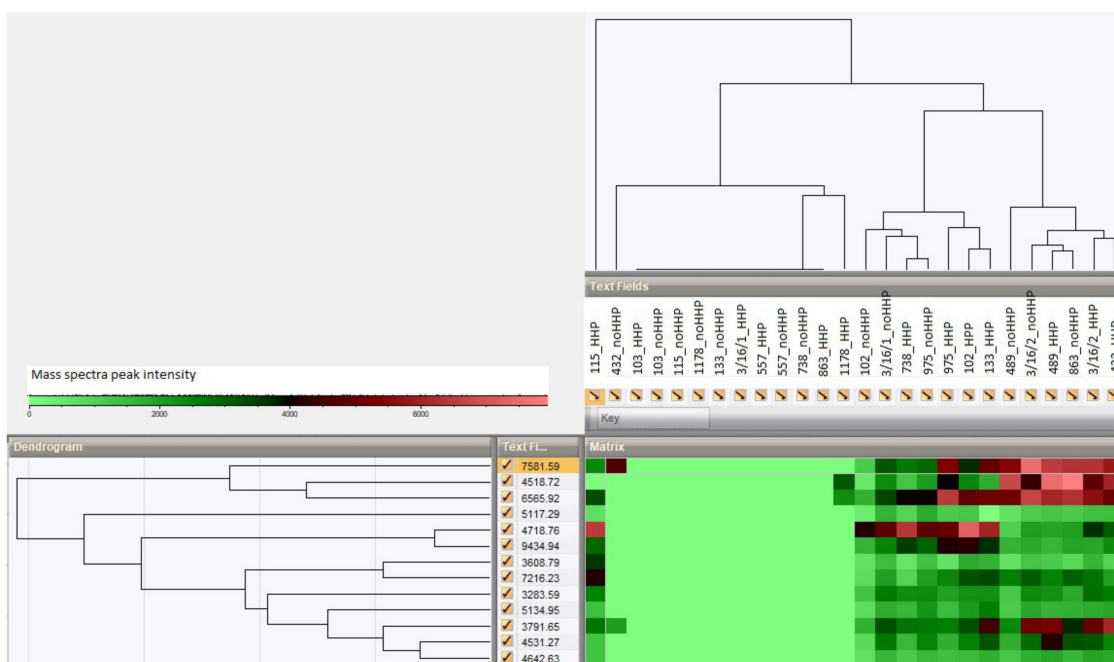


Figure 6. Two-dimensional hierarchical clustering analysis of the unpressured and pressured lactobacilli strains and the m/z values of the peak-matching mass spectra. The green indicates low peak intensity and the red indicates high peak intensity.

4. Discussion

In recent years, MALDI-TOF MS has become a promising and reliable tool for the identification of bacteria isolated from different food sources. As a rapid and low-cost technique, it allows to analyze multiple samples in a short period of time and is expected to yield high score value identification results. Rapid microbial identification is becoming extremely important in the food industry. However, the applicability of this method is limited, and the limitation emerges from the reference database that needs to be constantly updated and expanded to include new species.

In the present study we evaluated the usability of the MALDI-TOF MS technique as a new, faster and easier approach to identify *Lactobacillus* from spoiled food and beverages. The influence of HHP on the *Lactobacillus* strains allowed us to study how the MALDI-TOF MS identification is processed when it is based on the protein profile that can be affected by the HHP treatment. Considering that only scores > 2.00 for MALDI-TOF MS results are accepted for species-level identification and scores 1.70–2.00 are accepted only for genus level identification, our results are not convincing for all the studied strains; moreover, they do not concur with the results of the genomic analysis. The two methods showed divergence in the identification of some of the *Lactobacillus* strains (two strains of *L. brevis* and *L. backii*, and one strain each of *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. rossiae*, and *L. curvatus*). Difficulty in identification by MALDI-TOF MS was observed when the strains were treated with HHP, leading to significant differences in the results.

Different stress factors such as the HHP treatment, which is used in the food industry, are likely to play an important role in the identification of LAB by MALDI-TOF MS. It can be presumed that the changes that occur at the proteomic level during the HHP process can impact the identification results obtained by MALDI-TOF MS. The biggest challenge in the differentiation and identification of closely related species is the inadequate and limited size of the database and the lack of efficient software. It is necessary to expand the database with a wide range of mass spectra dedicated to the high-throughput study of microorganisms derived from different environments.

The discriminatory inability of MALDI-TOF MS to identify some of the *Lactobacillus* species, which were identified by 16S rDNA sequencing (such as *L. backii*), suggests that the validation of the

MALDI-TOF MS output by using well known molecular techniques is still required. Further studies with a higher number of strains, different pressure levels and proteomic effects, as well as extending the database, are needed to better assess the protein-based characterization techniques with the ability to identify species within the *Lactobacillus* genus.

In conclusion, our studies did not reveal the high congruence of LAB species identification by MALDI-TOF MS and 16S rDNA sequencing analysis. We provided important information on *Lactobacillus* isolated from spoiled food and beverages. Our findings indicate that the HHP treatment can affect the results obtained by MALDI-TOF MS. It is important to consider that the stress factors, cultivation methods and the natural environment from which bacteria are derived can affect their protein profile and thus change the mass spectrum, leading to differences in identification outcome.

The MALDI-TOF MS identification method needs additional use of genotyping; however, the choice of a suitable method to identify LAB strains should consider not only the discriminatory power of the techniques but also its cost-and time-efficiency.

Author Contributions: Conceptualization, J.B.-K. and B.S.; methodology, J.B.-K.; software, J.B.-K.; formal analysis, S.W.; writing—original draft preparation, J.B.-K.; writing—review and editing, J.B.-K. and B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gayan, E.; Govers, S.K.; Aertsen, A. Impact of high hydrostatic pressure on bacterial proteostasis. *Biophys. Chem.* **2017**, *231*, 3–9. [[CrossRef](#)]
2. Romanek, J.; Opiela, J. Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym oraz medycynie. *Wiadomości Zootech.* **2015**, *4*, 34–40.
3. Asano, S.; Suzuki, K.; Iijima, K.; Motoyama, H.; Kuriyama, H.; Kitagawa, Y. Effect of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *J. Biosci. Bioeng.* **2007**, *104*, 334–338.
4. Parente, E.; Ciocia, F.; Ricciardi, A.; Zotta, T.; Felis, G.E.; Torriani, S. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *144*, 270–279.
5. Van de Guchte, M.; Serron, P.; Chervaux, C.; Smokvina, T.; Ehrlich, S.D.; Maguin, E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **2002**, *82*, 187–216.
6. Bucka-Kolendo, J.; Sokołowska, B. Genetic diversity of lactic acid bacteria, as an effect of stress factors that can occur in the preservation processes of beverages and juices. *Acta Biochim. Pol.* **2017**, *64*, 459–464. [[CrossRef](#)]
7. Balny, C.; Masson, P.; Heremans, K. High pressure effects on biological macromolecules: From structural changes to alteration of cellular processes. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 3–10.
8. Northrop, D.B. Effects of high pressure on enzymatic activity. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 71–79.
9. Kern, C.C.; Vogel, R.F.; Behr, J. Differentiation of *Lactobacillus brevis* strains using Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry with respect to their beer spoilage potential. *Food Microbiol.* **2014**, *40*, 18–24. [[CrossRef](#)]
10. Dec, M.; Puchalski, A.; Urban-Chmiel, R.; Wernicki, A. 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 105.
11. Foschi, C.; Laghi, L.; Parolin, C.; Giordani, B.; Compri, M.; Cevenini, R.; Marangoni, A.; Vitali, B. Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of lactobacilli: Integration of 16S rDNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and H-NMR. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172483. [[CrossRef](#)]
12. Duskova, M.; Sedo, O.; Ksicova, K.; Zdahal, Z.; Karpiskova, R. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *159*, 107–114. [[CrossRef](#)]
13. Sanches-Juanes, F.; Teixeira-Martin, V.; Gonzalez-Buitrago, J.M.; Velazquez, E.; Flores-Felix, J.D. Identification of Species and Subspecies of Lactic Acid Bacteria Present in Spanish Cheeses Type “Torta” by MALDI-TOF MS and *pheS* gene Analyses. *Microorganisms* **2020**, *8*, 301. [[CrossRef](#)]

14. Kosikowska, U.; Stępień-Pyśniak, D.; Pietras-Ożga, D.; Andrzejczuk, S.; Juda, M.; Malm, A. Zastosowanie spektrometrii masowej MALDI-TOF MS w identyfikacji bakterii izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi i zwierząt. *J. Lab. Diagn.* **2015**, *51*, 23–30.
15. Schott, A.-S.; Behr, J.; Quinn, J.; Vogel, R.F. MALDI-TOF Mass Spectrometry Enables a Comprehensive and Fast Analysis of Dynamics and Qualities of Stress Responses of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165504. [[CrossRef](#)]
16. Zhang, L.; Vranckx, K.; Janssens, K.; Sandrin, T.R. Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry and a Custom Database to Characterize Bacteria Indigenous to a Unique Cave Environment (Kartchner Caverns, AZ, USA). *J. Vis. Exp.* **2015**, *95*, e52064. [[CrossRef](#)]
17. Schurr, B.; Behr, J.; Vogel, R.F. Detection of acid and hop shock induced responses in beer spoiling *Lactobacillus brevis* by MALDI-TOF MS. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 501–506. [[CrossRef](#)]
18. Zheng, Z.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C.M.A.P.; Harris, H.M.B.; Mattarelli, P.; O’Toole, P.W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; et al. 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 2782–2858. [[CrossRef](#)]
19. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. [[CrossRef](#)]
20. Strohm, M.; Kavan, D.; Novak, P.; Volny, M.; Havlicek, V. mMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4648–4651. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

PUBLIKACJA 3

Bucka-Kolendo Joanna, Sokołowska Barbara (2021)
Porównanie metod identyfikacji bakterii *Lactobacillus*.
Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2 (127), 49-60.
DOI: 10.15193/zntj/2021/127/377.

JOANNA BUCKA-KOLENDO, BARBARA SOKOŁOWSKA

PORÓWNANIE METOD IDENTYFIKACJI BAKTERII *LACTOBACILLUS*

Streszczenie

Szerokie zastosowanie bakterii kwasu mlekowego (LAB) w różnych gałęziach przemysłu spożywczego, w biotechnologii i w medycynie powoduje, że właściwa identyfikacja i ocena ich zróżnicowania wewnątrzgatunkowego jest bardzo istotna. Dobór odpowiednich technik molekularnych analizy powinien uwzględniać dużą dokładność, powtarzalność i typowość metody.

Celem pracy była ocena możliwości różnicowania 12 szczepów *Lactobacillus* przy użyciu metod powszechnie stosowanych w laboratoriach: sekwencjonowania genu *16S* rDNA, genu *pheS* oraz MALDI-TOF MS. Na podstawie otrzymanych wyników analiz stwierdzono, że gen *pheS* w badanych szczepach charakteryzował się wysokim poziomem homologii (98 %) i niską siłą dyskryminacyjną. W dwóch niezależnych analizach MALDI-TOF MS uzyskano taki sam wynik dla 10 szczepów: siedmiu – *L. brevis* (DSM 6235, 102, 103, 489, 863, 975, 3/16/1), dwóch – *L. plantarum* (1178, 133) i jednego – *L. curvatus* 557. Po przeprowadzeniu analizy sekwencjonowania genu *16S* rDNA wyniki potwierdziły się natomiast tylko w odniesieniu do pięciu szczepów (DSM 6235, 3/16/1 i 489) z dwunastu przebadanych. Porównanie wyników było podstawą do wnioskowania, że dla wybranych szczepów LAB największą wartość różnicującą miała analiza bazująca na sekwencjonowaniu genu *16S* rDNA.

Słowa kluczowe: bakterie kwasu mlekowego, LAB, gen 16S rDNA, gen pheS, MALDI-TOF MS

Wprowadzenie

Bakterie kwasu mlekowego są grupą drobnoustrojów o bardzo dużym znaczeniu ekonomicznym z uwagi na ich szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym (kultury starterowe i kultury ochronne) oraz w medycynie i biotechnologii (probiotyki). Zastosowanie odpowiednich technik umożliwiających precyzyjne, szybkie i jednocześnie wydajne ekonomicznie analizy jest bardzo ważne i stanowi często istotę zróżnicowania bakterii i w dużej mierze decyduje o uzyskanym wyniku. Najczęściej stosowanymi metodami identyfikacji gatunków LAB są metody bazujące na genomice (*16S*, *pheS*, RAPD, rep-PCR, MLST, Real Time-PCR, DGGE/TGGE) i proteomice

Mgr inż. J. Bucka-Kolendo, dr hab. inż. Barbara Sokółowska, prof. IBPRS, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa. Kontakt: joanna.bucka@ibprs.pl

(MALDI-TOF MS, 2-DE) [1, 2, 3, 7, 11, 13, 14]. Dokonując wyboru techniki identyfikacji LAB, należy mieć na uwadze trzy kryteria: metoda musi charakteryzować się wystarczająco dużym potencjałem różnicującym, powtarzalnością oraz typowością, czyli możliwością zidentyfikowania na poziomie rodzaju, gatunku, a nawet szczepu. Powinna być również szybka i ekonomicznie opłacalna [14]. Przy wyborze metod związanych z genami konserwatywnymi trzeba uwzględniać takie czynniki, jak długość analizowanego odcinka genu oraz siła dyskryminująca genu, jak również to, że różne geny mogą dostarczać innych wyników filogenetycznych przypisujących szczepy do innego sąsiedztwa. Przez wiele lat analiza sekwencji genu *16S* rDNA była referencyjnym wyznacznikiem w określaniu filogenetycznego pokrewieństwa bakterii LAB. Stwierdzono jednak, że w przypadku blisko spokrewnionych gatunków LAB metoda ta ma zbyt małą rozdzielczość, a gen kodujący podjednostkę *16S* rRNA może wykazywać niewielki stopień polimorfizmu. Ponadto wysoki stopień zróżnicowania fenotypowego i genotypowego oraz zawartość par zasad G+C w zakresie 32 ÷ 54 % może nasręczać problemów w ich identyfikacji [8]. Z tego powodu poszukiwano innych genów konserwatywnych, które mogłyby posłużyć jako wiarygodne narzędzie różnicujące o dużej czułości. Taki gen powinien charakteryzować się powszechnością występowania w genomie bakteryjnym i powinien zawierać w sobie swoisty, zmienny region, który pozwoli na jednoznaczne zróżnicowanie gatunków/podgatunków [12].

Jedną z alternatyw sekwencjonowania genu *16S* jest analiza genu *pheS*, kodującego podjednostkę α -syntazy fenyloalanylo-tRNA (Phe-tRNA). Analiza sekwencji genu *pheS* uznawana jest za wiarygodną metodę dyskryminującą [4, 8, 10] i jest obecnie powszechnie stosowanym narzędziem do identyfikacji bakterii LAB.

Pomimo dużych możliwości analizy genów konserwatywnych taksonomia tego rodzaju nie daje odpowiedzi na pytania dotyczące korelacji filogenetyki z właściwościami fizjologicznymi lub ekotypem [5]. Wprowadzane są dodatkowe techniki chemotaksonomiczne, jak MALDI-TOF MS (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*), analizujące białka rybosomalne. W ostatnich latach nastąpił rozwój identyfikacji mikroorganizmów techniką MALDI-TOF MS, głównie pochodzenia klinicznego, ale również występujących w sektorze spożywczym. Metoda polegająca na analizie „odcisku palca” białek rybosomalnych, charakterystycznych dla danej rodziny, rodzaju, gatunku, a nawet dla poszczególnych szczepów, umożliwia identyfikację profili widm masowych badanych szczepów poprzez porównanie ich z biblioteką zawierającą referencyjne widma odniesienia. W odróżnieniu od technik genomowych, w których analizowane sekwencje są przyrównywane w ciągle rozbudowywanej i aktualizowanej, światowej bazie danych NCBI BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*), w technice MALDI-TOF MS identyfikacja mikroorganizmów odbywa się przy użyciu wewnętrznych baz przynależnych do danego urządzenia i ewentualnie rozbudowywanych o nowe profile widm maso-

wych na potrzeby danego laboratorium. Ograniczenia w identyfikacji MALDI-TOF MS blisko spokrewnionych gatunków, jak w przypadku LAB, mogą wynikać z braku referencyjnych widm masowych w bazie danych przynależnej do aparatu, z błędów technicznych powstałych podczas przygotowania próbki do analizy lub z różnych warunków hodowlanych, które mogą oddziaływać na wynik analizy [1]. Takie ograniczenia mogą stanowić dużą przeszkodę we właściwej identyfikacji mikroorganizmów, szczególnie nowych, niewystępujących w danej bazie danych.

Celem pracy była ocena możliwości różnicowania 12 szczepów *Lactobacillus* przy użyciu metod powszechnie stosowanych w laboratoriach: sekwencjonowania genu *16S* rDNA, genu *pheS* oraz MALDI-TOF MS.

Material i metody badań

Badaniom poddano 12 szczepów *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności, w tym jeden szczep pochodzący z kolekcji DSMZ – tab. 1. Zgodnie z nową nomenklaturą [15] bakterie kwasu mlekowego zreklasyfikowano na podstawie najnowszych danych genetycznych i filogenetycznych.

Tabela 1. Taksonomia analizowanych szczepów LAB według *16S* rDNA i nowej nomenklatury
Table 1. Taxonomy of analysed LAB strains according to *16S* rDNA and new nomenclature

Szczep Strain	Źródło / Source	Identyfikacja wg <i>16S</i> rDNA <i>16S</i> rDNA identification	Nowa nomenklatura New nomenclature
1178	Chleb / Bread	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
975	Sok pomidorowy Tomato juice	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
863	Sok pomidorowy Tomato juice	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
DSM 6235	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
102	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Loigolactobacillus backii</i>
103	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Loigolactobacillus backii</i>
133	Probiotyk / Probiotic	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
3/16/1	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
432	Sok z kiszonych ogórków Sauerkraft juice	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
489	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
557	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
738	Piwo / Beer	<i>Lactobacillus rossiae</i>	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>

Bakterie kwasu mlekowego izolowano z produktów spożywczych zgodnie z procedurą PN-ISO 15214:2002 [9]. W zależności od potrzeb LAB posiewano na pożywkę MRS agar (*Lactobacillus* Agar według DeMan, Rogosa i Sharpe, Merck KGaA, Niemcy) lub do pożywki MRS bulion (Merck KGaA, Niemcy) i inkubowano w temp. 30 °C przez 72 h w warunkach anaerobowych.

Zastosowano trzy rodzaje analiz (sekwencjonowanie genu *16S*, *pheS* oraz MALDI-TOF MS) w celu porównania możliwości różnicujących każdej z metod.

Do izolacji DNA z 18-godzinnych hodowli płynnych badanych szczepów używano zestawu ExtractMe DNA Bacteria Kit (Blirt, Gdańsk, Polska) zgodnie z instrukcją producenta. Sekwencjonowanie genu *16S* rDNA prowadzono z wykorzystaniem primerów 16SF: 5'-AGACTTTGATCCTGGCTCAG-3' i 16SR: 5'-ACGGCTACCTGTTACGACT-3' amplifikujących prawie całą sekwencję genu o długości ok. 1500 bp. Warunki przeprowadzonej reakcji opisano w pracy Buckiej-Kolendo i wsp. [3].

Analizę genu *pheS* prowadzono z wykorzystaniem primerów pheS-21-F: 5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3' i pheS-22-R: 5'-GGRTGRACCATVCCNGCHCC-3' w warunkach podanych przez Nasera i wsp. [7].

Na podstawie wyników sekwencjonowania genu *16S* rDNA i *pheS* badanych szczepów *Lactobacillus* przeprowadzono analizę filogenetyczną z zastosowaniem algorytmu CLUSTAL W. Przy użyciu programu MEGAX [6] dokonywano alignmentu sekwencji i konstruowano na ich podstawie drzewa z wykorzystaniem analizy Neighbor-Joining z odległościami obliczonymi metodą największej wiarygodności. Odległości ewolucyjne obliczano przy użyciu metody największej złożonej wiarygodności. Zostały one podane w jednostkach liczby podstawień zasad przypadających na miejsce. Ostateczny zbiór danych zawierał łącznie 1480 pozycji dla genu *16S* DNA oraz 390 pozycji dla *pheS*. Różnorodność nukleotydów badanych sekwencji była odpowiednio na poziomie $\pi = 0,86$ i $0,16$.

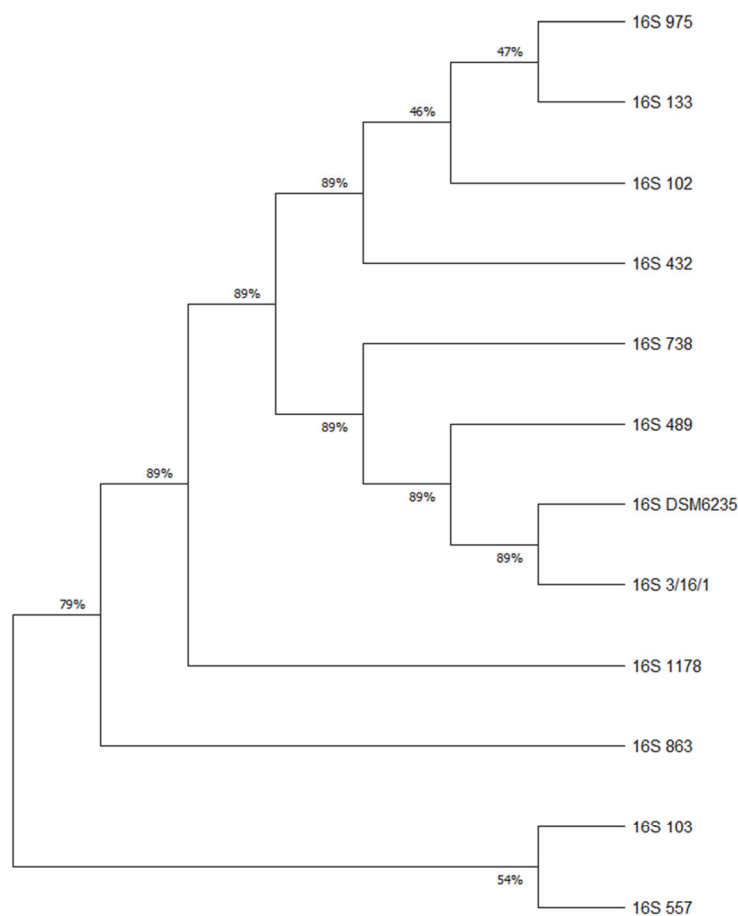
Analizę MALDI-TOF MS wykonywano przy użyciu dwóch niezależnych aparatów Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Niemcy), każdy z własną bazą danych. Do badań stosowano 18-godzinne hodowle LAB w warunkach przedstawionych przez Bucką-Kolendo i wsp. [3]. W obu przypadkach jako matrycę stosowano HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid). Analizę widm masowych przeprowadzono w programie BioNumerics 7.6.3 (Applied Maths). Wykonano po trzy powtórzenia widm wszystkich badanych szczepów.

Hierarchiczną analizę skupień widm MALDI-TOF MS prowadzono na podstawie macierzy podobieństw obliczonej z zastosowaniem współczynnika Pearsona. Profile widm masowych tworzą w odniesieniu do ich sygnałów i intensywności otrzymanych pików. Alignment i grupowanie prowadzono z tolerancją liniową 300 ppm i stałą tolerancją 0,5. Wyniki uzyskane techniką MALDI-TOF MS poddano analizie wielowymiarowego skalowania profili widm masowych (MDS – *Multi Dimensional Scaling*), która jest uważana za alternatywę analizy czynnikowej.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie badań filogenetycznych, mających na celu ustalenie wzajemnego pokrewieństwa szczepów *Lactobacillus*, przeprowadzonych metodą analizy sekwencji

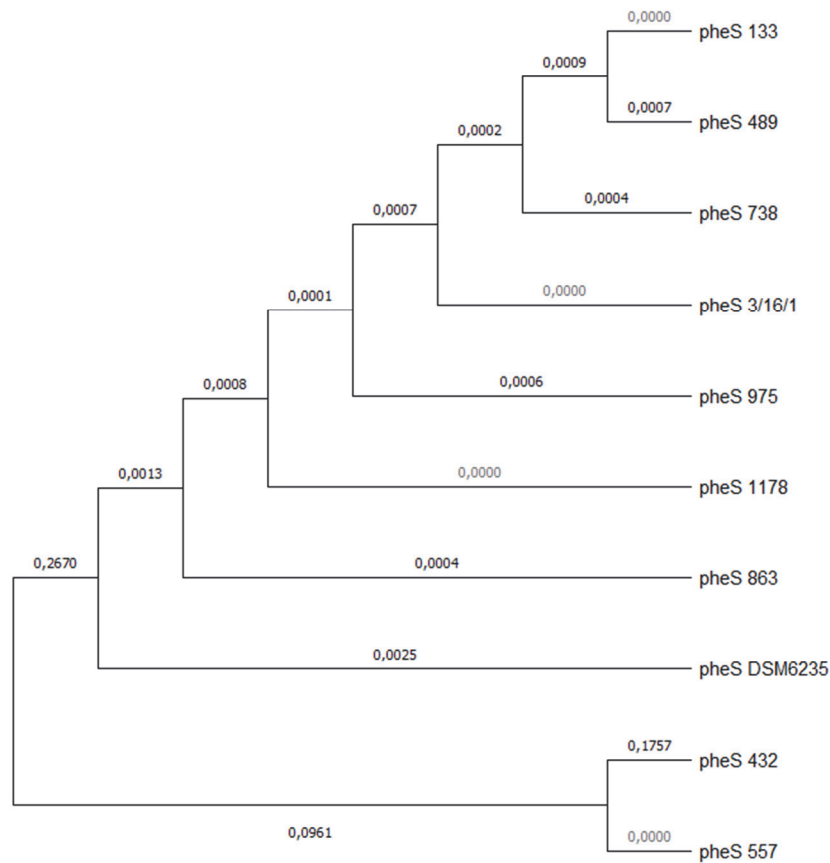
genów *16S* i *pheS*, wykazano, że gen *16S* miał większy potencjał różnicujący. Podobieństwo analizowanych sekwencji genu *16S* rDNA (rys. 1) było na poziomie 89 % dla 10 szczepów, homologia 2 szczepów (*L. backii* 103 i *L. brevis* 557) stanowiła mniej niż 79 % w stosunku do pozostałych i zostały one ujęte w oddzielny klaster. Otrzymana różnorodność nukleotydowa sekwencji była na poziomie $\pi = 0,86$. Wyniki nie korelowały z wynikami identyfikacji bakterii bazującej na sekwencjonowaniu genu *16S* rDNA.



Rys. 1. Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie analizy sekwencji genu *16S* rDNA przedstawiające relacje pokrewieństwa badanych szczepów (suma długości gałęzi = 3,25666995)

Fig. 1. Phylogenetic tree build on the basis of sequence analysis of the *16S* rDNA gene and representing evolutionary relationships of taxa tested (total of branch lengths = 3.25666995)

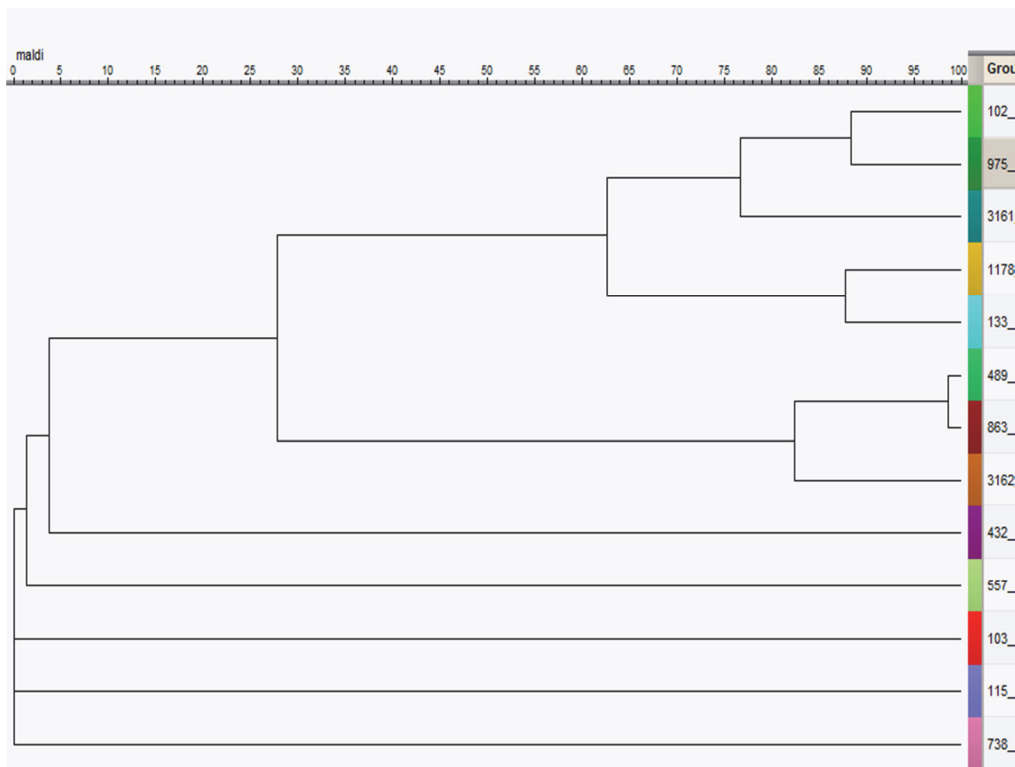
Drzewo filogenetyczne sekwencji genu *pheS* (rys. 2) podzielono na dwa klastry. Jeden klaster zawierał 8 szczepów z homologią na poziomie 90 ÷ 98 %, a drugi – z 2 szczepami: 557 i 432, których podobieństwo wynosiło poniżej 90 %. W przypadku 2 szczepów: 102 i 103 nie udało się otrzymać sekwencji genu *pheS*. Różnorodność nukleotydowa π była na poziomie 0,16. Uzyskane wyniki korelują z wynikami identyfikacji bakterii na podstawie sekwencji genu *pheS*, w której 8 szczepów (DSM 6235, 1178, 975, 863, 738, 489, 133, 3/16/1) scharakteryzowano jako *L. plantarum*, a 2 szczepy (557 i 432) – jako *L. brevis*.



Rys. 2. Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie analizy sekwencji genu *pheS* przedstawiające relacje pokrewieństwa badanych szczepów (suma długości gałęzi = 0,54758904)

Fig. 2. Phylogenetic tree build on the basis of sequence analysis of the *pheS* gene and representing evolutionary relationships of taxa tested (total of branch lengths = 0.54758904)

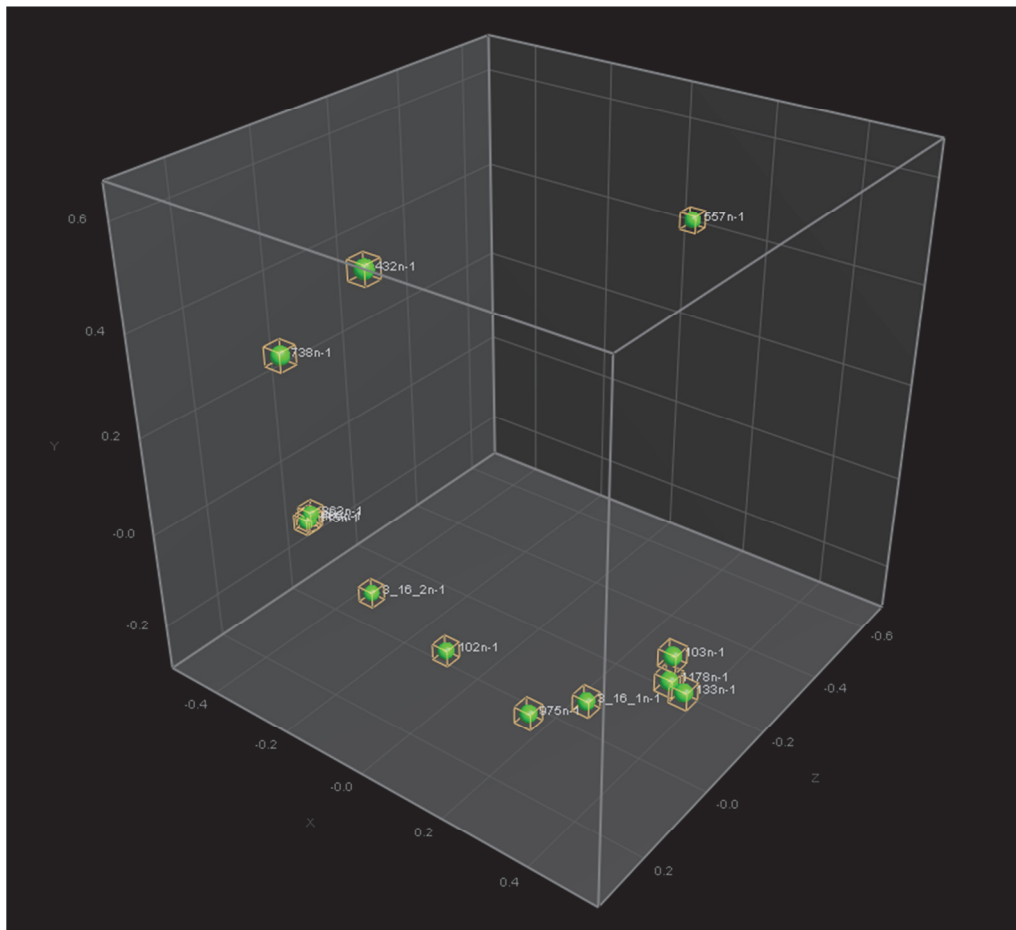
W celach porównawczych stopnia identyfikacji techniką MALDI-TOF MS z analizą sekwencji *16S* rDNA i genu *pheS* wykonano dendrogram profili widm masowych (rys. 3). Analizę przeprowadzono metodą UPGMA. W analizie profili widm masowych (MSP) względną odległość między odkształceniami przedstawia się w jednostkach arbitralnych, gdzie 100 oznacza całkowite podobieństwo, a 0 oznacza minimalne podobieństwo.



Rys. 3. Dendrogram skupień widm MALDI-TOF MS badanych szczepów LAB (barwy odpowiadają szczepom)

Fig. 3. Cluster dendrogram of MALDI-TOF MS spectra of LAB strains tested (colours represent strains)

W wyniku rozmieszczenia badanych szczepów jako punktów w przestrzeni n-wymiarowej zaobserwowano rozłożenie podobieństw i różnic pomiędzy badanymi szczepami LAB (rys. 4). Rozłożenie korelowało z hierarchiczną analizą skupień widm masowych.



Rys. 4. Analiza MDS. Skalowanie wielowymiarowe profili mas (MS) uzyskanych analizą MALDI-TOF, określające podobieństwa i różnice pomiędzy badanymi szczepami *Lactobacillus*

Fig. 4. MDS analysis. Multidimensional scaling of mass spectra (MS) profiles obtained using MALDI-TOF analysis and showing similarities and differences between analysed *Lactobacillus* strains

W analizie klastrow zidentyfikowanych na podstawie sekwencji genów *16S* rDNA i *pheS* zaobserwowano, że gen *pheS* w badanych szczepach charakteryzował się wysokim stopniem konserwatywności i niskim potencjałem różnicującym. Analizą sekwencji *pheS* dowiedziono, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* mają duże pokrewieństwo tego genu, co może wskazywać na niewielkie możliwości jego zastosowania jako wiarygodnego i czułego narzędzia do różnicowania. Tylko w przypadku 3 szczepów w obu metodach uzyskano ten sam wynik identyfikacji (*L. plantarum* 1178, *L. plantarum* 867 i *L. brevis* 557). Spośród metod molekularnych analiza genu *16S* rDNA umożliwiła uwidocznienie większej różnorodności badanych szczepów w porównaniu

z analizą *pheS* (tab. 2), co potwierdzono również w analizie różnorodności nukleotydowej badanych sekwencji, w której współczynnik π był wyższy dla genu *16S* rDNA (0,86) niż dla genu *pheS* (0,16). Po przeprowadzeniu analizy *16S* rDNA zidentyfikowano 4 szczepy *L. brevis* (DSM 6235, 557, 489, 3/16/1), po 2 szczepy *L. plantarum* (1178, 863), *L. rhamnosus* (975, 115), *L. backii* (102, 103) i po jednym – *L. curvatus* (432) i *L. rossiae* (738). W analizie genu *pheS* zróżnicowanie szczepów było znacznie mniejsze. Otrzymano 8 szczepów *L. plantarum* (DSM 6235, 1178, 975, 863, 738, 489, 133, 3/16/1) i 2 szczepy *L. brevis* (557, 432). W przypadku 2 szczepów scharakteryzowanych jako *L. backii*, w analizie *16S* rDNA nie udało się uzyskać sekwencji *pheS*. Stwierdzono, że badaniem sekwencji *16S* rDNA uzyskuje się większe możliwości różnicujące.

W identyfikacji metodą MALDI-TOF MS, w obu analizach, uzyskano taki sam wynik dla 10 z 12 szczepów: 7 – *L. brevis* (DSM 6235, 102, 103, 489, 863, 975, 3/16/1), 2 – *L. plantarum* (1178, 133) i 1 – *L. curvatus*. W przypadku szczepów 432 i 738 otrzymano różną identyfikację.

Identyfikacja wybranych bakterii kwasu mlekowego metodami molekularnymi i porównanie ich z metodą MALDI-TOF MS doprowadziły do wniosku, że wyniki wszystkich metod pokrywały się tylko w przypadku jednego szczepu *L. plantarum* 1178. Dla porównania taką samą identyfikację z użyciem genu *16S* rDNA i MALDI-TOF MS uzyskano dla 5 szczepów, w tym 3 szczepów *L. brevis* (DSM 6235, 3/16/1 i 489), jednego szczepu *L. plantarum* 1178 i szczepu *F. rossiae* 738, ale w przypadku MALDI-TOF MS tylko z pierwszej analizy. W wyniku porównania metod z wykorzystaniem sekwencjonowania genu *pheS* i MALDI-TOF MS uzyskano taki sam wynik (w obu metodach) w przypadku szczepów 1178 i 133 i zidentyfikowano je jako *L. plantarum*, a w przypadku pierwszej analizy MALDI-TOF MS scharakteryzowano szczep 432 jako *L. brevis*.

Jak podają Naser i wsp. [8], analiza różnicowania blisko spokrewnionych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na podstawie genu *pheS* stanowi wiarygodną, alternatywną metodę dla genu *16S* rDNA. W badaniach własnych wykazano jednak, że identyfikacja szczepów LAB z zastosowaniem sekwencjonowania genu *pheS* była mało zróżnicowana, a w analizie porównawczej odnotowano wysoki poziom homologii tego genu w badanych szczepach (98 %). Podobne wyniki uzyskali wcześniej Naser i wsp. [7] w badaniach nad identyfikacją bakterii z gatunku *Enterococcus*. Zaobserwowali oni, że gen *pheS* miał wysoki stopień homogeniczności wśród badanych szczepów. Podobieństwo sekwencji genu *pheS* w szczepach *Enterococcus* wynosiło 97 %, co wskazywało na niską moc dyskryminacyjną tego genu przy zastosowaniu do różnicowania wewnątrzgatunkowego. Sanches-Juanes i wsp. [10] stwierdzili, że identyfikacja bakterii kwasu mlekowego z użyciem genu *pheS* oraz metoda MALDI-TOF MS są wiarygodnymi technikami identyfikacji tych bakterii i mają dużą siłę dyskryminacyjną. Obie

Tabela 2. Wyniki identyfikacji bakterii kwasu mlekowego z zastosowaniem metod sekwencjonowania genu *16S* rDNA, genu *pheS* i techniki MALDI-TOF MSTable 2. Identification results of lactic acid bacteria using *16S* rDNA and *pheS* gene sequencing methods and MALDI-TOF MS technique

Szczep Strain	Analiza <i>16S</i> rDNA <i>16S</i> rDNA analysis	Analiza genu <i>pheS</i> Gene <i>pheS</i> analysis	Analiza MALDI-TOF MS MALDI-TOF MS analysis	
			I	II
1178	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
975	<i>Lactiacaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
863	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
DSM 6235	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
102	<i>Levitlactobacillus backii</i>	NR	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
103	<i>Levitlactobacillus backii</i>	NR	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
133	<i>Lactiacaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
3/16/1	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
432	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Lactiacaseibacillus rhamnosus</i>
489	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
557	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
738	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>

Objaśnienie / Explanatory note:
NR – brak wyników / no results.

techniki umożliwiły autorom przypisanie bakterii do właściwego rodzaju i gatunku. W przypadku badań własnych takie same wyniki otrzymano dla dwóch z 12 szczepów zidentyfikowanych jako *L. plantarum* (1178, 133), z czego tylko jeden szczep 1178 został potwierdzony jako *L. plantarum* również w analizie *16S* rDNA oraz dla szczepu 432 w jednej analizie MALDI-TOF MS, w której został on przypisany do *L. brevis*. W identyfikacji bakterii metodą MALDI-TOF MS kluczowa jest zasobność bazy danych urządzenia w widma masowe, gdyż w dużej mierze od niej zależy właściwe scharakteryzowanie mikroorganizmu. Porównanie wyników identyfikacji przy użyciu dwóch urządzeń, ale zawierających różne biblioteki danych, dowodzi, że w niektórych przypadkach identyfikacja może się różnić (szczep 432, 738).

Wnioski

1. Przy doborze metod różnicujących i identyfikujących szczepy bakterii kwasu mlekowego stwierdzono, że sekwencjonowanie genu *16S* rDNA umożliwiło większe zróżnicowanie bakterii w porównaniu z analizą genu *pheS*, który charakteryzował się większą homologią, a przez to miał znacznie mniejszy potencjał różnicujący.
2. Wartość współczynnika różnorodności nukleotydowej (π) sekwencji potwierdziła większą homologię w obrębie genu *pheS* w stosunku do genu *16S* rDNA.
3. Analizą nukleotydową badanych sekwencji nie wykazano korelacji z analizami filogenetycznymi.
4. Stwierdzono, że możliwości dyskryminacyjne MALDI-TOF MS są porównywalne do innych stosowanych procedur identyfikacyjnych. Metoda ta nadaje się do rutynowego stosowania dzięki szybkości, precyzji i prostocie przygotowania próbki.
5. Uznano, że przy identyfikacji bakterii metodą MALDI-TOF MS duże znaczenie miała biblioteka referencyjnych widm masowych, do której analizowane szczepy były porównywane.

Literatura

- [1] Akimowicz M., Bucka-Kolendo J.: MALDI-TOF MS – application in food microbiology. *Acta Biochimica Polonica*, 2020, (3) 67, 327-332.
- [2] Berg G., Rybakova D., Fischer D., Cernava T., Verges M.-C.C., Charles T., Chen X., Cocolin L., Eversole K., Corral G.H., Kazou M., Kinkel L., Lange L., Lima N., Loy A., Macklin J.A., Maguin E., Mauchline T., McClure R., Mitter B., Rayan M., Sarand I., Smidt H., Schelkle B., Roume H., Kira G.S., Selvin J., de Souza R.S.C., van Overbeek L., Singh B.K., Wagner M., Walsh M., Sessitsch A., Schloter M.: Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, 2020, 8, #103.
- [3] Bucka-Kolendo J., Sokołowska B., Winiarczyk S.: Influence of high hydrostatic pressure on the identification of *Lactobacillus* by MALDI-TOF MS – Preliminary study. *Microorganisms*, 2020, 8 (6), #813.
- [4] Chao S.-H., Kudo Y., Tsai Y.-Ch., Watanabe K.: *Lactobacillus futsaii* sp. nov., isolated from fu-tsai and suan-tsai, traditional Taiwanese fermented mustard products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, 62 (3), 489-494.
- [5] Foschi C., Laghi L., Parolin C., Giordani B., Compri M., Cevenini R., Margangoni A., Vitali B.: Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of lactobacilli: Integration of 16S rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and H-NMR. *PLoS ONE*, 2017, 12(2), #e0172483.
- [6] Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 2018, 35, 1547-1549.
- [7] Naser S., Thompson F., Hoste B., Gevers D., Dawyndt P., Vancanneyt M., Swings J.: Application of multilocus sequences analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 2005, 151, 2141-2150.


- [8] Naser S., Dawyndt P., Hoste B., Gevers D., Vandemeulebroecke K., Cleenwerck I., Vancanneyt M., Swings J.: Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, 57, 2777-2789.
- [9] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 stopni C.
- [10] Sánchez-Juanes F., Teixeira-Martín V., González-Buitrago J.M., Velázquez E., Flores-Félix J.D.: Identification of species and subspecies of lactic acid bacteria present in Spanish cheeses type “Torta” by MALDI-TOF MS and *pheS* gene analyses. *Microorganisms*, 2020, 8(2), #301.
- [11] Sharma A., Lee S., Park Y.-S.: Molecular typing tools for identification and characterizing lactic acid bacteria: A review. *Food Sci. Biotechnol.*, 2020, 29(10), 1301-1318.
- [12] Stackebrandt E., Fredriksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kampfer P., Maidem M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B.: Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, 52, 1043-1047.
- [13] Stefańska I., Stecka K.: Postępy w identyfikacji i różnicowaniu bakterii fermentacji mlekowej. Część I. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 2012, 67 (3), 35-51.
- [14] Stefańska I., Stecka K.: Postępy w identyfikacji i różnicowaniu bakterii fermentacji mlekowej. Część II. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 2012, 67 (4), 49-66.
- [15] Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O'Tolle P.W., Pot W., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G.E., Ganzle M.G., Lebeer S.: A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description on 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2020, 70, 2782-2858.

COMPARISON OF *LACTOBACILLUS* IDENTIFICATION METHODS

S u m m a r y

Lactic acid bacteria (LAB) are widely used in various sectors of food industry, in biotechnology and in medicine, therefore it is very important to properly identify them and to correctly assess their intra-species differentiation. The selection of appropriate molecular analysis techniques should take into account the high accuracy, repeatability and typability of the method.

The objective of the research study was to assess the possibility of differentiating 12 *Lactobacillus* strains with the use of techniques commonly applied in laboratories: the sequencing of the *16S* rDNA gene, *pheS* gene and MALDI-TOF MS. Based on the analysis results obtained, it was found that in the tested strains the *pheS* gene was characterised by a high level of homology (98 %) and a low discriminant power. In the two independent MALDI-TOF MS analyses the same result was obtained for 10 strains: seven – *L. brevis* (DSM 6235, 102, 103, 489, 863, 975, 3/16/1), two – *L. plantarum* (1178, 133) and one – *L. curvatus* 557. After the performed sequencing analysis of the *16S* rDNA gene the findings were confirmed only in the case of five (DSM 6235, 3/16/1 and 489) of the twelve strains tested. The comparison of the results obtained made it possible to conclude that as for the selected LAB strains the highest differentiating value had the analysis based on the sequencing of the *16S* rDNA gene.

Key words: lactic acid bacteria, LAB, gene *16S* rDNA, gene *pheS*, MALDI-TOF MS 

PUBLIKACJA 4

**Bucka-Kolendo Joanna, Juszcuk-Kubiak Edyta,
Sokołowska Barbara (2021)**



Effect of High Hydrostatic Pressure on Stress-Related *dnaK*, *hrcA*,
and *ctsR* Expression Patterns in Selected *Lactobacilli* Strains.

Genes, 12 (11), 1720.

DOI: 10.3390/genes12111720.

Article

Effect of High Hydrostatic Pressure on Stress-Related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* Expression Patterns in Selected *Lactobacilli* Strains

Joanna Bucka-Kolendo ^{1,*} , Edyta Juszcuk-Kubiak ²  and Barbara Sokołowska ^{3,4} 

¹ Department of Microbiology, Culture Collection of Industrial Microorganisms-Microbiological Resource Center, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, 02-532 Warsaw, Poland

² Department of Microbiology, Laboratory of Biotechnology and Molecular Engineering, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agriculture and Food Biotechnology—State Research Institute, 02-532 Warsaw, Poland; edyta.juszcuk-kubiak@ibprs.pl

³ Department of Microbiology, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, 02-532 Warsaw, Poland; barbara.sokolowska@ibprs.pl

⁴ Institute of High Pressure Physics, Polish Academy of Sciences, 01-142 Warsaw, Poland

* Correspondence: joanna.bucka@ibprs.pl

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) in the natural environment meet multiple stressors such as pH and temperature variations, increased nutrition and metabolite concentrations, harmful chemicals, acidic/oxidative conditions, osmotic pressure, and starvation. However, LAB strains are not subjected to high hydrostatic pressure (HHP) which currently is the most common non-thermal decontamination technology in the food industry. In this context, the LAB response to HHP is more difficult to identify compared to other stress-induced responses, and *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* can serve as essential regulators in this reaction. In the present study, the expression level of *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* mRNAs in 15 LAB strains after the HHP (300 MPa/5') exposure was evaluated. As a result, the HHP-treatment affected the up-regulation of *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* in *L. backii* KKP 3565, *L. backii* KKP 3566, *L. rhamnosus* KKP 3570, *L. brevis* KKP 3575 strains, whereas, in *L. plantarum* KKP 3569, *L. rhamnosus* KKP 3571, *L. brevis* KKP 3573 all genes were lower expressed. The relative expression level of the *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* either before or after the pressure treatment for *L. brevis* DSM 6235, *L. rhamnosus* KKP 3572, *L. brevis* KKP 3574, *L. brevis* KKP 3576, *L. rossiae* KKP 3577, *L. curvatus* KKP 3578 strains were undetectable. Significant differences in the expression levels were observed, between the control and the HHP treatment strains for *dnaK* in *L. backii* KKP 3565, *L. backii* KKP 3566, *L. plantarum* KKP 3569, *L. rhamnosus* KKP 3570, *L. rhamnosus* KKP 3571, *ctsR* in *L. backii* KKP 3565, *L. rhamnosus* KKP 3570, *L. rhamnosus* KKP 3571, and *hrcA* in *L. plantarum* KKP 3569, *L. rhamnosus* KKP 3571. Overall, the studied genes, *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* can be useful markers to indicate the LAB cellular response to HHP. These molecular parameters can help to optimize the desirable LAB growing conditions in industrial processes and to understand the complexity of the stress-related mechanism.

Keywords: lactic acid bacteria (LAB); high hydrostatic pressure (HHP); stress-related genes; gene expression



Citation: Bucka-Kolendo, J.; Juszcuk-Kubiak, E.; Sokołowska, B. Effect of High Hydrostatic Pressure on Stress-Related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* Expression Patterns in Selected *Lactobacilli* Strains. *Genes* **2021**, *12*, 1720. <https://doi.org/10.3390/genes12111720>

Academic Editor: Jose M. Requena

Received: 20 September 2021

Accepted: 27 October 2021

Published: 28 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

One of the biggest challenges is the clarification of the structure, functions, and dynamics of bacteria in their natural environments, as well as when subjected to different types of stress. Over the past decade, numerous technologies have been developed to investigate the association between bacteria and their reaction to changes in their niches. LAB are desired in many food products where they can provide positive sensory and nutritive features, however in products like juices, beverages, and beer they can cause spoilage and waste. [1]. The stress response is a protective mechanism of bacterial survival and adaptation to harsh

environmental conditions [2]. Exposure to a rigorous manufacturing process allows LAB to adjust to growing in or surviving in a hostile environment. The ability to cope with a wide range of environmental stress factors (changes in pH and temperature, a variety of nutrition and metabolite concentration, presence of toxic chemicals, acidic or oxidative conditions, osmotic pressure, and starvation), induce changes or repression of their stress response mechanisms [1,3]. This response is universal as it can be observed in studied bacterial species, and it consists of a set of well-coordinated processes, mainly involving the regulation of the production of various heat-shock proteins. These mechanisms include the activation of proteins responsible for protecting the bacterial cells against stress [2,4].

Among the different stress factors that can affect gene expression levels is high hydrostatic pressure (HHP). HHP is a food and beverage products preservation method that will not affect molecules like vitamins, amino acids, or flavor compounds but at the same time reduce the number of microbial counts in the product. LAB in their natural environment does not show a response to HHP, as those bacteria are not normally exposed to this stress factor [1]. It has been reported [5,6] that LAB belongs to a group of bacteria that are resistant to HHP, and because of that, the evaluation of stress response mechanisms to HHP are valuable tools to assess the shelf life of products preserved with this method. However, the LAB response to HHP is more difficult to identify in comparison to other stress factors [3], as their ability to react to HHP is expected to come from the cross-protection system [1]. Where cross-protection in LAB has been described as the exposure to a single stress factor that is commonly associated with cross-tolerance to other stressors like acid, heat, etc. [7]. Studies indicate that the molecular mechanisms of the adaptive response to stress can be species-specific [8], or even strain-specific [9], and it is considered that some phenotypes depend on the level of the expression of genes rather than their presence or absence. Thus, further studies are needed to specify how many are species/strain-specific and how/if the specificity correlates with stress toleration in *Lactobacillus* strains. Differential expression of the genes involved in stress response can result in changes in the phenotypic level [9–11]. Although the genes that are correlated with stress response in LAB are highly conservative, [10] including the high conserved class I regulon [1,12], the mechanisms of stress responses are not conserved [9] which indicates that environmental conditions influence stress response. Understanding the complexity of the stress-related gene regulation networks, and the adaptation of LAB strains to harsh environmental conditions, is important for the improvement of the industrial strategies using LAB strains and HHP.

In LAB, repressor HrcA regulates the expression of class I elements by binding specifically to the CIRCE. CIRCE is involved in the controlling inverted repeat for chaperon expression and was found in the promoter regions of the *groE* and *dnaK* operons, which encode two chaperon complexes GroES-GroEL and HrcA-DnaK-GrpE-DnaJ [8,12,13]. The *hrcA* is located in the *dnaK* operon and its expression is under autorepression control. In some LAB, the CIRCE sequences were found to be upstreaming the *hrcA-grpE-dnaK* [8], and the mRNA analysis showed rapid induction levels after heat shock [8,9]. Studies on the *dnaK* mutants suggested that induction by the stress factor (low pH) can be mediated by heat-shock regulators, HrcA and CtsR [8] and in *L. paracasei* *dnaK* mutant the stress sensitivities correlated with the upregulation of the gene [10].

In LAB genes from class III (which are regulated by CtsR repressor) are less conservative. It is suggested that CtsR is a widespread transcriptional repressor involved in heat-shock regulation [2] and in Gram (+) bacteria. It is considered to be a master regulator of the cellular protein quality and controls the genes expression involved in proteostasis. In microorganisms, the stress response is a combination of different transcriptional mechanisms that overlap and lead to complex regulatory networks [14,15]. In this context, a vital role is played by cross-regulation between CtsR and HrcA regulons and it is important in the cross-protection mechanisms in LAB that are exposed to harsh environmental factors. Vogel et al. [16] reported the lack of the alternative sigma factor in LAB may allow the bacteria to adapt to a variety of stresses in different environments.

This study aimed to investigate the effect of the HHP (300 MPa/5 min) on *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* expression levels in 15 *Lactobacilli* strains isolated from food samples.

2. Materials and Methods

2.1. LAB Strains and Culture Conditions

The 15 strains of LAB were isolated from food (juices, beverages, and beers) samples obtained commercially, to determine the source of microbial contamination of the products. The strains selected for examination were characterized by phenotypical and phylogenetical characteristics to confirm their identification, as described in Bucka-Kolendo et al. [17]. LAB strains used in the studies as well as the introduced new nomenclature proposed by Zheng et al. [18] are presented in Table 1.

Table 1. The list of studied lactic acid bacteria with the additional new nomenclature.

Strain	Source	16S rDNA Identification	New Nomenclature
KKP 3565	Beer	<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Loigolactobacillus backii</i>
KKP 3566	Beer	<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Loigolactobacillus backii</i>
KKP 3567	Beer	<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	<i>Secundilactobacillus paracollinoides</i>
KKP 3568	Bread	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
KKP 3569	Tomato juice	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
KKP 3570	Tomato juice	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
KKP 3571	Probiotic	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
KKP 3572	Ice Cream	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
KKP 3573	Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
KKP 3574	Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
KKP 3575	Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
KKP 3576	Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>
KKP 3577	Beer	<i>Lactobacillus rossiae</i>	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>
KKP 3578	Sauerkraut juice	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
DSM6235	Beer	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levitlactobacillus brevis</i>

Isolation of LAB strain was performed according to the ISO 15214:2000 method using MRS agar (*Lactobacillus* Agar according to DeMan, Rogosa, and Sharpe, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and incubation at 30 °C for 72 h. Additionally, one strain (DSM 6235) isolated from spoiled beer and collected from the Leibniz Institute—DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany) was used. The strains were cultured in MRS broth medium at 30 °C for 48–72 h under anaerobic conditions. The growth kinetics of the strains was assessed in the early stationary phase by optical density measurements OD₆₀₀ (Densitometer DEN-1B, BioSan, Riga, Latvia).

2.2. High Hydrostatic Pressure Application

Bacterial cultures from the stationary growth phase were exposed to high-pressure treatment using U 4000/65 apparatus (Unipress, Warsaw, Poland). The volume of the treatment chamber was 0.95 L with a maximum working pressure of 600 MPa. A mixture of distilled water and polypropylene glycol (1:1, v/v) was used as the pressure-transmitting fluid. The working temperature of the apparatus was in the range between −10 °C and 80 °C. The chosen application of the 300 MPa for 5 min was based on the previous research (data not shown), to guarantee the induction of the genes under the stress condition, and at the same time to avoid the inactivation of the bacterial cells.

Pressure up to 300 MPa was generated in 70–80 s, and the release time was 2–4 s. Four milliliters of each culture were subjected to HHP at 300 MPa at an ambient temperature (20 °C) and held for approximately 5 min. The pressurization times reported did not include the come-up and come-down times. For each tested strain, the assays were performed in two independent processes. After the treatment, the samples were frozen on dry ice for further analysis. Unpressurized samples were used as a control.

2.3. Plate Count Analytical Methods

The viability of each strain was assayed by counting colony-forming units immediately after HHP processing. Thereafter, ten-fold serial dilutions in the Tryptone Salt broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) were prepared, and appropriate dilutions of bacteria were spread on MRS agar and incubated at 30 °C for 48–72 h under anaerobic conditions. The plates containing less than 300 CFU/mL were selected for counting. The difference between the number of control and treated bacteria was used to estimate the number of HHP survivors.

2.4. Bacterial RNA Extraction

Total mRNA was extracted from control and pressurized cultures with the use of the RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The purity and concentration of the RNA were determined by measuring the absorbance at 260 nm and the 260/280 nm ratio using UV-Vis NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The RNA integrity was evaluated on the Qubit 4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) with Invitrogen Qubit RNA IQ Assay. Moreover, the quality of the RNA was checked by electrophoresis on 1% agarose gels to reveal any contaminating genomic DNA. The RNA samples were stored at −80 °C.

2.5. Real-Time PCR (RT-qPCR)

Custom TaqMan gene expression assays for *dnaK* (no. AP47ZY7), *hrcA* (no. APXGWAE), and *ctsR* (no. APZTJE9) were used for gene expression analysis. Primer and probe sequences are shown in Table 2. These were synthesised by ThermoFisher Scientific (TFS) and included both customised primer and probe sets, designed via the Applied Biosystems Primer Express™ 2.0 software as well as pre-designed, gene-specific TaqMan® probe and primer sets (TaqMan® Gene Expression Assays, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The relative expression level of stress-related genes was normalized to an endogenous control 16S rRNA gene (TagMan assay no. Ba04230899_s1; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Stability of 16S rRNA as endogenous control was measured for control and HPP treatment strains using ΔCT algorithm [19]. Relative expression ratios for target genes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method [20].

Table 2. Sequence information for primers and probes used.

Gene	Sequence—5' to 3'	Amplicon (bp)	TagMan Assay No.	GenBank
<i>ctsR</i>	F: TGGTCGATGATGCTGATGTG FAM-ACAACGAGATGCTTATGCGGTCGT-MGB R: TAAATCGTCGAGAAGCGCAA	128	AP47ZY7	CP052869.1
<i>hrcA</i>	F: TGCAAGATCCAGACGGATTC P: FAM-TTTGGCAGTGTGTTGTCCAAGGC-MGB R: ACTATACGACCAGCAAAGC	116	APXGWAE	JX967738.1
<i>dnaK</i>	F: TGTCGGTCTTATCCAAACC P: FAM-CTGCCCGGTTGGTTCGTTAATAA-MGB R: CTTTAGTTGCTTGCCGTTGG	110	APZTJE9	CP053571.1
16S	Assay by design TFS		Ba04230899_s1	

F—forward; P—probe; R—reverse.

RT-qPCR was performed in triplicate using a TaqMan™ RNA-to-CT™1-Step Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and a QuantStudio™ 3 Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Relative gene expression of *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* was performed using the QuantStudio Design & Analysis Desktop Software v.1.5.1 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.6. Statistical Data Analysis

The differences in the relative *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* expression level between control and HHP treated were determined by Student's *t*-test and analyzed with the use of GraphPad's Prism v.7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and TIBCO Statistica data analysis system v.13 (TIBCO Software Inc, Palo Alto, CA, USA; 2017). Protein-protein interaction (PPI) analyses of Lactobacillus *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* protein cluster were performed with the STRING database (string-db.org accessed on 15 September 2021) to evaluate known and predicted protein relationships.

3. Results

3.1. The Effect of the HHP on the Bacterial Cells

The results of the experiment showed that the LAB subjected to the HHP survived the process, and the survival rates are shown in Figure 1. The pressure of 300 MPa/ 5 min had a significant effect on the survival of the cells ($p < 0.05$) between control and pressurized cells. The highest reduction observed in *L. brevis* KKP 3573 and KKP 3575 was 3.1, and 3.2 logs (CFU/mL) respectively. For strains, *L. paracollinoides* KKP 3567, *L. rhamnosus* KKP 3570, *L. brevis* KKP 3574, the level of reduction was over 2 log (CFU/mL), and for other strains decrease was around 1 log (CFU/mL).

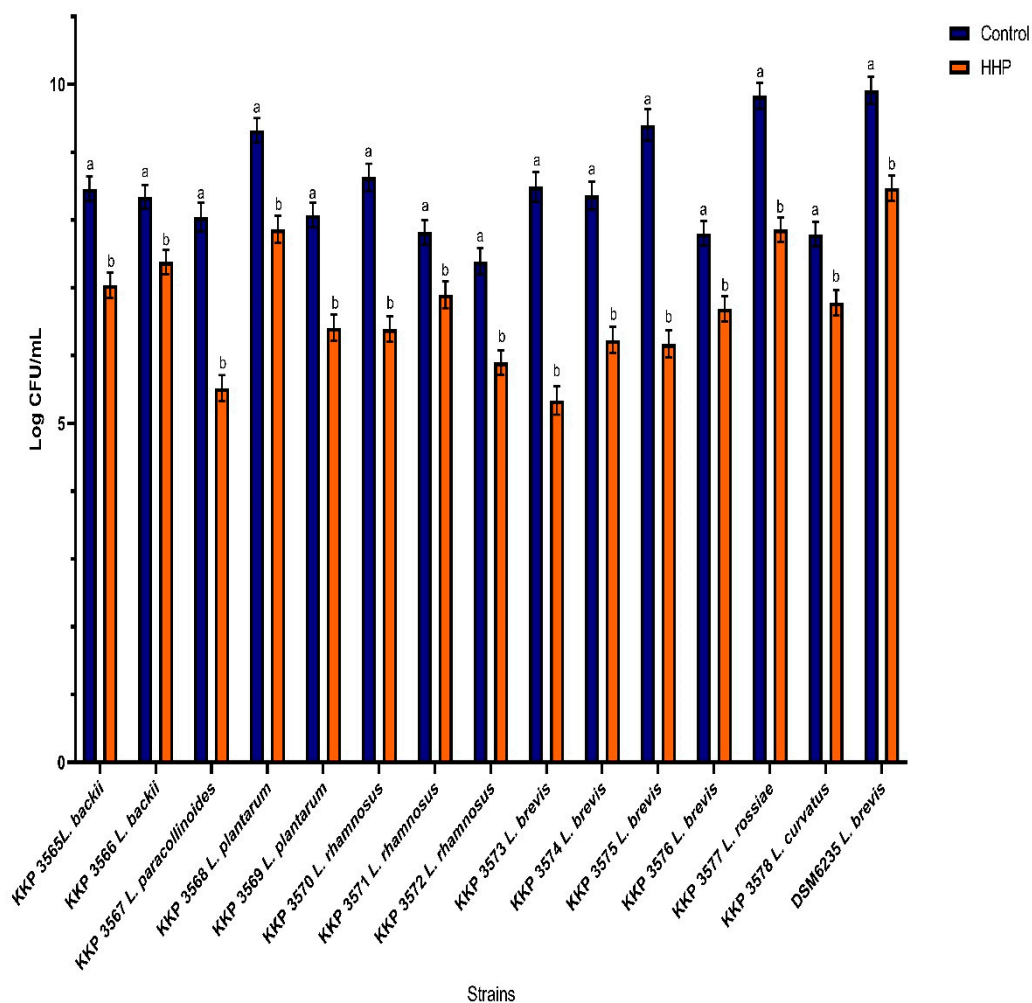


Figure 1. Effect of high hydrostatic pressure on the survival of LAB strains. Presented data are the mean of the two independent experiments and the standard deviations are indicated with vertical bars, (a) control strain (b) after HHP strain. The bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

3.2. DnaK Gene

The relative *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* expression level was investigated in control and HPP treated lactobacilli strains using the RT-qPCR method. Results showed differential patterns of the expression for all three studied genes (*ctsR*, *hrcA*, and *dnaK*).

An increase of the *dnaK* expression level in six strains (*L. backii* KKP 3565, *L. backii* KKP 3566, *L. paracollinoides* KKP 3567, *L. plantarum* KKP 3568, *L. rhamnosus* KKP 3570, *L. brevis* KKP 3575) and decrease in three strains (*L. plantarum* KKP 3569, *L. rhamnosus* KKP 3571, *L. brevis* KKP 3573) in comparison to control strains were noticed. The relative expression level of the *dnaK* in *L. brevis* DSM 6235, *L. paracollinoides* KKP 3567, *L. rhamnosus* KKP 3572, *L. brevis* KKP 3574, *L. brevis* KKP 3576, *L. rossiae* KKP 3577, *L. curvatus* KKP 3578 was found to be below to detected limit. Moreover, for five strains, *L. backii* KKP 3565, *L. backii* KKP 3566, *L. plantarum* KKP 3569, *L. rhamnosus* KKP 3570, *L. rhamnosus* KKP 3571, the *dnaK* expression level was statistically significant ($p < 0.05$) between the control and HPP treated groups (Figure 2).

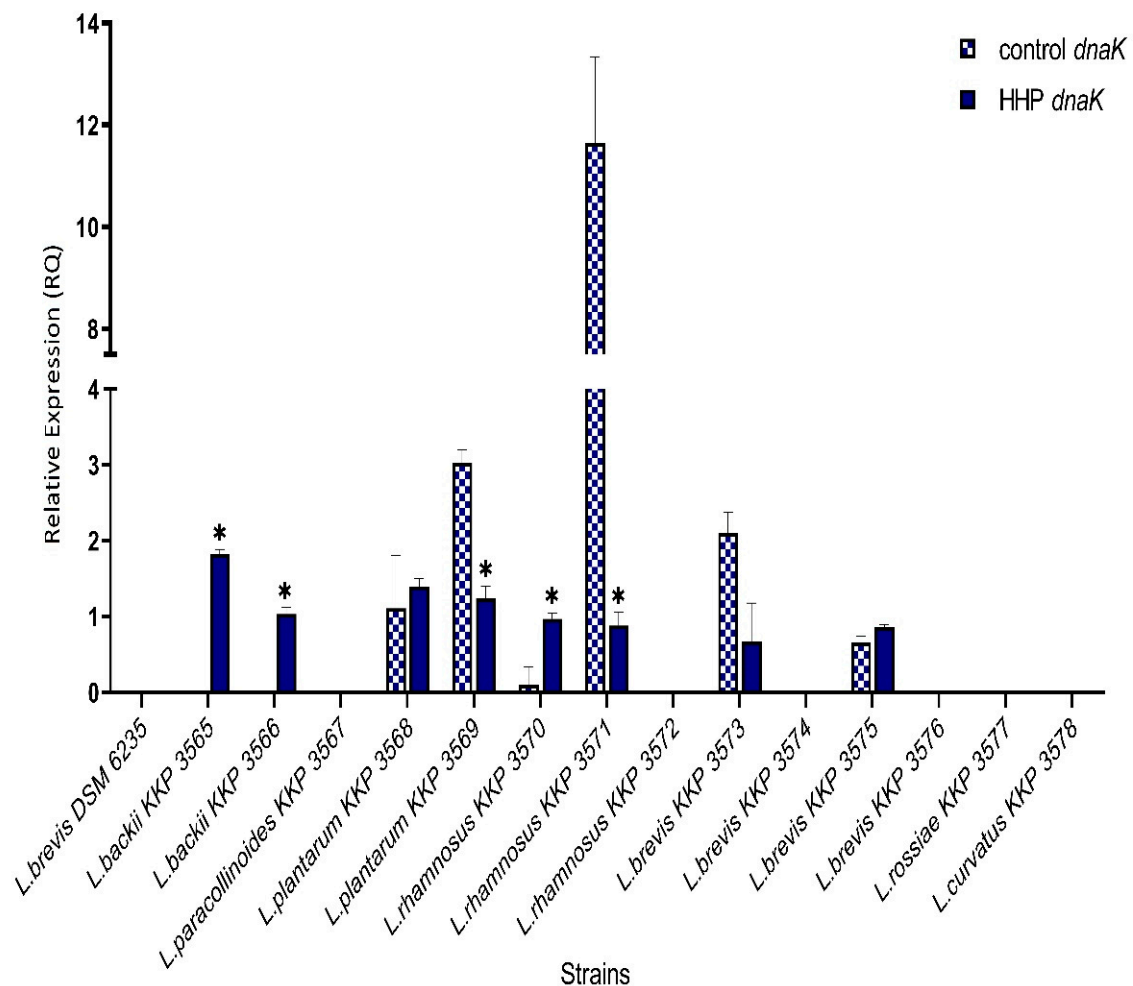


Figure 2. Relative gene expression of *dnaK* in LAB strains before and after exposure to 300 MPa pressure for 5 min. determined by RT-qPCR analysis. Presented data are the mean of the two independent experiments and the standard deviations are indicated with vertical bars. * Statistically significant differences were determined by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

3.3. ctsR Gene

For the *ctsR* gene, an increase of expression for five (*L. backii* KKP 3565, *L. backii* KKP 3566, *L. plantarum* KKP 3568, *L. rhamnosus* KKP 3570, *L. brevis* KKP 3575) strains and a

decrease for the three strains (*L. plantarum* KKP 3569, *L. rhamnosus* KKP 3571, *L. brevis* KKP 3573) was noticed. Furthermore, for three strains, *L. backii* KKP 3565 and *L. rhamnosus* KKP 3570, *L. rhamnosus* KKP 3571, statistically significant differences ($p < 0.05$) in the level of the *ctsR* expression between control and HHP treated was observed. However, for seven strains (*L. brevis* DSM 6235, *L. paracollinoides* KKP 3567, *L. rhamnosus* KKP 3572, *L. brevis* KKP 3574, *L. brevis* KKP 3576, *L. rossiae* KKP 3577, *L. curvatus* KKP 3578) the level of *ctsR* expression was found both before and after the HHP treatment, under detection limit (Figure 3).

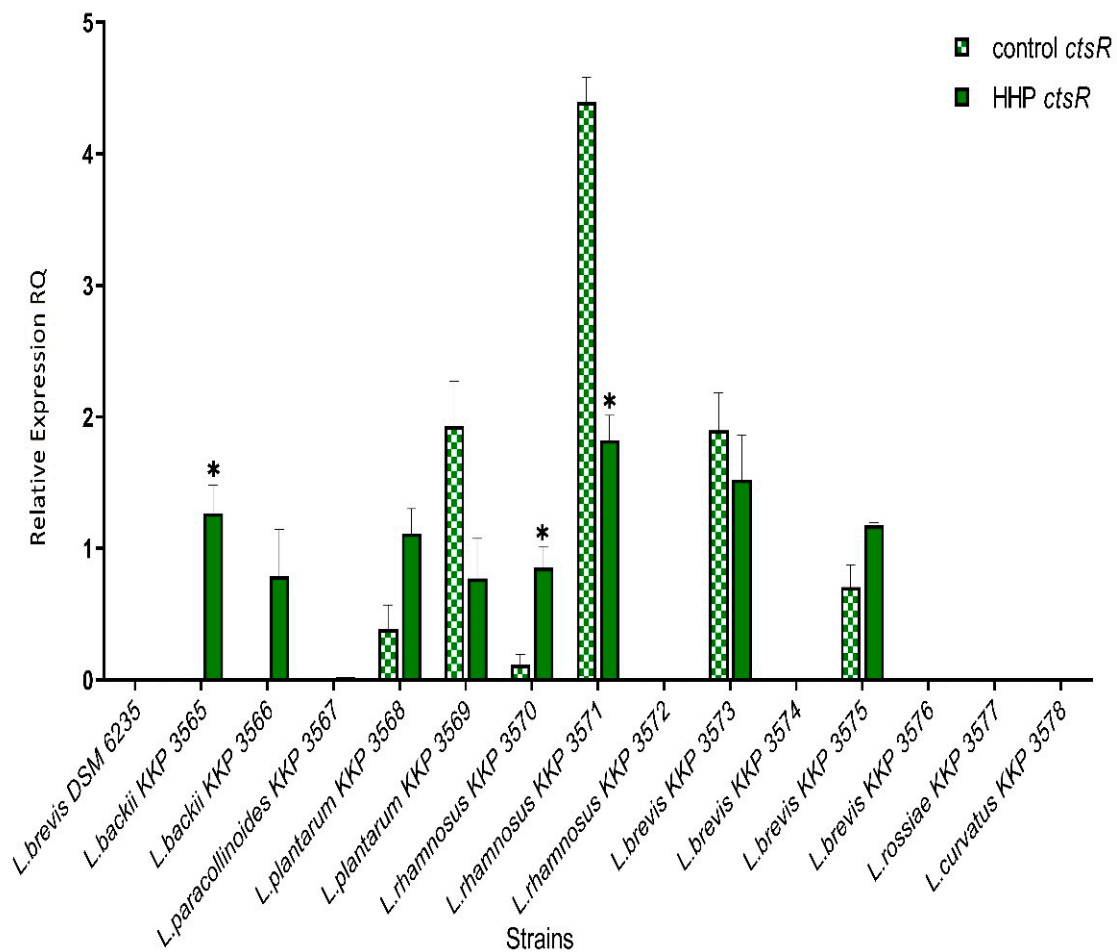


Figure 3. Relative gene expression of *ctsR* in LAB strains before and after exposure to 300 MPa pressure for 5 min. determined by RT-qPCR analysis. Presented data are the mean of the two independent experiments and the standard deviations are indicated with vertical bars. * Statistically significant differences were determined by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

3.4. *hrcA* Gene

For *hrcA* increase of the expression was observed in *L. backii* KKP 3565, *L. backii* KKP 3566, *L. paracollinoides* KKP 3567, *L. rhamnosus* KKP 3570, and *L. brevis* KKP 3575 strains, decrease in four strains (*L. plantarum* KKP 3568, *L. plantarum* KKP 3569, *L. rhamnosus* KKP 3571, *L. brevis* KKP 3573), and for the seven strains (*L. brevis* DSM 6335, *L. paracollinoides* KKP 3567, *L. rhamnosus* KKP 3572, *L. brevis* KKP 3574, *L. brevis* KKP 3576, *L. rossiae* KKP 3577, *L. curvatus* KKP 3578) no expression was observed. For *L. plantarum* KKP 3569 and *L. rhamnosus* KKP 3571 the differences in the *hrcA* expression between control and HHP treated groups were statistically significant ($p < 0.05$) (Figure 4).

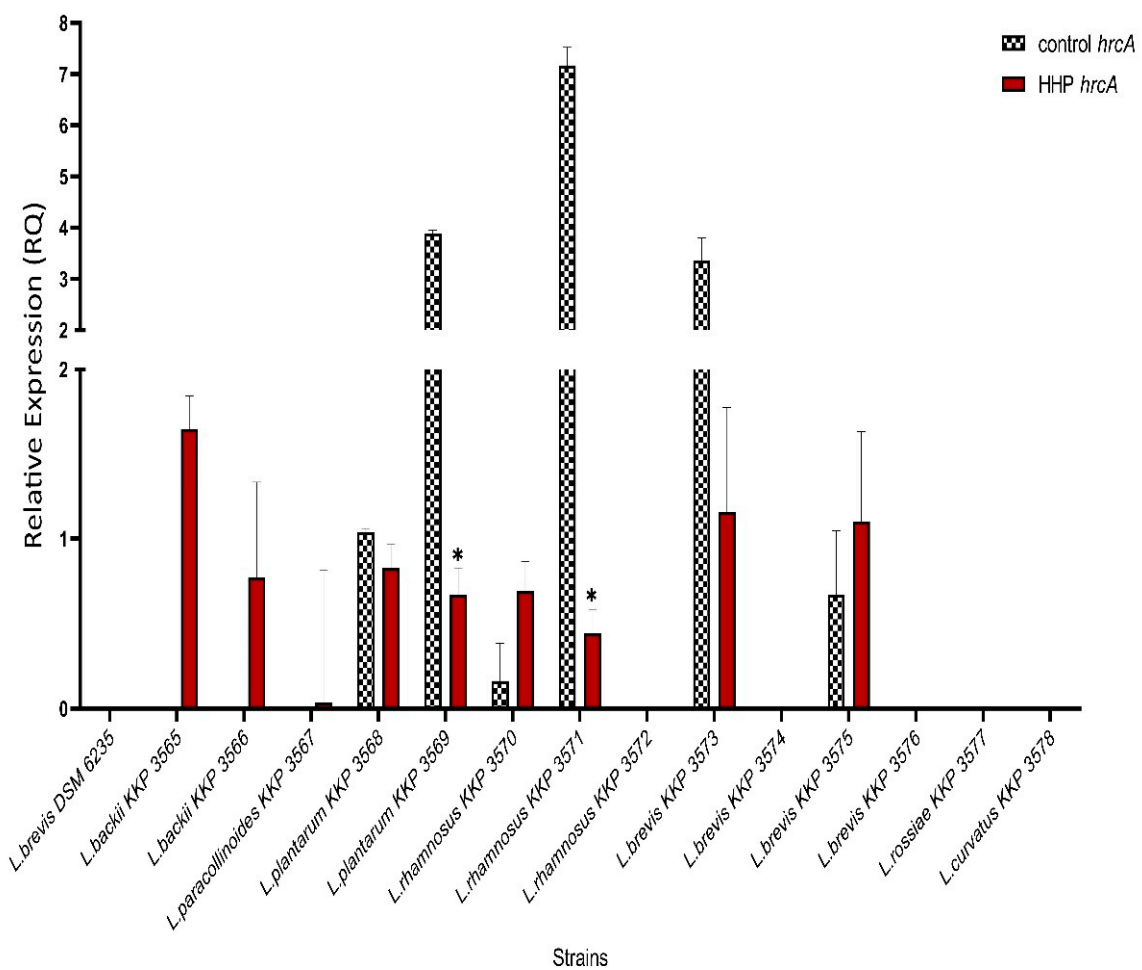


Figure 4. Relative gene expression of *hrcA* in LAB strains before and after exposure to 300 MPa pressure for 5 min determined by RT-qPCR analysis. Presented data are the mean of the two independent experiments and the standard deviations are indicated with vertical bars. * Statistically significant differences were determined by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

Overall, the analysis of the viability showed that the pressurization did affect the studied strains, and the level of survival has decreased compared to the control. The premise of the experiment demonstrates that the conditions of 300 MPa /5' allows keeping the strains viable but induces changes in the transcriptome and proteome levels. The expression results showed that in six out of 15 strains of *Lactobacilli* (*L. brevis* DSM 6235, *L. rhamnosus* KKP 3572, *L. brevis* KKP 3574, *L. brevis* KKP 3576, *L. rossiae* KKP 3577, *L. curvatus* KKP 3578), the level of the *ctsR*, *hrcA*, and *dnaK* expression was not detected either before and after the HHP treatment. In four strains namely, *L. backii* KKP 3565, *L. backii* KKP 3566, *L. rhamnosus* KKP 3570, *L. brevis* KKP 3575, the increase of *ctsR*, *hrcA*, and *dnaK* expression was noticed, whereas, for three strains (*L. plantarum* KKP 3569, *L. rhamnosus* KKP 3571, *L. brevis* KKP 3573) a decrease of *ctsR*, *hrcA* and *dnaK* expression under HHP conditions was observed. For *L. plantarum* KKP 3568 an increase of the *hrcA* expression and a decrease of the *dnaK* and *ctsR* expression was observed. For *L. backii* KKP 3565 and *L. backii* KKP 3566 strains an increase of *ctsR*, *hrcA* and *dnaK* expression levels (1 to 2-fold) after pressurization was determined. However, for *L. rhamnosus* KKP 3571, a significant decrease of *dnaK* (11-fold), *hrcA* (6-fold), and *ctsR* (2,5-fold) expression in response to HHP was observed. In the strain, *L. paracollinoides* KKP 3567, the expression levels for the *dnaK* and *ctsR* were below the detection limit, but a slight increase of the expression *hrcA* after HHP treatment was noticed. The impact of HHP on proteome was previously described in Bucka-Kolendo et al. [17].

4. Protein–Protein Interaction (PPI) Network Analysis

The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes—STRING database (string-db.org) [21] was used to seek potential interactions between differentially expressed *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* molecules, corresponding to different LAB. PPI network was constructed, with the active interaction sources, including experiments, databases, textmining, co-expression, gene fusion, and co-occurrence. In the matrix, the nodes correspond to the proteins, and the edges represent the interactions. Using the interaction score threshold of 0.7 (high confidence) the string PPI analysis (Figure 5) yielded a highly clustered network (clustering coefficient: 0.73) containing 21 nodes with 98 edges (expected number of edges 27), showing significantly more interactions than expected for a random set of similarity size drawn from the genome (enrichment p -value < 0.001). Gene ontology (GO) enrichment analysis of the molecular function included: *protein folding*, *unfolded protein binding*, *protein binding* with FDR (false discovery rate) = $1.42 \times 10^{-0.5}$.

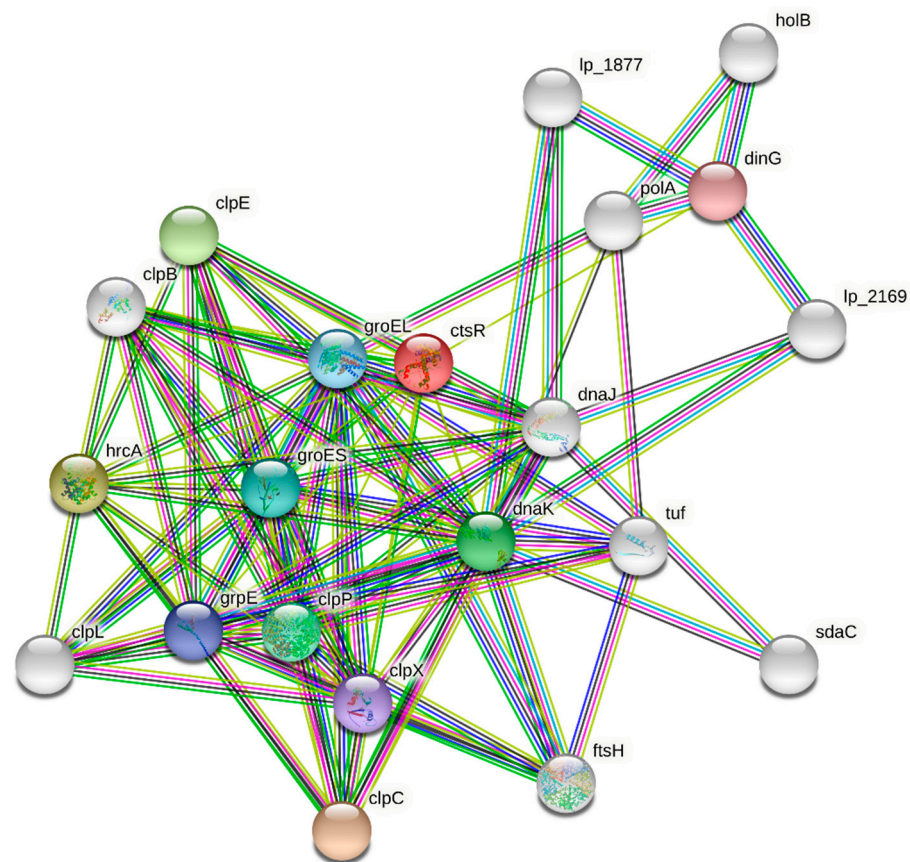


Figure 5. STRING protein–protein interaction (PPI) analyses. PPI network connectivity of *Lactobacillus* *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* protein cluster. Network contains 98 edges (vs. 27 expected), and enrichment p -value < 0.001. The confidence score threshold was set at 0.7 (high) for analyses. The gene interaction data used to build the network was based on direct physical interactions that are either experimentally derived or computationally predicted.

The PPI analysis was used to explore future relationships, to establish pathways of protein relationships associated with *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* molecules, that may meet other responses pathways to achieve the most desirable survival phenotype. As the PPI may not be limited to the strain type or physiological conditions, like HHP, the specificity and strength may vary as well. Protein can interact specifically, as when a transcription factor regulates the expression and production of different proteins.

5. Discussion

Stress as a result of exposure to different factors can be experienced by LAB in the food industry, particularly during the manufacturing process [1]. Most studies are focused on the ability to cope with heat, cold, osmotic, acid, or oxidative stress, but there is a limited number of studies regarding molecular mechanisms of the stress response, especially under HHP treatment [1,10,17]. While the HHP stress is not common to LAB, cross-protection to other stress factors occurs that induces the response. Vogel et al. [16] showed that reduction of ribosome function may occupy a central position in response to HHP, and can be linked with the expression of stress-related genes. Molecular analysis of the stress-related genes allows the development of tools to screen for tolerant or sensitive strains and to evaluate the adaptation ability of strains to harsh conditions [8]. In addition, for strains grown under different stress conditions, the analysis of transcriptome profiles allowed the identification of gene stress regulatory networks and regulons [11]. Single mutations of the *hrcA* and *ctsR* genes in *L. plantarum* WCFS1 resulted in significant changes in the expression of different genes associated with transcription regulation, primary metabolism, transportation, binding, and biosynthesis of different compounds. The deletion of both *hrcA* and *ctsR* demonstrated the complexity of the cross-talk between the gene regulatory networks influenced by stress-related regulons [11,14].

Herein, the relative expression level of the *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* before and after HHP (300 MPa/5') treatment has been evaluated. Our results showed that LAB under the HHP had different stress toleration patterns. Regulatory mechanisms of stress response genes have been investigated in several Gram-positive bacteria and studied in detail in the genetic model *Bacillus subtilis* [10,22]. Conversely, very little is known about the transcriptional regulation of stress-related genes in *lactobacilli* strains, which are likely to have evolved multiple and complex adaptive mechanisms [8,23]. Moreover, there are not enough reports regarding the impact of HHP treatment on the expression level of these genes of the *lactobacilli* strains, especially isolated from food products. In our study, we observed 1–2 fold higher *hrcA*, *ctsR*, and *dnaK* expression in the pressurized *L. backii* KKP 3565 and *L. backii* KKP 3566 strains whereas a significant decline in the expression levels of the *dnaK* (11-fold, and 1,5-fold), *hrcA* (6-fold, and 3-fold), and *ctsR* (2,5-fold and 1-fold) were noticed for pressurized strains *L. rhamnosus* KKP 3571, and *L. plantarum* KKP 3569, respectively. It has been reported that the *ctsR* mutant *L. plantarum* strain was more resistant to oxidative stress and more sensitive to ethanol and heat stresses than its wild strain, which most likely is related to the pleiotropic character of the gene transcription [11,14]. A possible explanation of these results might be associated with the complexity of the stress-related mechanisms in LAB strains [24], which we also visualized in PPI network analysis. Many transcriptional regulators, such as HrcA, CtsR, Fur, MarR, and MeR family are differentially expressed in response to the heat shock [25,26].

It is known, that external signals can elicit dramatic changes in the expression pattern of a variety of stress-related genes encoding proteins thought to improve adaptation to the changing environment [25–28]. It is thought that under the HHP stress the relative amount of mRNA of many genes is changing, and that can be a result of the selective transcription or mRNA stability [16]. The possible interpretation of the LAB response to HHP may be obtained rather from the transcriptome than from the proteome, as the proteome analysis does not always include low abundance regulatory proteins [10,16].

6. Conclusions

To summarize, the HHP parameters have to be carefully selected in function during the process in the context of the stress adaptation and identified stress response genes. In this scenario, the following transcriptomic and proteomic studies are needed to understand the impact of the HHP application on the LAB population and to help obtain the knowledge on the LAB with higher behavior flexibility upon stress conditions. Furthermore, clarifying the mechanisms based on the molecular HHP process in LAB can help to control bacterial

responses to achieve the desirable robustness of bacteria in relation to various industrial processes.

Our presented data are the solid base for the understanding of the mechanisms involved in bacterial response during industrial processes and may help to optimize production. Furthermore, the expression level of the targeted genes can point to the intensity of the stress during food and beverage preservation processes and elucidate the role of the *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* genes in the stress-related mechanism.

Author Contributions: Conceptualization, J.B.-K. and E.J.-K.; methodology, J.B.-K. and E.J.-K.; software, J.B.-K.; validation, J.B.-K. and E.J.-K.; formal analysis, J.B.-K.; investigation, J.B.-K. and E.J.-K.; data curation, J.B.-K.; writing—original draft preparation, J.B.-K.; writing—review and editing, J.B.-K. and E.J.-K.; visualization, J.B.-K.; supervision, B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bucka-Kolendo, J.; Sokołowska, B. Lactic acid bacteria stress response to preservation processes in the beverage and juice industry. *Acta Biochim. Pol.* **2017**, *64*, 459–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Roncarati, D.; Scarlato, V. Regulation of heat-shock genes in bacteria: From signal sensing to gene expression output. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 549–574. [[CrossRef](#)]
3. Mbye, M.; Baig, M.A.; AbuQamar, S.F.; El-Tarabily, K.A.; Obaid, R.S.; Osaili, T.M.; Al-Nabulsi, A.A.; Turner, M.S.; Nagendra, P.S.; Ayyash, M.M. Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 1110–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pepper, S. Characterisation of Stress Responses in *Lactobacillus Paracasei* and *Bifidobacterium Animalis* (syn. *lactis*). Ph.D Thesis, Victoria University, Wellington, Australia, 2004.
5. Sokołowska, B.; Nasiłowska, J. Controlling spoilage and pathogenic microorganisms in beetroot (*Beta vulgaris*) juice by high hydrostatic pressure. In *Safety Issues in Beverage Production*; Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; Volume 18, pp. 79–104. [[CrossRef](#)]
6. Sokołowska, B.; Skapska, S.; Fonberg-Broczek, M.; Niezgoda, J.; Rutkowska, M.; Dobros, N.; Rzoska, J.S. The impact of high hydrostatic pressure (HHP) on native microflora and the colour of beetroot juice—A preliminary shelf-life study. In *Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends*; Mendez-Vilas, A., Ed.; Wageningen Academic Publisher: Wageningen, The Netherlands, 2014; pp. 380–384. [[CrossRef](#)]
7. Darans, N.; Badosa, E.; Frances, J.; Montesinos, E.; Bonaterrea, A. Enhancing water stress tolerance improves fitness in biological control strains of *Lactobacillus plantarum* in plant environments. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Van de Guchte, M.; Serror, P.; Chervaux, C.; Smokvina, T.; Ehrlich, S.D.; Maguin, E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2002**, *82*, 187–216. [[CrossRef](#)]
9. Koch, B.; Kilstrup, M.; Vogensen, F.V.; Hammer, K. Induced levels of heat shock proteins in a *dnaK* mutant of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 3873–3881. [[CrossRef](#)]
10. Palud, A.; Scornec, H.; Calvin, J.-F.; Licandro, H. New genes involved in mild stress response identified by transposon mutagenesis in *Lactobacillus paracasei*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Papadimitriou, K.; Alegria, A.; Bron, P.A.; de Angelis, M.; Gobbetti, M.; Kleerebezem, M.; Lemos, J.A.; Linares, D.M.; Ross, P.; Stanton, C.; et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80*, 3, 837–890. [[CrossRef](#)]
12. Guidone, A.; Parente, E.; Zotta, T.; Guinane, C.M.; Rea, M.C.; Stanton, C.; Ross, R.P.; Ricciardi, A. Polymorphisms in stress response genes in *Lactobacillus plantarum*: Implications for classification and heat stress response. *Ann. Microbiol.* **2015**, *65*, 297–305. [[CrossRef](#)]
13. Capozzi, V.; Arena, P.A.; Crisetti, E.; Spano, G.; Fiocco, D. The *hsp16* gene of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* is differently regulated by salt, high temperature and acidic stresses, as revealed by Reverse Transcription Quantitative PCR (qRT-PCR) Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 5390–5405. [[CrossRef](#)]
14. Van Bokhorst-van de Veen, H.; Bongers, R.S.; Wels, M.; Bron, P.A.; Kleerebezem, M. Transcriptome signatures of class I and III stress response deregulation in *Lactobacillus plantarum* reveal pleiotropic adaptation. *Microb. Cell Factories* **2013**, *12*, 112. Available online: <http://www.microbialcellfactories.com/content/12/1/112> (accessed on 15 September 2021). [[CrossRef](#)]
15. Drews, O.; Weiss, W.; Reil, G.; Parlar, H.; Wait, R.; Görg, A. High pressure effects step-wise altered protein expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Proteomics* **2002**, *2*, 765–774. [[CrossRef](#)]

16. Vogel, R.F.; Pavlovic, M.; Hörmann, S.; Ehrmann, M.A. High pressure-sensitive expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2005**, *38*, 1247–1252. [[CrossRef](#)]
17. Bucka-Kolendo, J.; Sokołowska, B.; Winiarczyk, S. Influence of High Hydrostatic Pressure on the Identification of *Lactobacillus* by MALDI-TOF MS-Preliminary Study. *Microorganisms* **2020**, *8*, 813. [[CrossRef](#)]
18. Zheng, Z.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C.M.A.P.; Harris, H.M.B.; Mattarelli, P.; O'Toole, P.W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; et al. 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 2782–2858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sliver, N.; Best, S.; Jiang, J.; Thein, S.L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* **2006**, *7*, 33. [[CrossRef](#)]
20. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **2001**, *25*, 4, 402–408. [[CrossRef](#)]
21. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D607–D613. [[CrossRef](#)]
22. Schumann, W. The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress Chaperones* **2003**, *8*, 207–217. [[CrossRef](#)]
23. Ricciardi, A.; Parente, E.; Guidone, A.; Ianniello, R.G.; Zotta, T.; Abu Sayem, S.M.; Varcamonti, M. Genotypic diversity of stress response in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus*. *Int. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 278–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Darsonval, M.; Julliat, F.; Msadek, T.; Alexandre, H.; Grandvalet, C. CtsR, the Master Regulator of Stress-Response in *Oenococcus oeni*, Is a Heat Sensor Interacting With ClpL1. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 3135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Li, J.S.; Bi, Y.T.; Dong, C.; Yang, J.F.; Liang, W.D. Transcriptome analysis of adaptive heat shock response of *Streptococcus thermophilus*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25777. [[CrossRef](#)]
26. Russo, P.; De la Luz Mohedano, M.; Capozzi, V.; De Palencia, P.F.; Lopez, P.; Spano, G.; Fiocco, D. Comparative Proteomic Analysis of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and Δ ctsR Mutant Strains Under Physiological and Heat Stress Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 10680–10696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Parente, E.; Ciocia, F.; Ricciardi, A.; Zotta, T.; Felis, G.E.; Torriani, S. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *144*, 270–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Castaldo, C.; Siciliano, R.A.; Muscariello, L.; Marasco, R.; Sacco, M. CcpA affects expression of the groESL and dnaK operons in *Lactobacillus plantarum*. *Microb. Cell Factories* **2006**, *5*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

PUBLIKACJA 5

Bucka-Kolendo Joanna, Sokołowska Barbara (2022)

Impact of High Hydrostatic Pressure (HHP) on the Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) of stress-related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* in the *Lactobacillus* strains.

Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, Vol. 14 No. 4:54-66,

DOI:10.15586/qas.v14i4.1132

Impact of high hydrostatic pressure on the single nucleotide polymorphism of stress-related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* in the *Lactobacillus* strains

Joanna Bucka-Kolendo^{1*}, Barbara Sokołowska^{2,3}

¹Department of Microbiology, Culture Collection of Industrial Microorganisms-Microbiological Resource Center, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, Warsaw, Poland;

²Department of Microbiology, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, Warsaw, Poland; ³Institute of High Pressure Physics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

*Corresponding Author: Joanna Bucka-Kolendo, Department of Microbiology, Culture Collection of Industrial Microorganisms-Microbiological Resource Center, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, Warsaw 02-532, Poland. Email: joanna.bucka@ibprs.pl

Received: 7 June 2022; Accepted: 18 August 2022; Published: 13 September 2022

© 2022 Codon Publications

OPEN ACCESS 

RESEARCH ARTICLE

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are widespread in environments and can either have a positive impact because their ability to survive in harsh conditions and influence the product (probiotic properties, change of structure-EPS [exopolysaccharides], etc.), or a negative impact, (so not needed) because of their spoilage ability (beer, juices). High hydrostatic pressure (HHP), one of the non-thermal preservation methods used in the food industry, can force the LAB to activate the adaptative mechanisms. Under pressurization, the changes in the bacteria cells can occur at the transcriptional or translational level. This study evaluated the HHP on the single nucleotide polymorphism (SNP) changes in three genes, *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA*, related to the stress-response mechanism in LAB. The correlation between the DNA polymorphism and the gene expression under HHP stress was assessed. The applied pressure of 300 MPa resulted in a low ratio of nonsynonymous substitutions to the synonymous substitutions (0 to 1.12), and a lower number of mutations was observed for pressurized strains (from 6 in *hrcA* to 11 in *dnaK*) than in controlled (from 3 in *ctsR* to 92 in *hrcA*). In all pressurized strains, the expression of genes was observed, whereas, in control strains, the gene expression was detected in three out of five strains. Although there was a noticeable change in stress-related gene expression after HHP, there was no correlation with SNPs. At the same time, with a high frequency of synonymous changes in nucleotide and high diversity for *hrcA* and *dnaK*, a very low diversity was found in *ctsR* sequences. The LAB strains stress response mechanisms are much more complex. The study requires information on the general mechanism and changes in the membranes' composition, proteome changes, and gene expression patterns. The mutations in genes related to stress can have important implications for the strains' fitness effect and adaptive ability of LAB strains, especially considering their food industry implication where the HHP techniques are used.

Keywords: high hydrostatic pressure; lactic acid bacteria; nonsynonymous mutation; single nucleotide polymorphism; stress response; synonymous mutation

Introduction

Several studies describe the lactic acid bacteria's (LAB) ability to survive and respond to various environmental stresses (Tsuda *et al.*, 2019; Bucka-Kolendo and Sokołowska, 2017) as they acquire preserving, probiotic,

or spoilage properties (Bangar *et al.*, 2022; Zapašnik *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2015). The most frequent phenotype described in the literature is the adapted cell (Papadimitriou *et al.*, 2016), while adaptation refers to the effort of the cell to resist and persist under stress. However, the stress response to environmental factors can

differ between species and depend on the applied stress (Mahmmodi *et al.*, 2021; Van de Guchte *et al.*, 2002). Extensive studies revealed the mechanisms involved in heat shock (De Angelis *et al.*, 2004), bile (Bron *et al.*, 2006), oxidative (Serrano *et al.*, 2007), pH, and ethanol (Parente *et al.*, 2010), where bacteria, through activation of the mechanisms involved in the stress response, adapt to the new conditions (Bucka-Kolendo and Sokołowska, 2017). Although the activated mechanisms may partially overlap, they are not identical (Papadimitriou *et al.*, 2016), which can cause opposed results in LAB species, at species or even sub-species level.

Furthermore, the combination of stresses can trigger a cross-protection response (Yang *et al.*, 2021b; Bucka-Kolendo and Sokołowska, 2017; Papadimitriou *et al.*, 2016; Van de Guchte *et al.*, 2002). The molecular mechanisms underlying the adaptation potential and response are based on the coordinated gene expression that can affect processes in cells, like cell division, transport, membrane composition, and DNA metabolism. Therefore, gene transcription, expression levels, and mechanisms engaged in bacteria growth under diverse stress conditions are greatly valued. *Lactobacillus* is a significant group of widespread organisms in different environments.

High hydrostatic pressure (HHP) is not a common stress factor for the LAB, as they are not generally exposed (Bucka-Kolendo and Sokołowska, 2017). However, HHP is a popular nonthermal preservation technique used in the food and beverage industry that reduces the number of microorganisms (Yaman *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2016) while preserving organoleptic molecules and providing “fresh” food. There is still limited knowledge about how LAB responds to the HHP, and its molecular mechanisms are not fully understood. HHP can negatively affect all molecular mechanisms in bacteria where DNA is involved, such as replication, transcription, and recombination (Salvador-Castell *et al.*, 2020). The interaction between DNA and proteins may be disturbed due to the changes in the electrostatic and hydrophobic interactions. Pressure can dissociate ribosomal subunits and disturb the cytoskeletal proteins, resulting in reversible morphological changes. Since some effects of different factors can be similar, it is assumed that the ability to react to HHP comes from the cross-protection system HHP due to the fluidity of a complex response mechanism. Membrane fluidity among the critical factors is responsible for bacteria’s survival and growth under high-pressure conditions (Molina-Hoppner *et al.*, 2003), where membrane lipids are stabilized by HHP and increase the melting points of lipids and transition the lipid bilayer to the gel state. Bacteria adapted to the HHP can adjust the phospholipid composition of the membrane by increasing the quantity of unsaturated fatty acids.

In bacteria, 90% of the genome represents genes; the rest contains small intergenic regions occupied by regulatory sites (Rocha, 2018). Genes are usually organized into operons and have only a few or no introns, and the insertions and deletions of genetic material tend to be determinants of gene expression (Rocha, 2018; Price *et al.*, 2006). Many phenotypic variations among species are assigned to single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Bailey *et al.*, 2021; Hunt *et al.*, 2009). Within the population, single base changes occur with a frequency greater than 1%. SNPs can be either synonymous (SS) when they do not cause changes in the amino acids (AA) or non-synonymous (NSS) when the AA structure is altered (Bailey *et al.*, 2021; Lebeuf-Taylor *et al.*, 2019; Hunt *et al.*, 2009). It has been demonstrated that mechanisms altering the proteins’ structure, function, and expression level by affecting mRNA splicing, stability, structure, and protein folding are now better understood (López-González *et al.*, 2018). NSS is more frequent and has a more substantial effect than SS mutations (Rocha, 2018). Since the effect is usually negative, those mutations are progressively removed from the population by the natural (purifying) selection, causing the low ratio of nonsynonymous (Ka) to synonymous (Ks) substitutions ($\omega = K_a/K_s$). At the same time, synonymous substitutions can also be influenced by purifying selection, especially in fast-growing bacteria (Rocha, 2018). Many experimental studies prove that SS mutations can have positive solid fitness effects and drive adaptive evolution (Bailey *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2019).

It is crucial to provide insight into the genomic dynamics and polymorphism that characterize the physiological state of cells after exposure to stress, such as HHP, and understand the relationship between gene functions and phenotypic characteristics. Five LAB strains (two *Loigolactobacillus backii*, two *Lactiplantibacillus plantarum*, and one *Lacticaseibacillus rhamnosus*) were used. Strains were previously identified and analyzed (Bucka-Kolendo *et al.*, 2020, 2021). This work described the proteomic and transcriptomic changes in selected *Lactobacillus* treated with HHP to determine the general adaptive response resulting from pressurization. As in previous studies, the HHP affects the proteome of treated LAB strains causing differences in the mass spectra profiles analyzed with MALDI-TOF MS (Bucka-Kolendo *et al.*, 2020). Pressurization of the LAB strains can lead to changes in the expression patterns of stress-related genes (Bucka Kolendo *et al.*, 2021). Among many functional genes associated with adaptation in LAB (Bucka-Kolendo *et al.*, 2017), the three genes (*dnaK*, *hrcA*, and *ctsR*) previously described in the literature as stress-related (Bucka-Kolendo *et al.*, 2017), were selected. The genes, like *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR*, involved in the stress response (Bucka-Kolendo *et al.*, 2021) can have different expressions under the stress factor, resulting in changes in the phenotype.

The aim was to relate the effect of the HHP on strains' fitness through the changes in those gene expressions using SNP analysis of the partially sequenced genes. The hypothesis was that differences due to HHP might contribute to the bacteria in their gene mutations associated with the stress response and be elucidated with the genes' phylogenetic clusters. The phenotypic and phylogenetic characterization of the LAB strains allows rising new insights into the adaptive abilities under the HHP. The fitness changes of the cellular response to stress factors can give an understanding of the individual strains' responses to different factors (Douillard *et al.*, 2016). As LAB are essential probiotics, starter, commensal, and pathogenic microorganisms, the in-depth research about the physiology of LAB stress has a significant meaning.

Materials and Methods

Schematic overview of the experiment

The schematic workflow of the study is presented in Figure 1. The diagram shows the overall process for the observation of the changes in the nucleotide sequences in the stress-related genes *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* under the HHP 300 MPa/5'. LAB strains were screened for possible adjustments to the changing environment. The first step was the isolation of strains from spoiled food products and the identification of the bacteria. The second step consists of applying HHP, molecular analysis with stress-related gene sequencing and expression, and growth analysis. The final step include the statistical

and analytical analysis of SNP, phylogenesis, and PPI (protein-protein interaction).

Lactic acid bacteria

Five LAB strains (KKP 3565 *Loigolactobacillus backii*, KKP 3566 *Loigolactobacillus backii*, KKP 3568 *Lactiplantibacillus plantarum*, KKP 3569 *Lactiplantibacillus plantarum*, and KKP 3570 *Lacticaseibacillus rhamnosus*) were isolated from the food products, beer, tomato juice, and bread, and the process was performed according to the ISO 15214:2000 as described by Bucka-Kolendo *et al.* (2021). In addition, bacteria were identified using genetic and proteomic methods, as defined by Bucka-Kolendo *et al.* (2020, 2021). The isolated strains were deposited in the Culture Collection of Industrial Microorganisms-Microbiological Resource Center (IAFB, Warsaw, Poland), supported by the European Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 871129-IS_MIRRI21 Project. Strains were given the collection numbers, and the 16S rDNA sequences of each strain were deposited in the GenBank NCBI database (Table 1).

Bacteria growth conditions and count number analysis (PCA)

LAB were grown and incubated under anaerobic conditions at 30°C for 48–72 h on MRS agar (*Lactobacillus* Agar DeMan, Rogosa, and Sharpe, Merc KGaA, Darmstadt, Germany), as described by Bucka-Kolendo *et al.* (2021). For counting, plates containing less than 300 CFU/mL were selected according to ISO 4833-1:2013. The non-treated LAB were considered control strains.

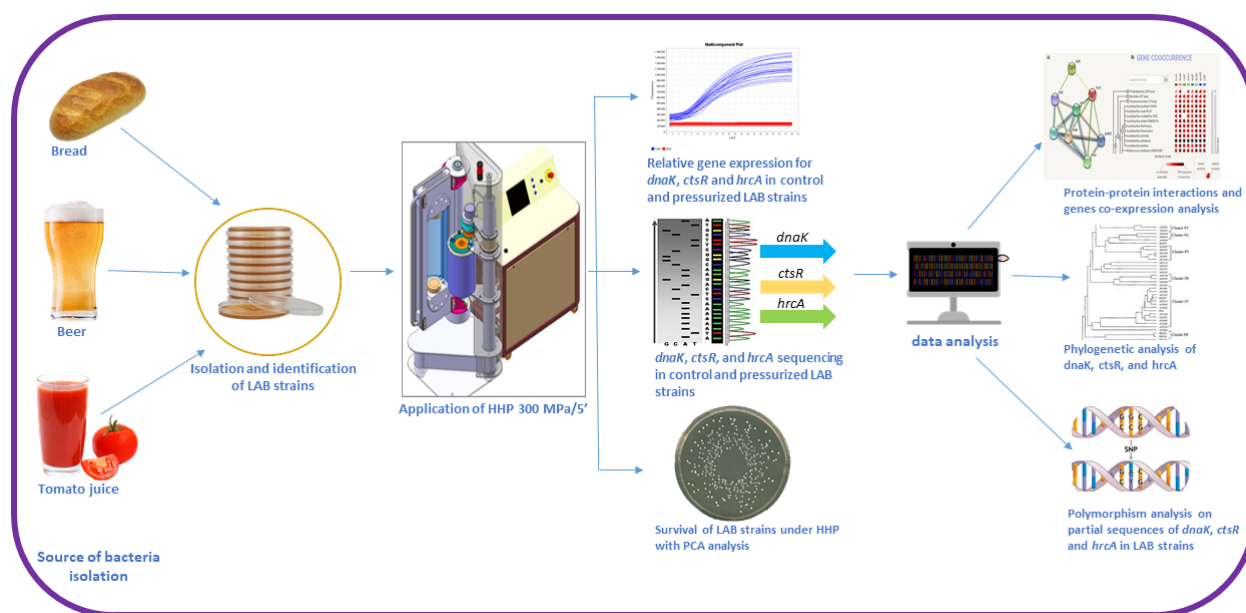


Figure 1. A schematic flow chart of the experimental design used to establish and monitor the SNP in stress-related genes *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA*. SNP, single nucleotide polymorphism.

Table 1. Isolated strains of lactic acid bacteria.

Strain	GenBank accessions	Origin	Identification based on 16S rDNA	New nomenclature
KKP 3565	OK2913330	Beer	<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Loigolactobacillus backii</i>
KKP 3566	OK287375	Beer	<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Loigolactobacillus backii</i>
KKP 3568	OK291331	Bread	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
KKP 3569	OK297672	Tomato juice	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
KKP 3570	OK297673	Tomato juice	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>

Immediately after HHP processing, the viability of the LAB strains was evaluated by counting colony-forming units on MRS Agar. The difference between control and treated strains was counted based on the number of surviving bacteria. The analysis was performed in two replicates.

Application of HHP

Using U 4000/65 apparatus (Unipress, Warsaw, Poland), the stationary phase LAB were threatened with HHP, as mentioned previously by Bucka-Kolendo *et al.* (2020). Therefore, exposition to 300 MPa for 5 min was chosen based on the former analyses (data not shown). At the HHP higher than 300 MPa, a significant reduction of live cells was observed, and at lower HHP, there were no significant differences from the controls. Hence, the used parameters were selected to observe possible cell changes but did not cause the bacteria's death.

The HHP chamber details were as follows: the 0.96 L working volume, 600 MPa of maximum working pressure, from -10°C to $+80^{\circ}\text{C}$ working temperature, and the pressure-transmitting fluid was (1:1, v/v) water-polypropylene glycol. The time needed to generate the 300 MPa pressure was 70–80 s, with a release time of 2–4 s. The pressurization times did not include the come-up and come-down times. The assays were performed under two independent processes, and unpressurized strains were used as a control.

DNA extraction

According to the instructions, DNA from the stationary phase of control and HHP-treated bacterial culture (1.5 mL) was extracted with the ExtractMe DNA Bacteria Kit (Blirt S.A.–DNA, Gdansk, Poland) as mentioned by Bucka-Kolendo *et al.* (2020). The quality and concentration of the obtained DNA were measured at the absorbance of 260 nm and the 260/280 nm ratio with a UV-Vis NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The isolated DNA was stored at -20°C .

PCR amplification

PCR amplification of *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* sequences was performed using specific primers (Table 2). For *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA*, a total PCR volume of 60 μL contained: 30 μL

Table 2. Primers designed to amplify the *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* genes' sequences.

Primers	Sequence	Gene size (bp)
<i>dnaK</i>	F: 5'- CGGTAGCGGTTCTTGAAGGT -3' R: 5'- GCCTTTTCAACCGTGTCACC -3	295 bp
<i>ctsR</i>	F: 5'- CGGACTCGGAGCATGTTGAA -3 R: 5'- GTATGAGGGCGTCCAACACA -3	204 bp
<i>hrcA</i>	F: 5'- TCCGAGCGCTTCTATGTTGG -3 R: 5'- ACCCATCAGCCCAATCATCC -3	297 bp

of Dream Taq PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1 μL of each primer in the final concentration of 0.4 μM , and 10–20 ng of DNA. A peqSTAR 2X thermocycler (PeqLab, Germany) was used for the amplification run. PCR amplification was performed as described by Riccardi *et al.* (2012), with modifications. Reactions conditions were: initiating denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 60 s, annealing at 58°C for 60 s (for *dnaK* and *hrcA*), annealing at 57°C for 60 s (for *ctsR*), and elongation at 72°C for 90 s, with final elongation at 72°C for 2 min.

Electrophoresis in 1.5% (w/v) gel agarose was performed to analyze the PCR product size, and BioImaging Systems 06-2d.1-G: BOX (Syngen, UK) was used to visualize the product. Sequencing of the PCR products was performed in the 96-capillary 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems–Life Technologies), and the obtained sequences were analyzed in NCBI BLAST databases. The obtained sequences were used to evaluate the DNA polymorphism, and the results are shown in Tables 3–5, respectively.

Bacterial mRNA extraction and RT-qPCR analysis

The total mRNA extraction and relative gene expression analysis were performed according to Bucka-Kolendo *et al.* (2021). The custom TaqMan gene expression assays (ThermoFisher Scientific, TFS) were used for *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA*. The relative expression levels of analyzed genes were standardized to an endogenous control *16S* rRNA gene. Endogenous control's stability was evaluated for control and pressurized LAB using the ΔCT algorithm. For relative expression ratios in target genes, the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method was used. The analysis was performed as the mean of the two independent experiments.

Table 3. Polymorphism analysis on partial sequences of *dnaK* in LAB strains. Sites excluding gaps or missing data are shown in parentheses.

Strain	Sites	π	S	k	H	G+C%	SS	NSS	ω	F
KKP 3565	239	0.05439	13	10	2	46.2	55.42	175.58	2.678	\wedge 1.8 fold
KKP 3566	271 (271)	0.03321	9	9	2	46.5	54.75	215.25	0.505	\wedge 1 fold
KKP 3568	291 (270)	0.02222	6	6	2	47	66.25	203.72	0	\wedge 1.3 fold
KKP 3569	290 (270)	0.02222	6	5	2	47.1	62.83	204.17	0	\vee 1.8 fold
KKP 3570	290 (270)	0.02593	7	9	2	47.8	63.33	206.67	0.727	\wedge 0.8 fold
Total control strains	267 (260)	0.06077	32	15.8	5	46.7	49.87	199.13	0.956	–
Total HHP strains	294 (268)	0.01642	9	4.4	5	46.4	63.83	197.17	0.972	–

LAB, Lactic acid bacteria; HHP, high hydrostatic pressure; π , nucleotide diversity; S, number of polymorphism sites; k, the average number of nucleotide differences; H, number of Haplotypes; SS, synonymous sites; NSS, nonsynonymous sites; ω , Ka/Ks ratio of nonsynonymous substitutions to the synonymous substitutions; F, fitness effect (where \wedge overexpression, \vee is underexpression).

Table 4. Polymorphism analysis on partial sequences of *ctsR* in LAB strains. Sites excluding gaps or missing data are shown in parentheses.

Strain	Sites	π	S	k	H	G+C%	SS	NSS	ω	F
KKP 3565	177 (167)	0	1	1	1	42.5	32.67	132.33	0	\wedge 1.27 fold
KKP 3566	179 (179)	0.01676	3	2	2	43.3	39.83	137.17	0.576	\wedge 0.8 fold
KKP 3568	176	0.02273	4	4	2	42.9	40.08	133.92	0.894	\wedge 0.73 fold
KKP 3569	175	0.01714	3	2	2	43.7	34.33	139.67	0	\vee 1.16 fold
KKP 3570	172	0.01744	3	3	2	43.0	41.50	129.50	0.636	\wedge 0.74 fold
Total control strains	178 (171)	0.02515	8	4.3	5	42.4	32.33	132.67	0.971	–
Total HHP strains	178 (171)	0.00936	3	1.6	5	43.2	31.27	130.73	0	–

LAB, Lactic acid bacteria; HHP, high hydrostatic pressure; π , nucleotide diversity; S, number of polymorphism sites; k, the average number of nucleotide differences; H, number of Haplotypes; SS, synonymous sites; NSS, nonsynonymous sites; ω , Ka/Ks ratio of nonsynonymous substitutions to the synonymous substitutions; F, fitness effect (where \wedge overexpression, \vee is underexpression).

Table 5. Polymorphism analysis on partial sequences of *hrcA* in LAB strains. Sites excluding gaps or missing data are shown in parentheses.

Strain	Sites	π	S	k	H	G+C%	SS	NSS	ω	F
KKP 3565	616 (281)	0.334	94	105	2	45.6	57.75	194.25	1.168	\wedge 1.65 fold
KKP 3566	606 (260)	0.33846	88	87	2	48.8	56.67	171.33	0.731	\wedge 0.77 fold
KKP 3568	299 (261)	0	0	0	1	49.0	62.17	192.83	0	\vee 0.21 fold
KKP 3569	294 (270)	0.02963	8	9	2	48.5	65.33	204.67	2.587	\vee 3.22 fold
KKP 3570	289 (268)	0.01119	3	3	2	48.7	65.33	201.67	0	\wedge 0.53 fold
Total control strains	607 (252)	0.2143	92	54	4	46	48.97	161.03	1.173	–
Total HHP strains	293 (265)	0.00868	6	2.3	5	49.1	63.67	197.33	0.1588	–

LAB, Lactic acid bacteria; HHP, high hydrostatic pressure; π , nucleotide diversity; S, number of polymorphism sites; k, the average number of nucleotide differences; H, number of Haplotypes; SS, synonymous sites; NSS, nonsynonymous sites; ω , Ka/Ks ratio of nonsynonymous substitutions to the synonymous substitutions; F, fitness effect (where \wedge overexpression, \vee is underexpression).

Statistical data analysis

The sequences of each gene (*dnaK*, *hrcA*, *ctsR*) of each strain (control and pressurized) were trimmed, aligned, and analyzed. Multisequences' alignment and phylogenetic analyses were performed using MEGA v. X (Kumar *et al.*, 2016). Phylogenetic trees were created with the neighbor-joining evolution method based on sequences of 3 stress-related genes in control and pressurized strains.

Evaluation of the number of polymorphic sites (S), nucleotide diversity (π) of the strains of variant obtained for control and HHP conditions, and the ratio of the nonsynonymous (Ks) to synonymous (Ka) mutations (ω) were calculated with the Dna SP. 5.1 (Rozas *et al.*, 2017).

To evaluate known and predicted interactions between *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* proteins in *Lactobacillus*, the PPI

network was created with the STRING database (stringdb.org) (Szkłarczyk *et al.*, 2019). The PPI provided a new possibility for revealing molecular mechanisms.

Results

The DNA polymorphism analysis was performed to obtain preliminary insight into the effect of the HHP on the LAB and identify single mutations in stress-related *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA*, (Tables 3–5, respectively). The gene sequences had a G+C% content of 46.5–47.8% (*dnaK*), 42.5–43.7% (*ctsR*), 45.6–49% (*hrcA*). The rate of K_a to the rate of K_s was calculated to determine the evolutionary pressure on protein-coding sequences. The K_a/K_s ratios (ω) for total control populations and total HHP treated vary between 0 and 1.12, with the number of mutations lower for pressurized strains (from 6 (*hrcA*) to 11 (*dnaK*)) than controlled (from 3 (*ctsR*) to 92 (*hrcA*)). ω ratios on the strains level were 0 to 2.678, where most were 0 or close to 1, suggesting little differences between synonymous and nonsynonymous mutations. DNA polymorphism analysis of bacteria under HHP suggests that strains are under neutral purifying selection pressure and acts on the genes in most cases. In all pressurized strains,

the expression of genes was observed (Figures 2–4 respectively, for *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA*), whereas, in control strains, the gene expression was detected in three of five strains. In most LAB, the SNPs do not significantly change gene expression or gene product function. Considering that all strains survived the pressurization (Bucka-Kolendo *et al.*, 2021), it was assumed that although a low SNP level occurred in the genes, bacteria gained adaptive ability. However, defining the correlation between gene expression changes and the SS mutations' fitness mutations was impossible. The expression levels for *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* under the 300 MPa/5' did not correlate with the SNPs in those genes.

PCA analysis

Our experiment showed that the pressurization in 300 MPa/5' significantly affected the cell's survival ($P < 0.05$). For strain KKP 3570 *Lacticaseibacillus rhamnosus*, the decrease level was 2 log (CFU/mL). For other strains, the reduction was around 1 log (CFU/mL) (Figure 5).

Phylogenetic analysis of *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA*

Maximum likelihood clustering of aligned sequences of each gene was performed to assess the changes in

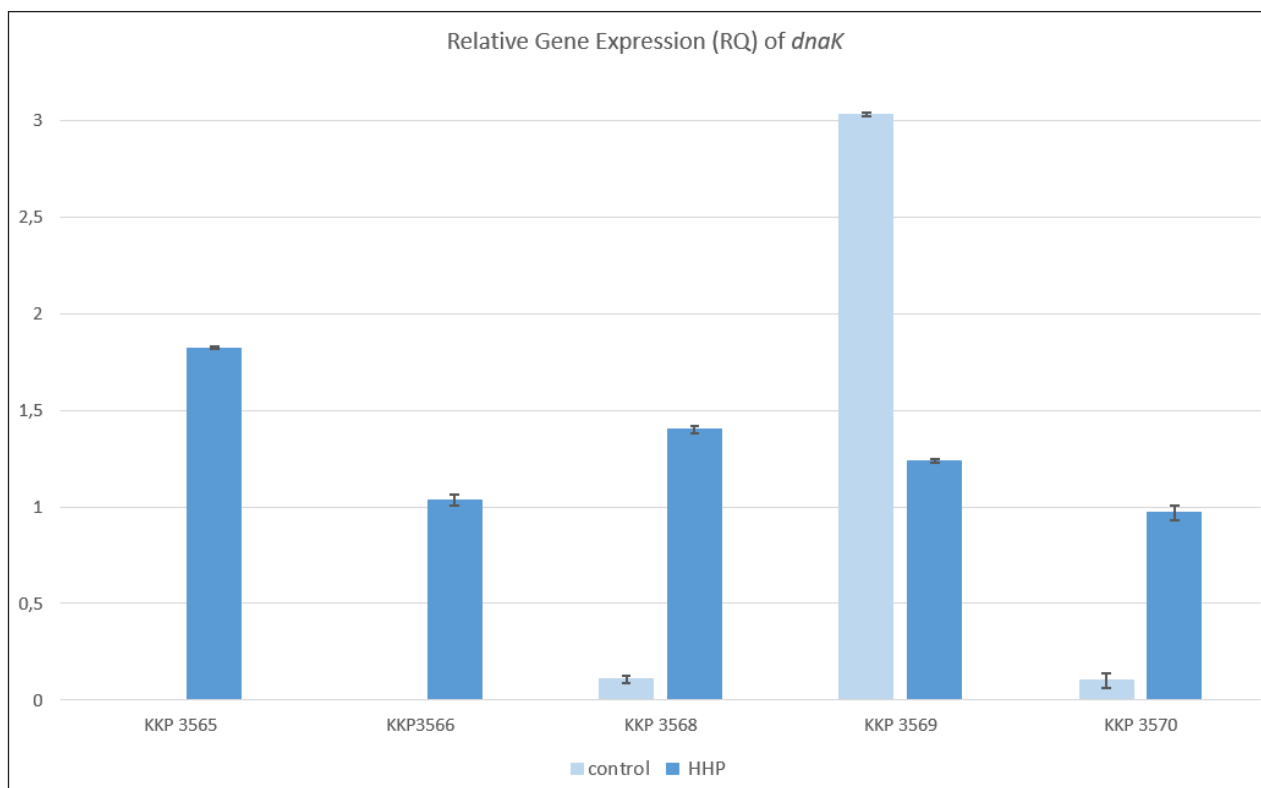


Figure 2. RT-qPCR analysis of *dnaK* in control and pressurized (300 Mpa/5') LAB strains. Data are the mean of the two independent experiments. The standard deviations are indicated with vertical bars. * Statistically significant differences were estimated using student's t-test ($P < 0.05$). LAB, Lactic acid bacteria.

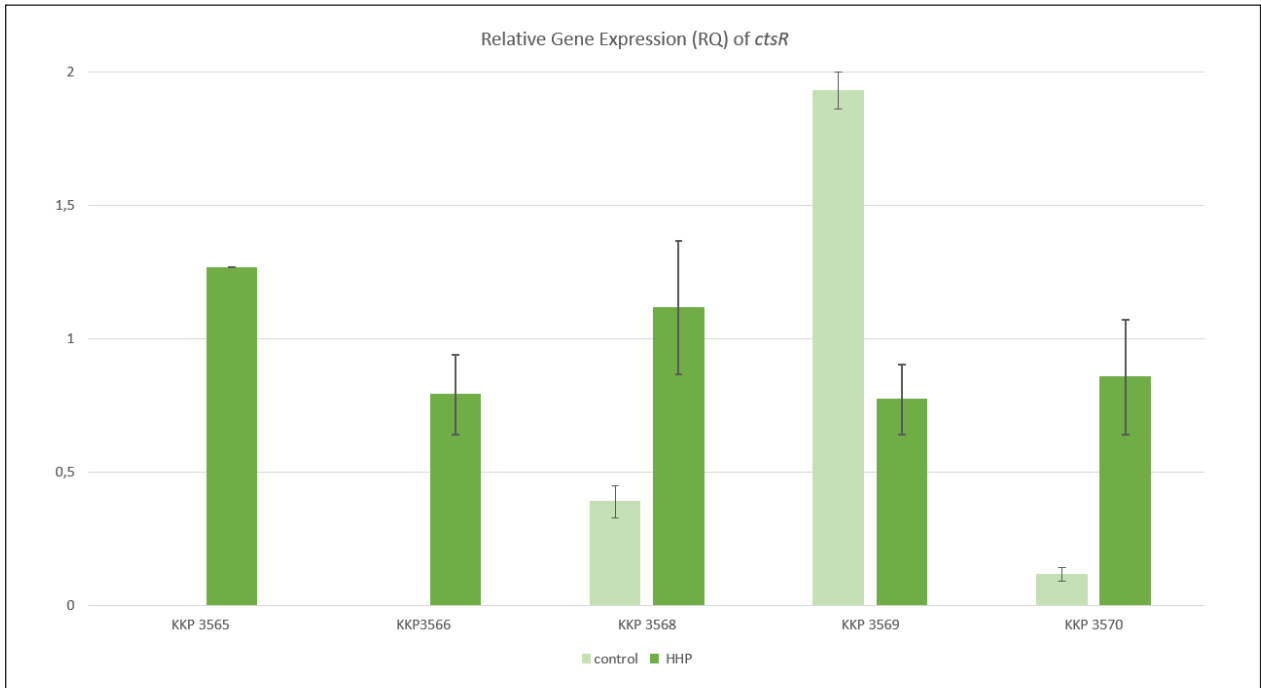


Figure 3. RT-qPCR analysis of *ctsR* in control and pressurized (300 Mpa/5') LAB strains. Data are the mean of the two independent experiments. The standard deviations are indicated with vertical bars. * Statistically significant differences were estimated using student's t-test ($P < 0.05$). LAB, Lactic acid bacteria.

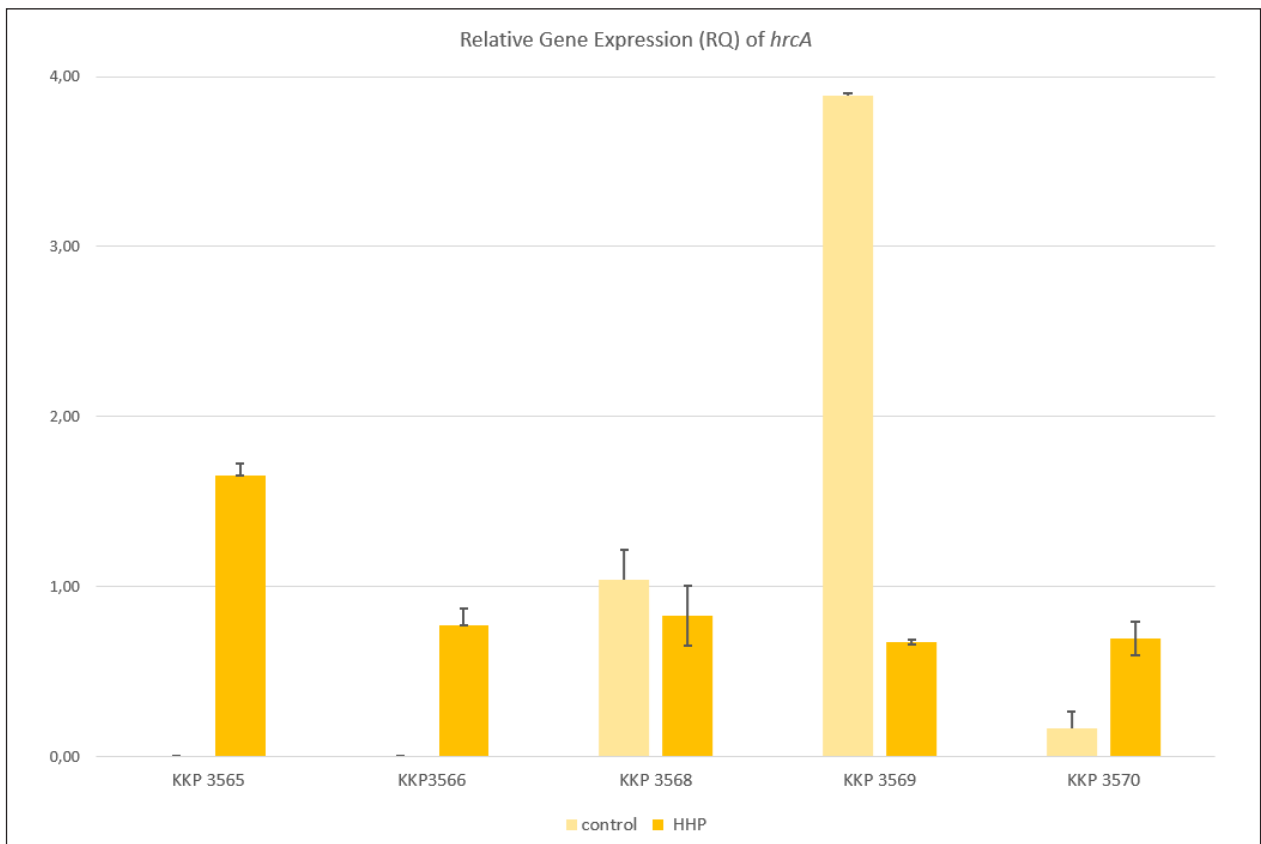


Figure 4. RT-qPCR analysis of *hcrA* in control and pressurized (300 Mpa/5') LAB strains. Data are the mean of the two independent experiments. The standard deviations are indicated with vertical bars. * Statistically significant differences were estimated using student's t-test ($P < 0.05$). LAB, Lactic acid bacteria.

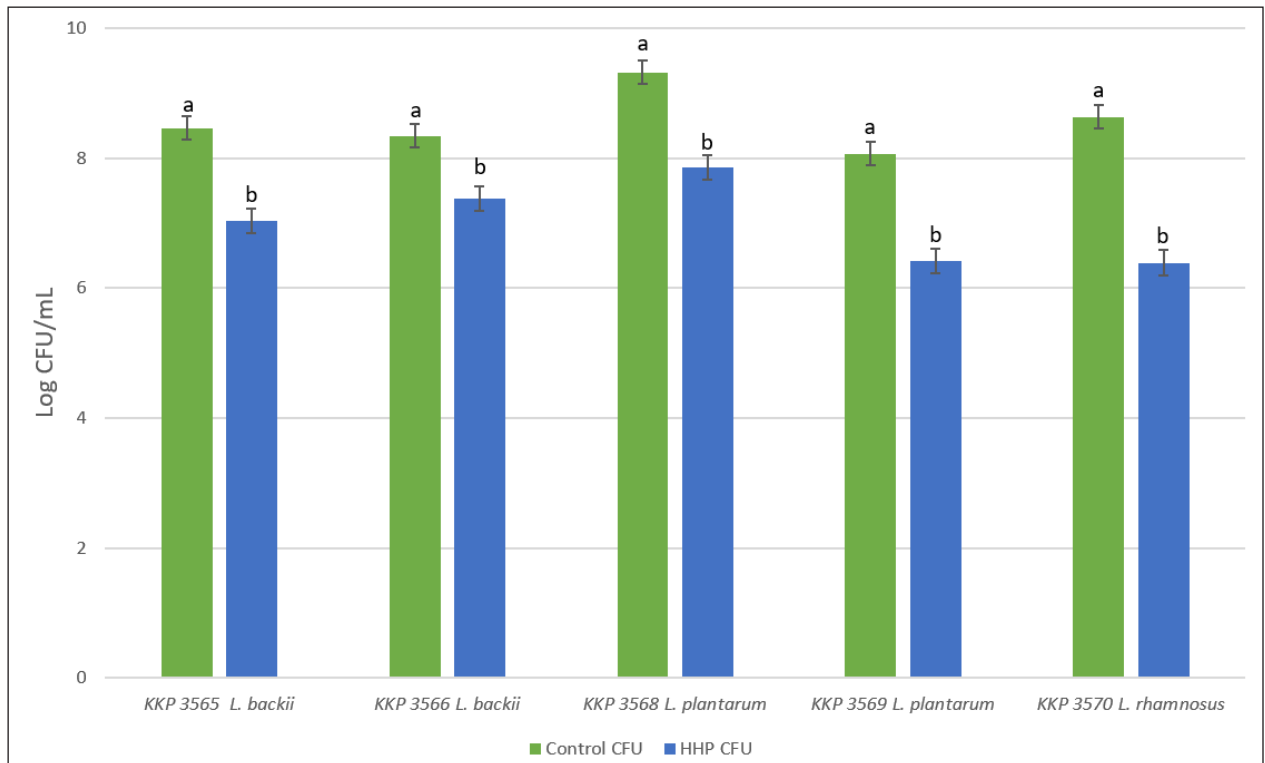


Figure 5. Survival of LAB strains under HHP. Data are shown as the mean of the two independent experiments. Vertical bars indicate the standard deviations (a) control strain and (b) pressurized strain. Different letters over the bars are significantly different ($P < 0.05$). LAB, Lactic acid bacteria; HHP, high hydrostatic pressure.

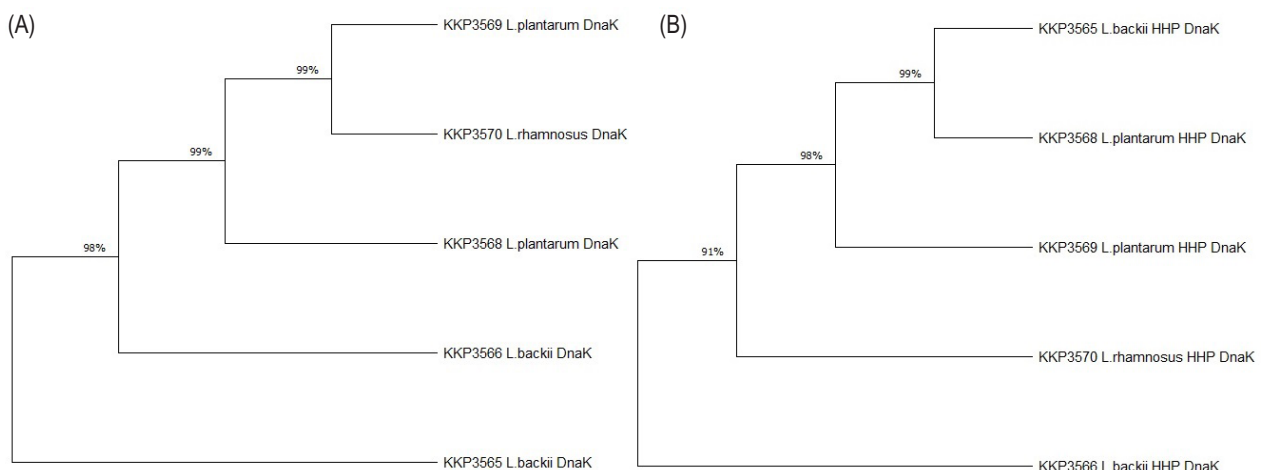


Figure 6. Phylogenetic trees of *dnaK* sequences in studied *Lactobacillus*. The evolutionary distances were computed with the neighbor-joining method. The trees are drawn to scale, where the branch lengths are evaluated in the number of substitutions per site. (A) control strains and (B) pressurized strains. The trees were obtained using the MEGAX software (Kumar et al., 2016).

the relationship of genes across LAB for controlled and HHP treated strains. Alignment was performed using CLUSTAL W, and results for unrooted neighbor-joining phylogenetic trees are shown in Figures 6–8 for *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA*, respectively. In addition, control and pressured strains were compared for each gene to express whether mutations were reflected in the phylogeny.

All three genes were examined to display the discriminatory power and reproducibility in studied lactobacilli strains. For *ctsR*, the similarity was at 97% that mirrored in the trees' topology of controlled and HHP-treated strains. For *dnaK* sequences obtained, there was a high level of resemblance at 98% for controlled and 91% for pressurized strains. The strains grouped based on *hrcA* sequences showed the highest differentiation, wherein control strains

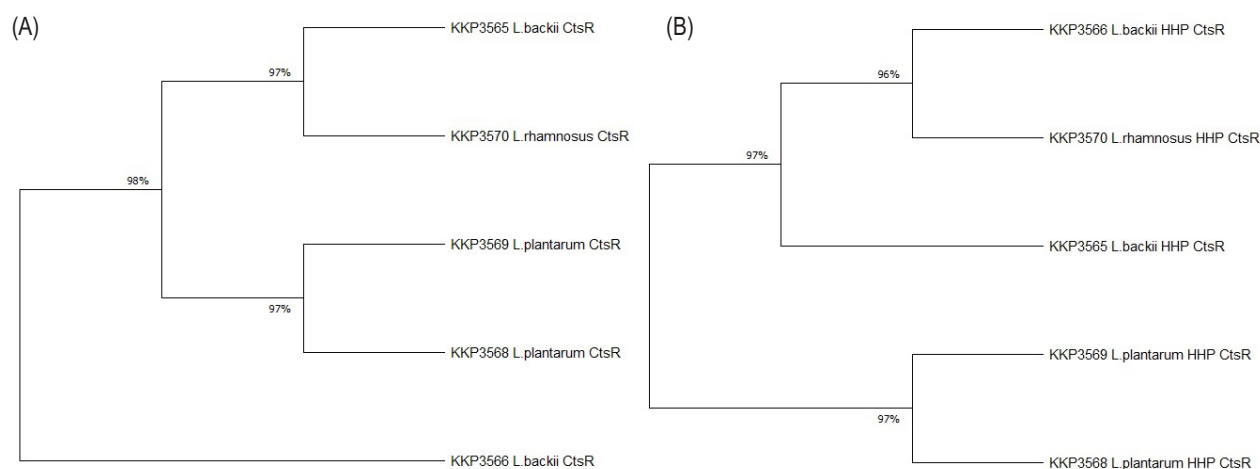


Figure 7. Phylogenetic trees of *ctsR* sequences in studied *Lactobacillus*. The evolutionary distances were computed with the neighbor-joining method. The trees are drawn to scale, where the branch lengths are evaluated in the number of substitutions per site. (A) control strains and (B) pressurized strains. The trees were obtained using the MEGAX software (Kumar et al., 2016).

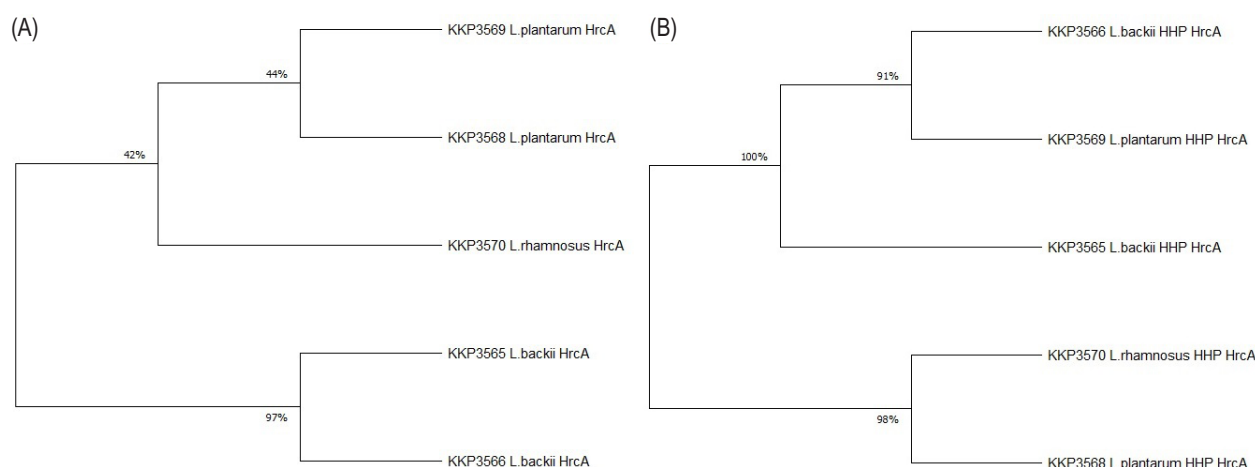


Figure 8. Phylogenetic trees of *hrcA* sequences in studied *Lactobacillus*. The evolutionary distances were computed with the neighbor-joining method. The trees are drawn to scale, where the branch lengths are evaluated in the number of substitutions per site. (A) control strains and (B) pressurized strains. The trees were obtained using the MEGAX software (Kumar et al., 2016).

L. backii KKP 3565 and KKP 3566 had 97% and were more distantly related (42%) to other studied strains. The *hrcA* sequences of strains after pressurization were highly related and had a 100% level of similarity. There was no correlation between the expression pattern and clustering of the strains based on the SNP sequences analysis, resulting from the small number of bacteria used or the complexity of the stress-response mechanisms in LAB. Phylogenetic trees of all three genes (*dnaK*, *ctsR*, *hrcA*) revealed a high degree of relatedness between LAB strains.

Protein-protein interactions and genes co-expression analysis

To forecast the network of PPI, the Search Tool for the Retrieval of Instances of Neighbouring Genes—STRING

database was used (Szklarczyk *et al.*, 2019). The PPI network is valuable for describing the molecular processes, and atypical PPI can be related to the many stress response changes. Therefore, genes with a high degree of connectedness were clustered into PPI based on the highest confidence of 0.9 and a maximum number of interactions ≤ 5 . The study used a k-means clustering method with an average local grouping coefficient of 0.696. As a result, the network found three clusters containing eight nodes with an average node degree of 5.

Also, the co-expression analysis of the studied genes was performed with STRING (Figure 9). Results indicate the strength of data shown in experiments, describing the correlation of expression between two coding protein genes based on the patterns of RNA expression and protein coregulation. The PPI network analysis can give a

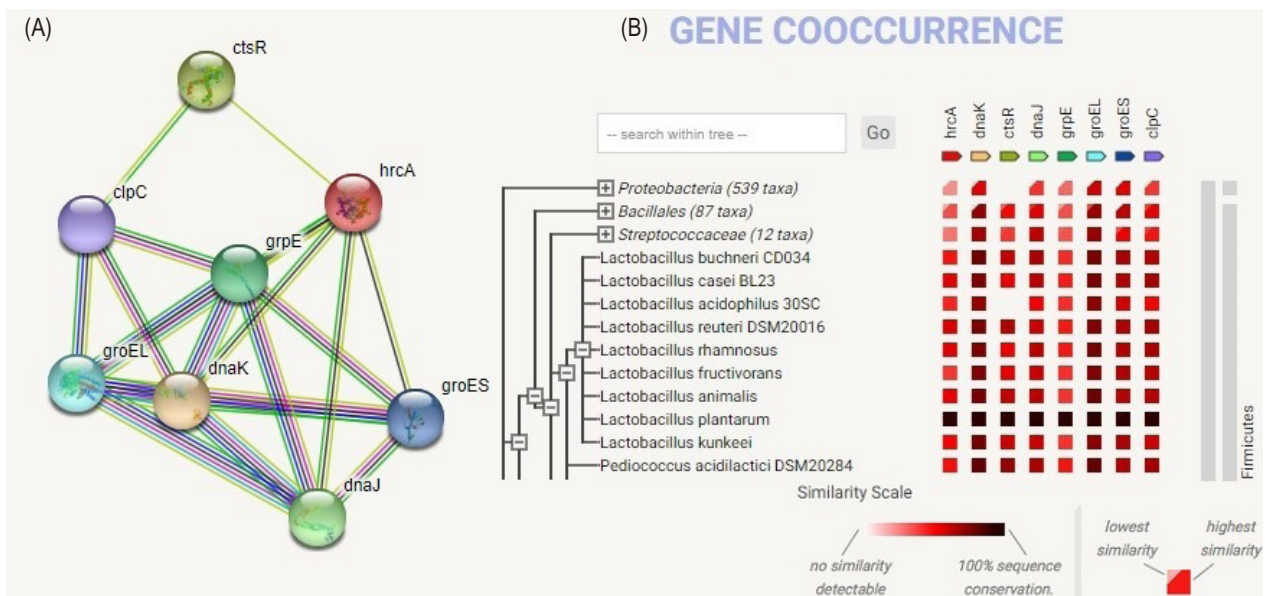


Figure 9. Protein-protein interactions (PPI) networks analysis. (A) PPI network of *dnaK*, *ctsR*, *hrcA* protein cluster in *Lactobacillus* generated with STRING and (B) the similarities which target families occur patterns across genomes. The color intensity correlates with confidence in the expected functional interaction between genes and organisms.

network of molecular interactions formed between the protein products of the studied genes. As presented in Figure 9A, among studied genes, the highest degree of centrality had gene *dnaK*, indicating the importance of those proteins in the resulting PPI network. Figure 9B shows the functional relationship retrieved for genes belonging to the network, where the color indicates the similarity that correlates with the presence/absence of the interactions. The analysis suggests that the proteins can be biologically linked and interact more than expected (20 edges compared to 5 estimated).

Discussion

The present study investigated the polymorphism in three genes (*dnaK*, *ctsR*, *hrcA*) related to the HHP stress response in five LAB strains. The number of SNPs in our studies was low and did not display one specific outline of the tested conditions. Although SNPs and mutation rates of all three genes were comparable in all strains, it was observed that HHP triggered a strong response in LAB strains and induced stress-related genes expression (Figures 2–4), which can determine the HHP as a potent stress factor of those genes. Furthermore, our results showed the highest nucleotide diversity in the *hrcA* sequences (Table 5). However, we did not find significant diversity between control and pressurized LAB strains in *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* sequences (Tables 3–5, respectively).

Overall, the LAB strains adapt to the given pressure, as their decrease level was 2 log (CFU/mL) (Figure 5).

Comparing the control with the pressurized strains, the impact of the HHP on the LAB strains based on the K_a/K_s ratio displays a low value. This suggests that NSS mutations have a small negative effect on fitness and can stay in the population long before being removed by natural selection. The diversity of the *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* sequences indicates small changes between studied LAB strains, which shows that strains were protected from functional mutations, or mutations that have occurred were almost neutral. These findings are in line with the reports of other authors (Bailey *et al.*, 2014, 2021; Rocha, 2018). An observed high rate of nonsynonymous mutations suggests that adaptive selection favors different protein sequences depending on environmental changes. They can alert the function of the genes. Our studies indicate that the expression of the genes can be the defense mechanism of strains against HHP. However, among genes, *dnaK*, *ctsR*, and *hrcA* expression does not seem to play a significant role in stand bias and demonstrates genomic plasticity. As Bailey *et al.* (2014) noticed, the mutations indicate increased gene expression. However, in the less-performed codons, the molecular mechanisms are responsible for transcript regulation and are very important in LAB's adaptation and evolutionary dynamics. The fitness effect of a SS mutation is not always due to the impact on the gene in which it occurs but rather through the changes in gene expression which has been studied in our previous work (Bucka-Kolendo *et al.*, 2021).

Little is known regarding the fitness effect of these mutations and how they rely on stress-related factors like HHP.

The changes in the environment, such as pressurization, may trigger the activation of adaptive mechanisms and thus maintain changes in the genome, proteome, transcriptome, or metabolome, leading to cell damage and death. Studies (Jeon *et al.*, 2021) on SNPs related to cell wall synthesis in *L. acidophilus* under high temperatures suggested that changes in SNP can make the cell wall more rigid. Mutations that appear under natural selection increase the possibility of fixation and may often be adaptive. The cell morphology and division can be affected by HHP and impact the cytoskeleton and autolytic proteins (Molina-Hoppner *et al.*, 2003). As Yang *et al.* (2021a) noticed, after the HHP treatment of 300–400 MPa, *L. plantarum* and *L. curvatus* acquire higher cell integrity, smoother cell surface, and uniformed protoplasm. These findings suggest that bacteria can increase their HHP resistance by modifying their structures.

The stress factor, like HHP, may impact the discriminatory power of the studied genes' sequences. Thus, comparing the DNA polymorphism changes in stress-related genes with the phylogenetic trees assembled is required and can give a comprehensive understanding of the relationship between functional genes and phenotypic characteristics. The phylogenetic trees are highly valued tools that demonstrate the diversity of bacterial strains to develop more effective methods for their identification, prediction of gene functions, and underpin genetic research. The phylogenetic analysis of the unrooted trees demonstrates the relative relationship between strains and the impact of the HHP. Based on the maximum likelihood of aligned sequences (*dnaK* [Figure 6], *ctsR* [Figure 7], and *hrcA* [Figure 8]), the clustering did not reflect the phylogenetic relationships. It did not allow the separation into different clusters for studied LAB species. All strains had a high similarity. The PPI network (Figure 9) showed an insight into the molecular processes, and the functional relationship retrieved for the genes belonging to the network suggests that the proteins interactions can be biologically linked more than expected, and the whole process is more complicated. Although the studies showed significantly higher diversity of the *hrcA* sequences, it did not correspond with strain classification and their phylogenetical clustering. The highest diversity was obtained for the *hrcA* gene in control strains. Our studies confirmed the results of Guidone *et al.* (2015), on the alignment of the *ctsR* sequences, marking the gene's taxonomic value for LAB classification. However, our results disagree with their results and that classification of the LAB species based on the *hrcA* gene sequence is a good taxonomic marker, as the *hrcA* sequences after pressurization had a 100% level of similarity. Contrary to the studies presented by Huang and Lee (2011), the *dnaK* gene is much more polymorphic than the housekeeping gene *16S* rRNA in the LAB group and therefore has a discriminatory value in closely related species. Where

Sharma *et al.* (2019), indicated in their research that, among other genes, *dnaK* showed no SNP while tracking in yogurt and probiotic powder, which confirmed the results of our work, where *dnaK* was characterized by low diversity.

Our current work, together with previous studies on proteome changes under HHP (Bucka-Kolendo *et al.*, 2020), and changes in gene expression under HHP in LAB (Bucka-Kolendo *et al.*, 2021), gives a more in-depth insight into the selected LAB strains stress response to HHP. Our findings are significant to the technological implications of LAB resistance to the food industry, host survival (in the case of probiotics), and bacteria stress behavior, where a complex regulatory network of genes regulates the bacteria's response to HHP during food processing. Further studies on transcriptome and proteome are needed to confirm this hypothesis.

Additional studies on the larger group of *Lactobacillus* strains are needed to examine the impact of the HHP on the stress response mechanisms of those bacteria and how the HHP can contribute to the mutations in stress-related genes. As the mutations, particularly in the promoter region of the genes related to the stress, can have important implications for the fitness effect and the adaptive ability of the strains. The performance of the whole genome sequences (WGS) to determine the evolution of LAB genomes under HHP treatment would help to obtain knowledge of the bacteria with higher flexibility under stress conditions. With WGS methods, more insights can be gained, as it combines the determination of the strain's similarities based on SNP and gene-by-gene approach. Thus, considering how the mutation impacts the whole strain, additional studies that affect other neighbor genes, especially those grouped in the operons and transcribed together (like *dnaK* and *hrcA*), can help understand SNP mechanisms adaptive evolution better.

References

- Bailey, S.F., Angela, L., Morales, A. and Kassen, R., 2021. Effects of synonymous mutations beyond codon bias: the evidence for adaptive synonymous substitutions from microbial evolution experiments. *Genome Biology and Evolution* 13(9): evab141. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab141>
- Bailey, S.F., Hinz, A. and Kassen, R., 2014. Adaptive synonymous mutations in an experimentally evolved *Pseudomonas fluorescens* population. *Nature Communications* 10(5): 4076. <https://doi.org/10.1038/ncomms5076>
- Bangar, S.P., Sharma, N., Bhardwaj, A. and Phimolsiripol, Y., 2022. Lactic acid bacteria: a bio-green preservative against mycotoxins for food safety and shelf-life extension. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 14(2): 13–31. <https://doi.org/10.15586/qas.v14i2.1014>

- Bron, P.A., Molenaar, D., de Vos, W.M. and Kleerebezem, M., 2006. DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* 100: 728–738. <https://doi.org/10.4161/jbug.2.2.13910>
- Bucka-Kolendo, J., Juszczuk-Kubiak, E. and Sokołowska, B., 2021. Effect of high hydrostatic pressure on stress-related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* expression patterns in selected *Lactobacilli* Strains. *Genes* 12: 1720. <https://doi.org/10.3390/genes12111720>
- Bucka-Kolendo, J. and Sokołowska, B., 2017. Lactic acid bacteria stress response to preservation processes in the beverage and juice industry. *Acta Biochimica Polonica* 64: 459–464. https://doi.org/10.18388/abp.2017_1496
- Bucka-Kolendo, J., Sokołowska, B. and Winiarczyk, S., 2020. Influence of high hydrostatic pressure on the identification of *Lactobacillus* by MALDI-TOF MS-preliminary study. *Microorganisms* 8: 813. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060813>
- Chen, Y.-S., Wu, H.-C., Yu, C.-R., Chen, Z.-Y., Lu, Y.-C. and Yanagida, F., 2016. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Xi-Gua-Mian (fermented watermelon), a traditional fermented food in Taiwan. *Italian Journal of Food Science* 28(1): 9–14. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v451>
- De Angelis, M., Di Cagno, R., Huet, C., Crecchio, C., Fox, P.F. and Gobetti, M., 2004. Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1336–1346. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1336-1346.2004>
- Douillard, F.P., Ribbera, A., Xiao, K., Ritari, J., Rasinkangas, P., Paulin, L., Palva, A., Hao, Y., de Vos, W.M., 2016. Polymorphisms, chromosomal rearrangements, and mutator phenotype development during experimental evolution of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *American Society for Microbiology. Applied and Environmental Microbiology* 82(13): 3783–3792. <https://doi.org/10.1128/AEM.00255-16>
- Guidone, A., Parente, E., Zotta, T., Guinane, C.M., Rea, M.C., Stanton, C., Ross, R.P., Ricciardi, A., 2015. Polymorphisms in stress response genes in *Lactobacillus plantarum*: implications for classification and heat stress response. *Annals of Microbiology* 65: 297–305. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0862-7>
- Han, J., Chen, D., Li, S., Li, X., Zhou, W.-W., Zhang, B. and Jia, Y., 2015. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Italian Journal of Food Science* 27: 282–289. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v270>
- Huang, C.H. and Lee, F.L., 2011. The *dnaK* gene as a molecular marker for the classification and discrimination of the *Lactobacillus casei* group. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99(2): 319–327. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9493-6>
- Hunt, R., Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V., Gottesman, M.M. and Kimchi-Sarfaty, C., 2009. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods in Molecular Biology* 578: 23–39. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_2
- Jeon, S., Kim, H., Choi, Y., Cho, S., Seo, M. and Kim, H., 2021. Complete genome sequence of the newly developed *Lactobacillus acidophilus* strain with improved thermal adaptability. *Frontiers in Microbiology* 12: 697351. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.697351>
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lebeuf-Taylor, E., McCloskey, N., Bailey, S.F., Hinz, A. and Kassen, R., 2019. The distribution of fitness effects among synonymous mutations in a gene under directional selection. *eLife* 8: e45952. <https://doi.org/10.7554/eLife.45952>
- Liu, W., Su, X., Duo, N., Yu, J., Song, Y., Sun, T., Zha, M., Menghe, B., Zhang, H. and Sun, Z., 2019. A survey of the relationship between functional genes and acetaldehyde production characteristics in *Streptococcus thermophilus* by multilocus sequence typing. *Journal of Dairy Science* 102(11): 9651–9662. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16203>
- López-González, M.J., Escobedo, S., Rodríguez, A., Neves Rute, A., Janzen, T. and Martínez, B., 2018. Adaptive evolution of industrial *Lactococcus lactis* under cell envelope stress provides phenotypic diversity. *Frontiers in Microbiology* 9: 2654. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02654>
- Mahmmodi, P., Khoshkoo, Z., Basti, A.A., Shotorbani, P.M. and Khanjari, A., 2021. Effect of Bunium persicum essential oil, NaCl, bile salt, and their combinations on the viability of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic yogurt. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 13(1): 37–48. <https://doi.org/10.15586/qas.v13i1.858>
- Molina-Hoppner, A., Sato, T., Kato, C., Ganzle, M.G. and Vogel, R.F., 2003. Effects of pressure on cell morphology and cell division of lactic acid bacteria. *Extremophiles* 7: 511–516. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0349-0>
- Papadimitriou, K., Alegria, Á., Bron, P.A., De Angelis, M., Gobetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J.A., Linares, D.M., Ross, P., Stanton, C., Turrioni, F., Van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zuniga, M., Tsakalidou, E., Kok, J., 2016. Stress physiology of lactic acid bacteria. *American Society for Microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80(3): 837–890. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>
- Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G.E. and Torriani, S., 2010. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology* 144: 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.005>
- Price, M.N., Arkin, A.P. and Alm, E.J., 2006. The life-cycle of operations. *PLoS Genetics* 2(6): e96. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020096>
- Riccardi, A., Parente, E., Guidone, A., Ianniello, R.G., Zotta, T., Abu Sayem, S.M. and Varcamonti, M., 2012. Genotypic diversity of stress response in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus*. *International Journal of Food Microbiology* 157: 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.018>
- Rocha, E.P.C., 2018. Neutral theory, microbial practice: challenges in bacterial population genetics. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1338–1347. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy078>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-Del Barrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. and Sánchez-Gracia, A., 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299–3302 Editor Sudhir Kumar, Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

- Salvador-Castell, M., Oger, P. and Peters, J., 2020. Chapter 8 – high-pressure adaptation of extremophiles and biotechnological applications. In: Physiological and biotechnological aspects of extremophiles. Academic Press, pp. 105–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00008-3>
- Serrano, L.M., Molenaar, D., Wels, M., Teusink, B., Bron, P.A., de Vos, W.M. and Smid, E.J., 2007. Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial Cell Factories* 6: 29. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-29>
- Sharma, A., Kaur, J., Lee, S. and Park, Y.S., 2019. Tracking of intentionally inoculated lactic acid bacteria strains in yogurt and probiotic powder. *Microorganisms* 8(1): 5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010005>
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2019. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research* 47: D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Tsuda, H., Okuda, S., Haraguchi, T. and Kodama, K., 2019. Influence of exopolysaccharide on the growth of lactic acid bacteria. *Italian Journal of Food Science* 31: 233–242. <https://doi.org/10.14674/IJFS-1317>
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D. and Maguin, E., 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 187–216. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8_12
- Yaman, H., Sarica, E. and Coskun, H., 2020. A comparative study on the effect of high hydrostatic pressure on the ripening of Turkish white cheese from different milk species. *Italian Journal of Food Science* 32: 589–595. <https://doi.org/10.14674/IJFS-1712>
- Yang, D., Zhang, Y., Zhao, L., Wang, Y., Rao, L. and Liao, X., 2021a. Pressure-resistant acclimation of lactic acid bacteria from a natural fermentation product using high pressure. *LWT – Food Science and Technology* 69: 102660. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102660>
- Yang, H., He, M. and Wu, C., 2021b. Cross protection of lactic acid bacteria during environmental stresses: stress responses and underlying mechanisms. *LWT – Food Science and Technology* 144: 111203. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111203>
- Zapašnik, A., Sokołowska, B. and Bryła, M., 2022. Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods* 11(9): 1283. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>

10. OŚWIADCZENIA

Warszawa, dn. 23.09.2022

Dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego –
Państwowy Instytut Badawczy, im. Wacława Dąbrowskiego
Ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Bucka-Kolendo Joanna, Sokołowska Barbara (2017) Lactic acid bacteria stress response to preservation processes in beverage and juice industry. *Acta Biochimica Polonica*, vol.63, 3, 459-464. DOI:10.18388/abp.2017_1496, mój udział polegał na pełnieniu funkcji promotora pracy doktorskiej i wsparciu merytorycznym. Mój udział procentowy szacuję na 20%.

Sokołowska

Warszawa, dn. 23.09.2022

Dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego –
Państwowy Instytut Badawczy, im. Wacława Dąbrowskiego
Ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Bucka-Kolendo Joanna, Sokołowska Barbara, Winiarczyk Stanisław (2020) Influence of High Hydrostatic Pressure on the Identification of *Lactobacillus* by MALDI-TOF MS Preliminary Study. *Microorganisms*, 8(6), 813. DOI: [10.3390/microorganisms8060813](https://doi.org/10.3390/microorganisms8060813), mój udział polegał na pełnieniu funkcji promotora pracy doktorskiej i wsparciu merytorycznym. Mój udział procentowy szacuję na 5%.



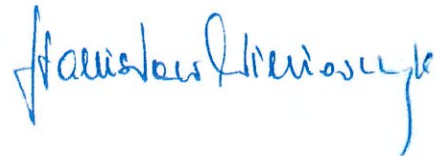
Lublin, dn. 17.02.2022

Prof. dr hab. Stanisław Winiarczyk
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Bucka-Kolendo Joanna, Sokołowska Barbara, Winiarczyk Stanisław (2020) Influence of High Hydrostatic Pressure on the Identification of *Lactobacillus* by MALDI-TOF MS Preliminary Study. *Microorganisms*, 8(6), 813. DOI: [10.3390/microorganisms8060813](https://doi.org/10.3390/microorganisms8060813), mój udział polegał na analizie profili MALDI-TOF MS badanych szczepów. Mój udział procentowy szacuję na 5%.



Warszawa, dn. 23.09.2022

Dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego –
Państwowy Instytut Badawczy, im. Wacława Dąbrowskiego
Ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Bucka-Kolendo Joanna, Sokołowska Barbara (2021) Porównanie metod identyfikacji bakterii *Lactobacillus*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2 (127), 49-60. DOI:10.15193/zntj/2021/127/377, mój udział polegał na pełnieniu funkcji promotora pracy doktorskiej i wsparciu merytorycznym. Mój udział procentowy szacuję na 10 %.



Warszawa, dn. 23.09.2022

Dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego –
Państwowy Instytut Badawczy, im. Wacława Dąbrowskiego
Ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Bucka-Kolendo Joanna, Edyta Juszcuk-Kubiak, Sokołowska Barbara (2021) Effect of High Hydrostatic Pressure on Stress-Related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* Expression Patterns in Selected *Lactobacilli* Strains. *Genes*, 12 (11), 1720. DOI: [10.3390/genes12111720](https://doi.org/10.3390/genes12111720), mój udział polegał na pełnieniu funkcji promotora pracy doktorskiej i wsparciu merytorycznym. Mój udział procentowy szacuję na 5 %.



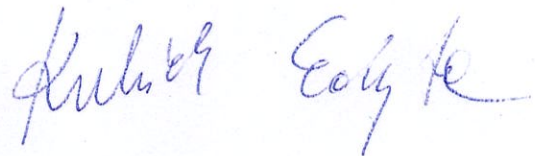
Warszawa, dn. 23.09.2022

Dr hab. Edyta Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego –
Państwowy Instytut Badawczy, im. Wacława Dąbrowskiego
Ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Bucka-Kolendo Joanna, Edyta Juszcuk-Kubiak, Sokołowska Barbara (2021) Effect of High Hydrostatic Pressure on Stress-Related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* Expression Patterns in Selected *Lactobacilli* Strains. *Genes*, 12 (11), 1720. DOI: [10.3390/genes12111720](https://doi.org/10.3390/genes12111720), mój udział polegał na współudziale w wykonywaniu doświadczeń związanych z metodą Real Time-PCR i wsparciu merytorycznym. Mój udział procentowy szacuję na 10 %.



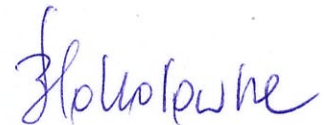
Warszawa, dn. 23.09.2022

Dr hab. inż. Barbara Sokołowska, prof. IBPRS
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego –
Państwowy Instytut Badawczy, im. Wacława Dąbrowskiego
Ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Bucka-Kolendo Joanna, Sokołowska Barbara (2022) Impact of High Hydrostatic Pressure (HHP) on the Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) of stress-related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* in the *Lactobacillus* strains. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, Vol. 14 No. 4, DOI:10.15586/qas.v14i4.1132, mój udział polegał na pełnieniu funkcji promotora pracy doktorskiej i wsparciu merytorycznym. Mój udział procentowy szacuję na 10%.



11. DOROBEK NAUKOWY

ANALIZA BIBLIOMETRYCZNA PUBLIKACJI (wg Scopus)

Publikacje oryginalne / w cyklu do rozprawy:	9/(4)
Publikacje przeglądowe / w cyklu do rozprawy:	2/(1)
Rozdziały w monografiach:	1
Sumaryczny IF/IF _{5-letni} :	11,18
Punkty MNiSW/MEiN:	195
Liczba cytowani/ bez autocytowań:	42/32
Indeks Hirscha:	3
Prezentacje ustne na konferencjach:	10
Plakaty na konferencjach:	11

Wykaz innych opublikowanych prac naukowych

1. **Bucka-Kolendo J.**, Juszcuk-Kubiak E., Sokołowska B. (2022) Effect of High Hydrostatic Pressure on Stress-Related *dnaK*, *hrcA*, and *ctsR* Expression Patterns in Selected *Lactobacilli* Strains. In: Fekadu Gadissa, editor. Prime Archives in Genetics: 2nd Edition. Hyderabad, India: Vide Leaf.
2. Akimowicz M., **Bucka-Kolendo J.** (2020). MALDI-TOF MS – application in food microbiology. *Acta Biochimica Polonica*, 67, No 3, 327-332, https://doi.org/10.18388/abp.2020_5380. (IF₂₀₂₀ = **2,149**; MNiSW = **40**). Liczba cytowań wg Scopus = 10
3. **Bucka-Kolendo J.**, Sokołowska B. (2017) Odpowiedź bakterii fermentacji mlekowej (LAB) na czynniki stresogenne w procesach utrwalania soków i napojów. *Postępy Mikrobiologii*, 56, 2, <http://pm.microbiology.pl/web/archiwum/2017-S2-BIOMILLENIUM.pdf> (IF₂₀₁₆ = **0,378**; MNiSW = **15**).
4. Gajewska J., Riedel J., **Bucka J.**, Żabik A., Michalczyk M. (2012). Influence of prebiotics and butyric acid on the composition of intestinal microflora of broiler chickens / Wpływ prebiotyków i kwasu masłowego na stan mikroflory jelitowej brojlerów kurzych. *Annals of Warsaw University of Life Sciences- SGGW Animal Science* Tom: 51, Zeszyt: 51: 47-53.
5. **Bucka-Kolendo J.**, Świątek M., Piasecka-Jóźwiak K., Kotyrba D. (2012). Strategia oznaczania GMO w laboratorium akredytowanym jako element zapewnienia jakości badań. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 2012, t. 67 nr 3, s.7-22.

6. Gajewska J., **Bucka J.**, Żabik A., Riedel J., Michalczyk J. (2009). Wpływ naturalnych preparatów roślinnych na stan mikroflory jelitowej brojlerów kurzych. *Ochrona środowiska i Zasobów Naturalnych*, Nr 41, 302 – 309.
7. Piasecka-Jóźwiak K., Kotyrba D., Skomial-Zawadzka J., **Bucka J.**, Skwarczyński P. (2008) Analiza kukurydzy zmodyfikowanej genetycznie w ziarnie i pochodnych produktach spożywczych obecnych na rynku. *Prace Instytutu i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego*, t. 63, s. 7 - 18.

Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

1. Kiousi D.E., **Bucka-Kolendo J.**, Doulgeraki A., Galanis A. (2022) Whole genome sequencing, annotation, and comparative genomic analysis of *Loigolactobacillus backii* strains isolated from spoiled beer – poster. Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HSCBB22), Alexandroupolis, Grecja.
2. **Bucka-Kolendo J.**, Kiousi D.E., Wojtczak A., Doulgeraki A., Sokołowska B., Galanis A. (2022) Genomic analysis and in vitro investigation of the hop-resistance phenotype of two novel *Loigolactobacillus backii* strains, recently isolated from spoiled beer – poster. ECCO XL New Horizons in Accessing Microbial Diversity, Brunzswig, Niemcy.
3. **Bucka-Kolendo J.**, Średnicka P., Porębska I., Sokołowska B. (2022) Mikrobiota wędzonego na zimno i pakowanego próżniowo łososia przechowywanego w różnych temperaturach – porównanie metod hodowlanych i sekwencjonowania nowej generacji - komunikat ustny. XXIX Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Warszawa, Polska.
4. **Bucka-Kolendo J.**, Średnicka P., Dekowska A., Porębska I., Sokołowska B. (2022) Mikrobiota surowych filetów z łososia pakowanych w zmodyfikowanej atmosferze - ocena metodami hodowlanymi i sekwencjonowania nowej generacji – poster. XXIX Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Warszawa, Polska.
5. Jaroszewska E., Dekowska A., **Bucka-Kolendo J.**, Porębska I., Mikołajczuk-Szczyrba A. (2022) *Photobacterium* – bioluminescencyjne bakterie pochodzenia morskiego – występowanie w żywności – wystąpienie ustne. XXIX Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Warszawa, Polska.
6. **Bucka-Kolendo J.**, Średnicka P., Porębska I., Sokołowska B. (2022) Bacterial communities on raw salmon fillets packed in a modified atmosphere assessed by cultural

- method and by Next-Generation Sequencing – poster. Next Generation Challenges in Food Microbiology, FoodMicro 2022, Ateny, Grecja.
7. Sourri P., Doulgeraki A.I., Dekowska A., **Bucka-Kolendo J.**, Nychas G-J.E., Tassou C. (2022) Differentiation of *Alicyclobacillus acidoterestris* isolated from commercial orange juice – poster. Next Generation Challenges in Food Microbiology, FoodMicro 2022, Ateny, Grecja.
 8. **Bucka-Kolendo J.**, Sokołowska B. (2021) Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of stress related *ctsR*, *dnaK*, and *hrcA* under High Hydrostatic Pressure (HHP) in selected *Lactobacilli* strains – poster. 9th International Conference of MIKROBIOKOSOS, Ateny, Grecja.
 9. **Bucka-Kolendo J.** Implementation and Sustainability of Microbial Resource Research Infrastructure for the 21st Century (2020) – warsztaty: organizacja i wystąpienie ustne, (online) Warszawa, Polska.
 10. **Bucka-Kolendo J.** (2021) MIRRI membership: Benefits and procedure – wystąpienie ustne, Latin America – Europe Symposium on Research Infrastructures (RI-VIS), online.
 11. **Bucka-Kolendo J.**, Sokołowska B. (2021) Differentiation in proteome profiles of *Lactobacillus* bacteria under high hydrostatic pressure, as a stress factor – komunikat ustny. Virtual International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2021 Summit), Kopenhaga, Dania.
 12. **Bucka-Kolendo J.**, Sokołowska B. (2021) Problemy współczesnej identyfikacji bakterii kwasu mlekowego - komunikat ustny. XI Sympozjum Naukowe, Probiotyki i Prebiotyki w Żywności, Warszawa, Polska.
 13. **Bucka-Kolendo J.**, Woszczyk M., Nasiłowska J., Sokołowska B. (2018) Heterogeneity between *Lactobacillus brevis* strains exposed to high hydrostatic pressure – komunikat ustny. 56th European High Pressure Research Group Meeting (56 EHPRGM), Aveiro, Portugalia.
 14. **Bucka-Kolendo J.**, Sokołowska B. (2018) MALDI_TOF MS jako alternatywna metoda identyfikacji bakterii fermentacji mlekowej – poster. Konferencja III Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne Metagenomy różnych środowisk, Centrum Transferu Wiedzy, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Lublin, Polska.
 15. **Bucka-Kolendo J.**, Dekowska A., Sokołowska B. (2018) Wpływ matrycy na identyfikację bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* metodą Real Time PCR - poster. Konferencja III Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne Metagenomy różnych środowisk, Centrum Transferu Wiedzy, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Lublin, Polska.

16. Dekowska A., **Bucka-Kolendo J.**, Sokołowska B. (2018) Wpływ temperatury na wzrost bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* podczas przednamnażania – metoda klasyczna i Real – Time PCR - poster. Konferencja III Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne Metagenomy różnych środowisk, Centrum Transferu Wiedzy, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Lublin, Polska.
17. **Bucka-Kolendo J.**, Sokołowska B. (2017) Odpowiedź bakterii fermentacji mlekowej (LAB) na czynniki stresogenne w procesach utrwalania soków i napojów- poster. Ogólnopolska Konferencja Biotechnologów i Mikrobiologów: BioMillenium 2017 – trendy i rozwiązania w biotechnologii i mikrobiologii, Gdańsk, Polska.
18. Świątek M., Stefańska I., **Bucka-Kolendo J.**, Piasecka-Józwiak K., Stecka K. (2013). Evaluation of the proteolytic activity of sourdough lactic acid bacteria strains against gliadin peptides of wheat flour - poster. Third International Symposium on Gluten-free Cereal Products and Beverages, Vienna, Austria.
19. Piasecka-Józwiak K., Rozmierska J., Stecka K., Słowik E., Chabłowska B., Kliszc M., **Bucka J.**, Szkudzińska-Rzeszowiak E. (2009). Próby zastosowania amylolitycznego szczepu *Lactobacillus plantarum* w kulturach starterowych dla piekarstwa- poster. XXXIX Sesja Komitetu Nauk o Żywności PAN, Postęp w wytwarzaniu i ocenie żywności, 29.06-01.07.2009 Poznań, Polska.
20. Zawadzka-Skomiął J., Piasecka-Józwiak K., Chabłowska B., Kliszc M., Szkudzińska-Rzeszowiak E., Kotyrba D., **Bucka J.**, Stecka K. (2009). The biodiversity of lactic acid bacteria In Polish wheat-rye sourdoughs- komunikat ustny. 4th International Symposium on Sourdough, Freising, Niemcy.
21. Gajewska J., **Bucka J.**, Żabik A., Riedel J., Michalczuk J. (2009). Wpływ naturalnych preparatów roślinnych na stan mikroflory jelitowej brojlerów kurzych – komunikat ustny. VII Międzynarodowa Konferencja Naukowo – Techniczna, Obieg pierwiastków w przyrodzie. Bioakumulacja – Toksyczność – Przeciwdziałanie, Warszawa, Polska.
22. Gajewska J., **Bucka J.**, Żabik A., Niemiec J. (2007) Zastosowanie proekologicznych mieszanek ziołowych w nowoczesnym chowie drobiu – stan mikroflory jelitowej – komunikat ustny. 41 Sympozjum Mikrobiologiczne, Nowoczesne metody badania mikroorganizmów gleby i innych środowisk, Toruń-Ciechocinek, Polska.

Staże

1. Staż zagraniczny w Hiszpańskiej Kolekcji Kultur (CECT), Uniwersytet w Walencji, 11-15. 07.2022, Walencja, Hiszpania.

2. Staż zagraniczny w Instytucie Technologii Produktów Rolnych, w Greckiej organizacji Rolniczej –DIMITRA, 13-17.12.2021, Ateny, Grecja
3. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, 2012-2013.

Udział w projektach badawczych

- Projekt IS_MIRRI21 z funduszy UE Horyzont 2020, Nr 871129 Implementation and Sustainability of Microbial Resource Research Infrastructure for 21st century. (Wdrożenie i zrównoważony rozwój infrastruktury badawczej zasobów mikrobiologicznych w XXI wieku), koordynator pakietu roboczego WP8 - Consolidation and Enlargement of Membership (konsolidacja i rozszerzenie członkostwa). 2021-2023.
- Temat badawczy BST o symbolu: 500-01-ZM-01: Zmiany zachodzące w proteomie bakterii fermentacji mlekowej (LAB) pod wpływem działania czynników stresogennych, autor, 2018-2020.
- Temat badawczy BST o symbolu: 500-01-ZO-01: Zmiany zachodzące w polimorfizmie genetycznym bakterii fermentacji mlekowej pod wpływem czynników stresogennych, autor, 2017.
- Temat badawczy BST o symbolu 1.1.7: Stabilność populacji drożdży występujących na rasach winogron uprawianych w polskich winnicach, autor, 2011-2012.
- Projekt badawczy N N 312 495140: Selekcja i charakterystyka aktywności metabolicznej szczepów bakterii fermentacji mlekowej o specyficznych właściwościach proteolitycznych względem alergennych białek mąki, główny wykonawca, 2011-2014.
- Temat badawczy BST o symbolu 2.2.2: Charakterystyka molekularna szczepów bakterii mlekowych (LAB) izolowanych z zakwasów piekarskich, współautor, 2009-2011.