

Primena genetičkog inženjerstva u proizvodnji starter kultura bakterija mlečne kiseline

(The Genetic Engineering in the Production of Starter Cultures of Milk Acid Bacteria)

Dr. Ana BANINA, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, dr. Ljubiša TOPI-SIROVIĆ, Prirodno-matematički fakultet, Beograd, dr. Dragojlo OBRADOVIĆ, Poljoprivredni fakultet, Beograd

Stručni rad — Professional Paper
Prispjelo: 7. 4. 1987.

UDK: 579.25:579.86

Sažetak

U radu su izloženi osnovni principi tehnologije rekombinantne DNK ili genetičkog inženjerstva, problemi koji se javljaju u vezi sa primenom ove tehnologije i mogućnosti koje ona pruža kada je u pitanju poboljšanje aktivnosti starter kultura u fermentacionim procesima.

Summary

A review of current progress in the development of gene transfer and molecular cloning systems of lactic acid bacteria is presented. The use of lactic acid bacteria as a hosts for cloning, the construction of cloning vectors and the analysis of gene expression signal is discussed. Some obvious applications of genetic manipulation for improving and stabilizing the desirable characteristics of starter cultures include enhanced lactose metabolism, proteinase activity, bacteriophage resistance, flavor production and production of inhibitory compounds. The use of this technology is destined to improve the way we currently produce fermented dairy products.

Uvod

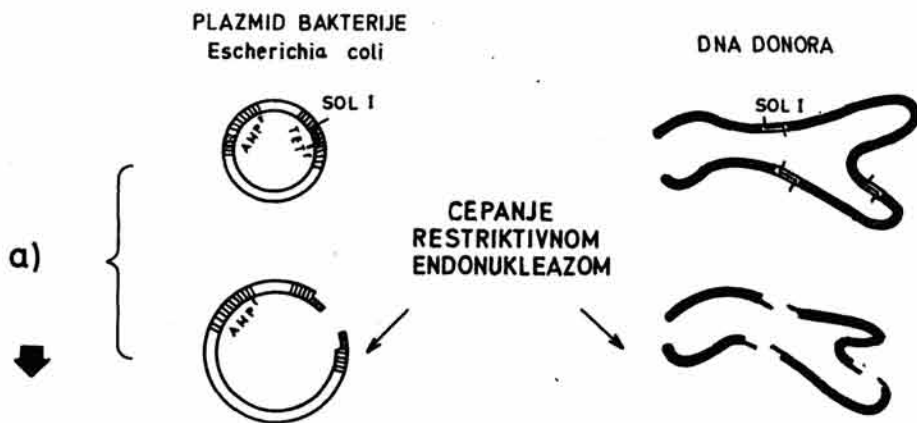
Do nedavno, osnovni interes za mikrobiologe hrane bili su mikroorganizmi u hrani koji su mogli izazvati infekcije ili intoksikacije kod ljudi ili promenu kvaliteta hrane. U prvom slučaju, naponi su bili usmereni ka eliminisanju zdravstvenog rizika od namirnica sa takvim mikroorganizmima. U drugom slučaju, uvedeni su različiti postupci za sprečavanje mikrobiološkog kvarenja hrane, pri čemu se vodi računa da biološka vrednost namirnice bude što manje izmenjena. Međutim, prisutan je i interes za dobijanje stabilnih starter kultura, posebno u industriji prerade mleka. Stoga oblast koja sve više privlači pažnju prehrambenih mikrobiologa je genetičko inženjerstvo odnosno tehnologija rekombinantne DNK (rDNK), koja predstavlja jedinstvenu i veoma korisnu tehnologiju za modifikaciju bitnih svojstava industrijski važnih mikroorganizama. Mogućnost dobijanja sojeva sa poboljšanom produkcijom aromatičnih komponenti, zaslađivača, boja, novih proteina, danas je veliki izazov za mnoge istraživače a u nekim slučajevima i realnost.

Genetičko inženjerstvo obuhvata nova saznanja koja se zasnivaju na skupnom rezultatu različitih fundamentalnih istraživanja i otkrića u oblasti molekularne genetike i biologije, koja omogućava uvođenje gena različitih

bioloških vrsta u ćeliju domaćina (mikroorganizam, ćelija biljaka ili životinja). Ti geni mogu funkcionisati u novoj ćeliji domaćinu, a rezultat njihove aktivnosti može biti sinteza velike količine različitih proteina a posredno i drugih molekula od ekonomskog, medicinskog i drugog značaja. Genetičko inženjerstvo omogućuje da se u postojećim biotehnološkim procesima ostvari značajno veća proizvodnja. Pored toga, pruža mogućnost otvaranja nove ere u biotehnologiji u smislu razvoja procesa, koji će omogućiti dobijanje produkata koji današnjim tehnologijama nisu mogli biti proizvedeni u zadovoljavajućoj količini ili je njihova proizvodnja bila skupa. Stoga nisu nerealna očekivanja da će se u narednih dvadeset godina mnogi današnji biotehnološki procesi učiniti efikasnijim i ekonomičnijim primenom genetičkog inženjerstva.

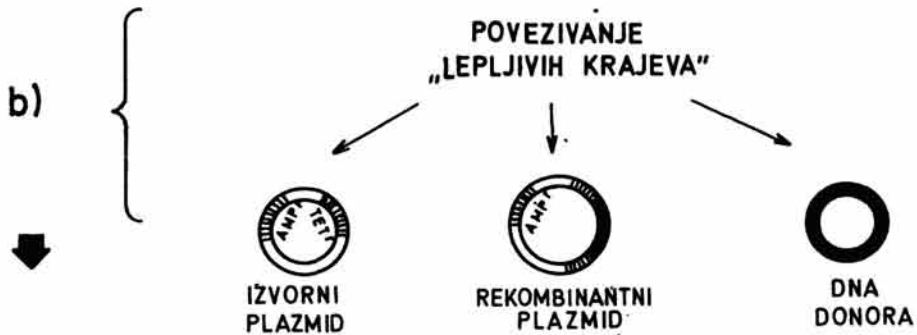
Principi genetičkog inženjerstva

Genetičko inženjerstvo je tehnologija koja se može koristiti i za *in vitro* izmenu genetičke informacije mikroorganizama. Ovakva genetička konstrukcija sojeva omogućava da se uklone određena nepoželjna svojstva a istaknu ili uvedu potpuno nova ili željena svojstva. Do sada, neka od ovih svojstava mikroorganizama mogla su biti izmenjena konjugacijom, transdukcijom, transformacijom ili fuzijom protoplasta. Međutim, genetičko inženjerstvo pruža mogućnost da se geni jednog organizma prenesu, održe i ispolje svoju funkciju u drugom mikroorganizmu domaćinu. Na taj način se mogu savladati izolacione granice među vrstama. U osnovi tehnologija rDNK, sastoji se od četiri glavne procedure:

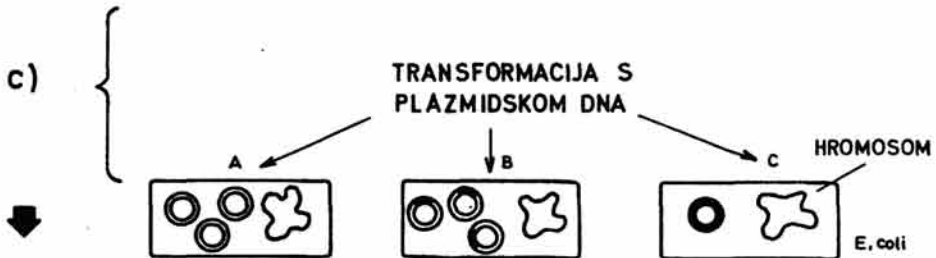


Crtež 1. Priprema delova, fragmenata DNK iz nekog odabranog izvora, korišćenjem restriktivnih enzima, koji su u stanju da prepoznaju specifične sekvence u molekulu DNK, bez obzira na njeno poreklo.

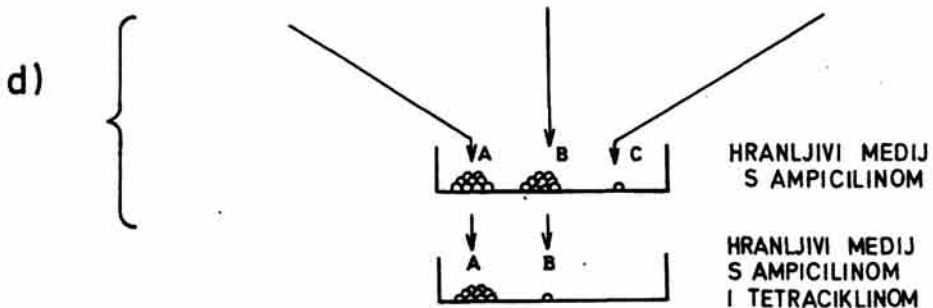
Osnovni uslov za tehnologiju rekombinantne DNK u bakterijama mlečne kiseline je u postojanju dobrih vektor-domaćin sistema, sa efikasnom ekspresijom gena kao i fundamentalnog znanja o organizaciji i ekspresiji gena u ovih bakterija. Najbolje opisan sistem vektor-domaćin je Gram-negativna bakterija *Escherichia coli*, njeni plazmidi i lambda fag. Međutim, *E. coli* iz



Crtež 2. Vezivanje fragmenata DNK na odgovarajući vektor (plazmid, virus) zahvaljujući postojanju enzima ligaze, koji katalizira uspostavljanje fosfodiesterne veze između fragmenata DNK.



Crtež 3. Uvođenje vektora u ćeliju domaćina metodom transformacije protoplasta ili intaktnih ćelija.



Crtež 4. Selekcija ćelija koje su prihvatile i omogućile ispoljavanje svojstva vektora.

mnogih razloga nije najpogodniji mikroorganizam za biosintetsku proizvodnju, posebno u industriji hrane.

S obzirom da se u industrijskim procesima upotrebljavaju različiti mikroorganizmi, pažnja istraživača u poslednje vreme usmerena je na druge vektor-

-domaćine sisteme. Znatno napredak je postignut u razvoju genetičkog inženjerstva kod rodova *Bacillus*, *Streptomyces* i *Saccharomyces* (Dean i Dooley 1981; Hopwood i Chater, 1982; Davis i Johnston, 1983). Međutim, progres tehnologije rDNK u bakterijama mlečne kiseline je nešto sporiji iz nekoliko razloga:

- nedovoljno poznavanje molekularne genetike bakterija mlečne kiseline
- teškoće u laboratorijskom gajenju starter kulture bakterija mlečne kiseline zbog njihovih složenih nutritivnih zahteva
- mali broj selektivnih markera.

I pored navedenih teškoća, primena genetičkog inženjerstva u mlekarскоj industriji se očekuje u vrlo bliskoj budućnosti. Ne sme se izgubiti iz vida da će klasične tehnike, pomoću kojih se mogu razvijati i poboljšavati starter kulture i dalje biti metode korisne za mlekarsku industriju, ali genetičko inženjerstvo nudi dve bitne prednosti u odnosu na tradicionalni pristup:

— genetičko inženjerstvo omogućava da se može direktno genetički manipulirati sa mikroorganizmima, što znači da će se potreba za selekcijom u prirodi postojećih mikroorganizama znatno smanjiti, pogotovo što je broj vrsta mikroorganizama u prirodi ograničen. Isto tako, mogu se razviti potpuno novi procesi, a takođe se postojeći mogu poboljšati.

— omogućava se sticanje novih saznanja u pogledu svojstava enzima koji katalizuju reakcije. Upotrebom genetičkog inženjerstva moguće je menjajući strukturu proteina, sintetizovati nove forme enzima sa većom katalitičkom moći ili izmenjene specifičnosti. Prema tome, osnovni cilj primene genetičkog inženjerstva u mlekarскоj industriji leži u rešavanju nekoliko problema vezanih za aktivnost starter kultura. Pre svega, očekuje se dobijanje sojeva sa dugotrajnom rezistencijom na infekcije sa bakteriofazima, povećanom proizvodnjom mlečne kiseline, sojeva koji daju novu ili poboljšanu konzistenciju, novu ili poboljšanu aromu, poboljšanje proteolitičke aktivnosti, proizvodnja antimikrobnih jedinjenja koja bi sprečavala kvarenje proizvoda, kao i rast štetnih mikroorganizama, zatim dobijanje sojeva sa povećanom tolerancijom na promene kiselosti (pH) sredine, temperature i a_w vrednosti. Takođe se očekuje da će genetičko inženjerstvo omogućiti kloniranje gena za produkciju enzima sličnih himozinu, čime bi se postigle velike uštede.

Sistem prenosa i kloniranja gena kod starter kultura

Uloga bakterija mlečne kiseline u fermentacionim procesima u mlekarскоj industriji je dobro poznata. Prvi podaci o genetici ovih mikroorganizama datiraju od sedamdesetih godina (McKay, Baldwin, Zottola, 1972; McKay, Cords, Baldwin, 1973). Većina tih pionirskih genetičkih ispitivanja bila je koncentrisana na prisustvo i funkciju malih cirkularnih delova DNK, tzv. plazmida. Od tog vremena »biologija plazmida« postaje glavna oblast ispitivanja streptokoka, pošto je utvrđeno da su neka bitna svojstva bakterija, koja omogućavaju uspešnu fermentaciju mleka, determinisana genima na plazmidnoj DNK. Među tehnološki značajnim svojstvima ćelija, a koja su vezana za ove elemente su: mehanizam rezistencije na bakteriofage, sposobnost fermentacije laktoze, proteolitička aktivnost, korišćenje citrata i proizvodnja nizina (Gasson, 1983; Gasson i Davies, 1984; McKay,

1983). Takođe, geni koji su važni za razmenu genetičkog materijala između ćelija (konjugacija) su takođe smešteni na plazmidima (Gasson, 1983).

Da bi se genetičko inženjerstvo primenilo kod ove grupe bakterija, pokazalo se neophodnim da je potrebno razviti sistem za transformaciju protoplasta. Naime, za razliku od *E. coli* nije moguće izvršiti transformaciju intaktnih ćelija ovih bakterija. Tako su Kondo i McKay (1984) prvi uspešno transformisali protoplaste *Streptococcus lactis* sa laktoznim plazmidom. Frekvencija transformacije je bila niska, ali su oni pokazali da DNK plazmida može biti unesena u ovaj streptokok metodom transformacije. Poboljšanjem tehnike transformacije upotrebom polietilen glikola postignuto je povećanje frekvence transformanata za 30%. Pored toga, značajni rezultati su dobijeni transfekcijom protoplasta (ubacivanje DNK bakteriofaga) *S. lactis subsp. dicaetyllactis* (Geis, 1982).

Uspešna primena genetičkog inženjerstva zahteva konstrukciju vektora koji će omogućiti kloniranje gena (Anderson i McKay, 1984). Tako je plazmid pWVOL iz *Streptococcus cremoris* Wg2 iskorišćen da bude osnova za konstrukciju plazmida pGK12 veličine 4.4 kb, koji zadovoljava uslove vektora. Ovaj vektor je u stanju da se replicira i u *Bacillus subtilis* i u *E. coli* (Kok, Vossen, Venema; 1984). Konstruisan plazmid pNZ12, veličine 4.1 kb, takođe je interesantan pošto može egzistirati u velikom broju kopija u ćeliji i to u *S. lactis*, *B. subtilis* i *E. coli* (Jos, et. al., 1985; DeVos, 1986).

Poslednjih godina, uspelo se sa kloniranjem nekoliko gena streptokoka. Tako je kloniran gen za B-galaktozidazu iz *Streptococcus thermophilus* i prebačen je u *B. subtilis* i *S. lactis* gde je funkcionisao kao i u originalnom soju (Kok, et. al., 1985).

Kada je u pitanju primena genetičkog inženjerstva kod laktobacila, onda su razlozi koji do sada onemogućavaju širu primenu slični kao i kod streptokoka. Pošto laktobacili igraju vidnu ulogu u različitim fermentacijama a takođe i u proizvodnji mlečne kiseline, arome i konzistencije proizvoda, upotreba ovih novih tehnika će definitivno imati svoje mesto u poboljšanju i dobijanju novih sojeva. Nedavno je uspešno izvršena transformacija sa jednim plazmidnim vektorom koji je bio aktivan i u *E. coli* i u *Lactobacillus casei* (Wickner i Chassy, 1984). Poboljšanje starter kultura laktobacila pomoću genetičkog inženjerstva ići će u istom pravcu kao i kod streptokoka, ali će se do rešenja sigurno nešto teže doći zbog specifičnih fizioloških karakteristika i međusobne različitosti navedenih mikroorganizama. Iz tog razloga treba očekivati da će sadašnja intenzivna ispitivanja biohemijskih puteva laktobacila omogućiti i lakšu primenu tehnologije rDNK.

Zaključak

Iako je oblast genetike bakterija mlečne kiseline predmet interesovanja preko 70 laboratorija u svetu, kao i uprkos činjenici da je prva generacija vektora za kloniranje razvijena, potrebna su dodatna ispitivanja kako bi se ostvario brži progres u ovoj oblasti. Neophodno je nastaviti istraživanja u cilju razvijanja što preciznijih sistema za kloniranje gena kod streptokoka (kod laktobacila su takvi eksperimenti u početnoj fazi), s ciljem da se što detaljnije izuče lokacije gena kako na DNK plazmida tako i hromozoma, što

daje osnovu za dalja manipulisanja ovim bakterijama. Isto tako, neophodna su dalja ispitivanja mehanizma rezistencije u odnosu na fage, koji se zahvaljujući svojoj heterogenoj prirodi, mogu objasniti samo na molekularnom nivou ćelije.

Prethodna saznanja o organizaciji i funkcionisanju gena bakterija mlečne kiseline, omogućiće i korišćenje specifičnih metoda genetičkog inženjerstva, kao što je ciljana (unapred tačno određena) mutageneza, što daje novu dimenziju primeni genetičkog inženjerstva, kao tehnologiji budućnosti za dobijanje novih sojeva koji se koriste u fermentacionim procesima i to ne samo u mlekarskoj već i u ostalim prehrambenim industrijama. Kada je u pitanju mlekarstvo, značaj tehnologije rDNK ogleda se i u činjenici da će kvalitet fermentisanih mlečnih proizvoda biti poboljšan i ujednačen, što i sa ekonomske tačke gledišta nije zanemarljivo.

Literatura

- ANDERSEN, D. G., and MCKAY, L. L. (1984): In vivo cloning of lac genes in *Streptococcus lactis* ML3. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 245—249.
- DAVIS, R. W., JOHNSTON, H. M.: Recombinant DNA Techniques in Yeast, u Y. Ikeda and T. Beppu (Uredn.), Genetics of Industrial Microorganisms, Kodansha Ltd., Tokyo, str. 153—157, 1983.
- DEAN, D. H., DOOLEY, M. M.: Molecular Cloning Capabilities of *Bacillus subtilis*. Recombinant DNA Technical Bulletin 4, 143, 1981.
- GASSON, M. J.: Genetic transfer system in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuw.* **49**, 275—282, 1983.
- GASSON, M. J., DAVIES, L.: Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. In F. L. Davies and B. Low (eds) Elsevier Applied Sci., Publisher, Ch. 8, str. 99, 1984.
- GEIS, A.: Transfection of protoplasts of *Streptococcus lactis* subsp. *dicetylactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**, 119, 1982.
- HOPWOOD, D. A., and CHATER, K. F.: Genetic Engineering, Plenum Press, New York, Vol. 4, str. 119—145, 1982.
- KOK, J., VAN DER VOSSSEN, J. M., VENEMA, G. (1984): Construction of Plasmid Cloning Vectors for Lactic Streptococci which also Replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 726—731.
- KOK, J., VAN DIJL, J. M., VAN DER VOSSSEN, J. M. B. M., VENEMA, G. (1985): Cloning and Expression of a *Streptococcus cremoris* Proteinase in *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 94—101.
- KONDO, MCKAY, L. (1984): Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: optimization and use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 252.
- MCKAY, L. L., BALDWIN, A. K. and ZOTTOLA, E. A. (1972): Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **23**, 1090.
- MCKAY, L. L., CORDS, B. R. and BALDWIN, K. A. (1973): Transduction of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *J. Bacteriol.* **115**, 810.
- MCKAY, L. L. (1983): Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie van Leeuw.* **49**, 259—273.
- DE VOS, W. M. (1986): Gene cloning in lactic streptococci. *Neth. Milk Dairy J.* **40**, 141—157.
- JOS, M. B., VAN DER VOSSSEN, J. M., VENEMA, G. (1985): Construction of cloning Promoter-Screening and Terminator-Screening Shuttle Vectors for *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactis*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **50**, 540—542.
- WICKNER, L. L. and CHASSY, B. M. (1984): Characterization and Molecular cloning of cryptic plasmids isolated from *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1154.