

UTJECAJ UV-ZRAČENJA NA LACTOBACILUS BULGARICUS*

Mr KRŠEV Ljerka, Zagrebačka mljekara

Do sada je već objavljeno više radova, koji obrađuju utjecaj mutagenih sredstava na bakterije mlječno-kiselog vrenja, osobito ona koja se koriste u proizvodnji. Tako se od mutagenih sredstava spominju EI (etilenimin), X-zrake, UV-zrake, -zrake (60 Co sa 960—1200 rad/min), NMU (nitrosometiluretan) NTG (nitrosogvanidin), a također i kombinacija mutagenih sredstava, kao EI i UV, X-zrake i EI ili druge kombinacije.

Autori su nakon izvedenih mutacija izolirali mutante, i analizirali njihove karakteristike (1, 2, 3, 4). Tako Banikova (2) navodi da je moguće mutacijama dobiti biokemijski aktivniji mutant ili mutante s nekim za proizvodnju povoljnijim svojstvima, koji se mogu koristiti u mljekarskoj industriji.

Materijal i metode rada

U predloženom radu za izvedbu mutacija upotrebljavala sam UV-zrake kao mutageno sredstvo. Mutacije sam izvela na soju *Lactobacillus bulgaricus viscosus*, koji je komponenta jogurtne kulture. Mikroorganizme sam uzgajala na čistoj podlozi MRS (5) sa dvostrukim slojem, da bi osigurala anaerobne uvjete rasta. Nakon ozračivanja s različitim dozama UV-svijetlosti ploče sam inkubirala na temperaturi 40—44° C kroz 12 sati. Izrasle mutante izolirala sam i zatim uzgajala na rekonstituiranom obranom mlijeku i odredila njihove za proizvodnju važne karakteristike:

1. Stupanj kiselosti za stvoreni koagulum po metodi Soxhlet-Henkela, a pH na Ph-metru »Iskra«.

2. Vrijeme potrebno da se stvori koagulum određeno je uzgojem na rekonstituiranom obranom mlijeku inkubacijom na temperaturi 42—44° C u vodenoj kupelji.

3. Količina stvorenih aromatskih tvari izražena je kao ppm acetaldehida (destilacija vodenom parom i titracija sa $N_2S_2O_3$ uz škrob kao indikator).

4. Osjetljivost na djelovanje antibiotika penicilina i streptomicina određena je pomoću metode cijepjenja na čvrstu podlogu uz rastuću koncentraciju antibiotika sve do kritične koncentracije, tj. potpunog zaustavljanja rasta mikroorganizma.

5. Nakon izolacije mutanata koji su imali povišenu rezistenciju na antibiotike penicilin i streptomicin izvedena je na njima još jedna (drugostepena) mutacija sa istim mutagenim sredstvom. Ozračivanje sam izvela na pločama sa podlogom u koju su bile dodane više koncentracije antibiotika od kritične koja je postignuta u prvostepenoj mutaciji.

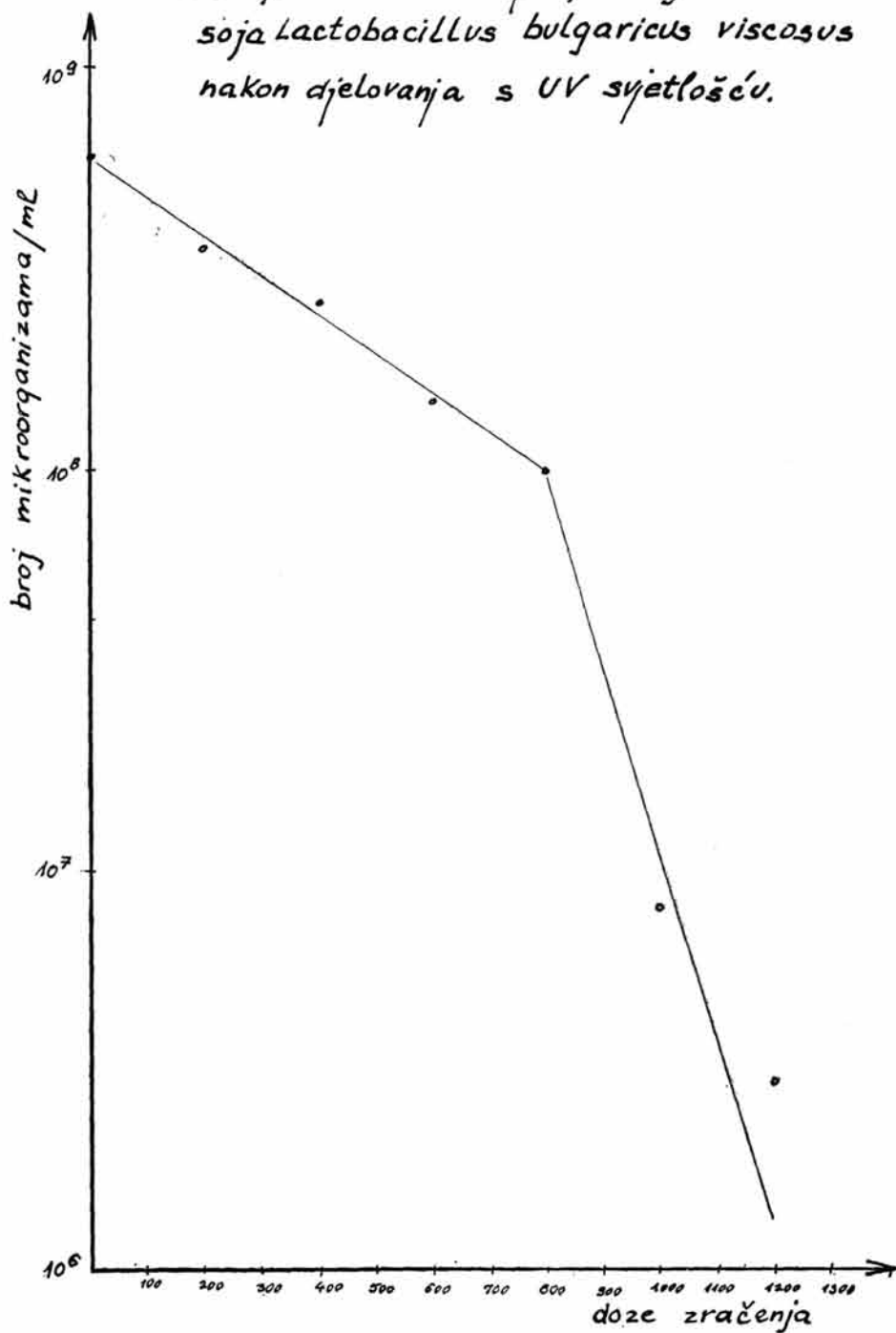
Na taj način dobila sam informaciju da li je moguće dobiti još rezistentnije sojeve (mutante).

Rezultati rada

Nakon svakog ozračivanja i inkubacije odredila sam broj preživjelih stanica i na taj način dobila krivulju preživljavanja soja *Lactobacillus bulgaricus*

* Referat održan na XIII Seminaru za mljekarsku industriju, Tehnološki fakultet, Zagreb, od 5—7. II 1975.

Dijagram 1. Krivulja preživjelih stanica soja *Lactobacillus bulgaricus viscosus* nakon djelovanja s UV svjetlošću.



viscosus tj. efakt UV-svijetlosti na ovaj soj. Krivulja je prikazana na dijagramu 1.

Izolirano je 120 mutanata matičnog soja. Sa dobivenim mutantima provedena su daljnja ispitivanja, da se ustanove njihova svojstva.

Od 10 izoliranih mutanata nakon izvedenih analiza ustanovila sam slijedeće:

1. 11% od izoliranih sojeva bilo je sposobno stvoriti viši °SH, odnosno niži pH u rekonstituiranom obranom mlijeku (10% otopina) nakon inkubacije od 3 sata na 42—44°C u vodenoj kupelji, od matičnog soja.

2. 2% mutanata koaguliralo je rekonstituirano obrano mlijeko za kraće vrijeme od 3 sata.

3. 15% stvaralo je veće količine aromatskih tvari od matičnog soja.

4. 55% je svojim razvojem stvorilo koagulum (gruš) koji po organoleptičkoj ocjeni posve odgovara tehnološkim zahtjevima.

5. 62% izoliranih mutanata imalo je izmijenjen oblik stanica što je utvrđeno mikroskopskim pregledom.

6. 8,2% sojeva imalo je znatno povišenu rezistenciju na antibiotike penicilin i streptomycin ili na jedan od njih.

U tabeli 1. prikazana su svojstva od nekih izoliranih mutanata soja *Lactobacillus bulgaricus viscosus*.

Tabela 1

Svojstva nekih mutanata soja *L. bulgaricus viscosus* zračenih sa UV-zrakama

UV zračenje u erg/mm ²	Oznaka soja	Kiselost koagulumu u °SH nakon 18 h kod +10 °C	Vrijeme zakisjavanja u h	Maks. proizveden acetaldehid u ppm	Rezist. na penicilin u g/ml	Rezist. na streptomycin u g/ml	Ocjena gruša
1800	12a	26; 28; 29,2	3,30; 3,20; 3,30	8,8	0,70	7,2	Nije kompaktan, pušta sirutku
800	m ₁₂	37,1; 37,5; 37,2	3,30; 3,0; 3,0	5,4	0,55	4,8	Kompaktan, pušta sirutku
1400	V ₇	34; 33; 36	3,30; 3,0; 3,20	8,4	0,62	5,0	Kompaktan, nema sirutke
2000	P ₂	56; 59; 72	18; 18; 18	—	1,0	7,5	Jako pušta sirutku
800	3	36; 37,1; 37,2	4,15; 4,0; 4,10	7,8	0,52	4,2	Kompaktan, pušta sirutku
0	<i>Lactobacillus bulgaricus viscosus</i> (matični soj)	44,2; 43,5; 42,8	3,30; 4,05; 4,0	7,8	0,45	3,5	Kompaktan, nema sirutke

Zaključak

Na osnovu provedenih pokusa može se zaključiti slijedeće:

1. Ultravioletno svjetlo ima jako mutageno i letalno djelovanje na ispitivani soj.
2. Mutacijama pomoću UV-svjetlosti može se dobiti mutante koji imaju bolje proizvodne osobine od matičnog soja (rezistenciju na antibiotike, vrijeme koagulacije, stvaranje arome).
3. Potrebno je izolirati veoma velik broj mutanata, da bi dobili sojeve željenih karakteristika, jer u pravilu neke karakteristike (kao npr. visoka rezistencija na antibiotik) često prati predugo vrijeme zakiseljavanja ili preniska kiselost ili slično.
4. Drugostepenom mutacijom istim mutagenim sredstvom moguće je dobiti još rezistentnije sojeve na antibiotike streptomycin i penicilin od rezistencije postignute u prvostepenoj mutaciji.

Literatura

1. Dilanian K., Macarian R. Mutants de bacteries lactiques obtenus par irradiation aux rayons.
XVIII-th Dairy Int. Congr. Sydney — Vol 1F (1970)
2. Z. A. Banikova, I. N. Pyatnitsyna. Utilisation d'agents mutagenes pour augmenter l'activité biochimique des bacteries lactiques.
XVIII-th Cong. Int. de laiterie — Sydney (1970)
3. Grinewich A. G. Influence des agents mutagenes sur la production de diacetyls par *Str. diacetylactis*.
Institute of Plant Physiology and Biochemistry, USSR.
4. N. N. The Oxoid Manual (1965)
3rd. Ed. Oxoid Limited, London SE 1.
5. N. N. Official methods of analysis of the Association of official agricultural chemists. Washington (1965) (520)