

## NOVA SAZNAJNA O GENETICI BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

Mr Ana BANINA, Poljoprivredni fakultet, Zemun

Bakterije mlečne kiseline, kao veoma značajna grupa mikroorganizama, našle su primenu pre svega u proizvodnji sireva, maslaca, jogurta i ostalih mlečnih produkata. Osnovna uloga ovih bakterija je razlaganje laktoze, proteina mleka, u nekim slučajevima citrata, radi stvaranja mlečne kiseline, odnosno različitih aromatičnih i drugih jedinjenja. Ova svojstva su kod nekih bakterija mlečne kiseline nestabilna i mogu se izgubiti, te takvi sojevi postaju nepogodni za proizvodnju. Kod drugih može doći do ispoljavanja neželjenih osobina kao što su stvaranje gorčine, a mnogi sojevi su osetljivi na bakteriofage. Zbog takvih nedostataka broj pogodnih sojeva za proizvodnju je veoma ograničen i postoji stalna potreba za dobijanjem novih ili modifikovanih sojeva.

Iskustvo je pokazalo da pogodni novi sojevi, posebno bakterije mlečne kiseline, mogu biti izolovani iz prirodnih sredina. Drugi način dobijanja novih sojeva leži u genetičkoj modifikaciji postojećih.

U ovom referatu su izneseni najnoviji literaturni podaci o mogućnostima genetičke modifikacije sojeva bakterija mlečne kiseline, kao i o značaju i ulozi plazmida kod ovih bakterija, obzirom da su ovi problemi danas u centru pažnje i predstavljaju osnovu za buduća genetička istraživanja i primenu u praksi.

### Plazmidi

Bakterije mlečne kiseline koje učestvuju u proizvodnji kiselomlečnih proizvoda, veoma često pokazuju nestabilnost u nekim svojstvima bitnim za postizanje odgovarajućih osobina proizvoda. Rastući u mleku, *Streptococcus lactis* i *Streptococcus cremoris*, pomoću svojih proteinaznih enzima obezbeđuju potrebne amino kiseline i peptide iz kazeina. Ako izgubi proteinazni sistem, soj sporije stvara mlečnu kiselinu i potrebno mu je 48h ili više da koagulise mleko na temperaturi od 21 °C, pa je takva kultura neupotrebljiva za proizvodnju. Razlozi za spontan gubitak odnosno nestabilnost proteinaznog sistema bili su nejasni sve do radova McKay i Baldwin (1974), Molskness i dr. (1974), Pearce i dr. (1974), koji su prvi ukazali na plazmide, kao moguće lokacije nekih gena, koji kontrolišu važna svojstva bakterija mlečne kiseline.

Rast bakterija mlečne kiseline u mleku takođe zavisi o njihovoj sposobnosti da fermentišu laktozu. Ova osobina kao i proteinazna aktivnost je nestabilna, odnosno gubitak ovih aktivnosti je ireverzibilan. Ako se ove bakterije gaje na podlogama koje sadrže ugljene hidrate, ali ne galaktozu ili laktozu, nakon dužeg presejavanja ćelije koje ne mogu koristiti laktozu (lak-), postaju dominantne u populaciji tj. kultura gubi sposobnost fermentacije laktoze. Ova pojava je prvi put objavljena u većem broju radova još pre 40 godina (Hunt et al., 1939, Okulitch, 1939, Yawger i Sherman, 1937), no tek sedamdesetih godina ispitivanja su ukazala da neki geni, koji kontrolišu industrijski važna svojstva, kao na pr. laktozni metabolizam, odnosno proteinaznu aktivnost, imaju plazmidnu lokaciju (McKay i Baldwin 1974, McKay i dr. 1972). Plazmidi su cirkularni delovi DNK u ćeliji bakterije, koji se repliciraju nezavisno

\* Referat održan na XXI Seminaru za mljekarsku industriju, Zagreb, 1983.

od hromozomske DNK. Ispitivanjima različitih sojeva *Streptococcus lactis* (Davies i dr. 1981, a Efstathiou i McKay 1976, Klaenhammer i dr. 1978, Kuhl i dr. 1979, Pechmann i Teuber 1980), *Str. cremoris* (Larsen i McKay 1978, Pechmann i Teuber (1980) i *Str. lactis* subsp. *diacetylactis* (Kempler i McKay 1979, Davies i Gasson 1981), utvrđeno je da ove vrste sadrže znatne količine plazmidne DNK, koja se može izolovati iz ćelije. Usled razlika u molekularnoj težini, plazmidi se mogu međusobno razdvojiti pomoću gel elektroforeze (Guerry i dr. 1973, Cord i dr. 1974, Davies i Gasson 1981 b).

Kod jednog soja *Str. lactis* utvrđeno je prisustvo 14 plazmida različite molekularne težine (Davies i dr. 1981a).

Ispitivanja laktobacila pokazuju da oni nose manji broj plazmida nego streptokoke: *Lactobacillus acidophilus*, 2, *L. bulgaricus*, 4, (Klaenhammer i Sutherland 1980), *L. casei* subsp. *rhamnosus* i različiti sojevi *L. casei* subsp. *casei* sadrže samo po jedan plazmid (Chassy i dr. 1976, Chassy i dr. 1978, Gibson i dr. 1976).

Mnogi od ovih plazmida su »kriptični« tj. nose neidentifikovane gene, mada se zna da se kod nekih sojeva *Str. lactis* i *Str. cremoris*, geni koji kontrolišu enzime laktoznu permeazu (lak geni) i proteinazu (prt geni), nalaze na plazmidima (McKay i dr. 1972, LeBlanc i Lee 1979, Anderson i McKay 1977, Molskness i dr. 1974, Pearce 1978, Pearce i dr. 1974, Larsen i McKay 1978). U nekim su slučajevima specifični plazmidi identifikovani za određene gene, kao na pr. geni za citratnu permeazu (cit geni) koji su locirani na plazmidu veličine 5 Md kod *Str. diacetylactis* (Kempler i McKay 1979), dok u drugim slučajevima, za prt gene još nije utvrđena tačna plazmidna lokacija. Moguće je, da su i druga svojstva kao što je stvaranje nizina (Fuchs i dr. 1975, Kozak i dr. 1974), otpornost prema solima (Efstathiou i McKay 1976), a takođe, modifikaciono-restrikcioni enzimi koji omogućuju otpornost prema bakteriofagima (Pearce 1978, Sanders i Klaenhammer 1980), kodirana plazmidima.

### Genetička modifikacija sojeva

Najjednostavniji način za genetičku modifikaciju sojeva je izolacija mutanata koji nastaju spontano ili usled tretmana ćelija sa hemikalijama, odnosno UV ili jonizujućim zračenjem. Na taj način su izolovani mutanti sa većom otpornošću prema fagima (Dilanyan i dr. 1970), povećanom produkcijom kiseline i diacetila (Bannikova i Mytnik 1971, Grinevich i Sidorova 1970). Problem kod upotrebe mutagena je u nespecifičnosti, tj. i druga svojstva mogu biti istovremeno promenjena. Šta više, kod mutacija koje nastaju na pojedinačnim genima, reverzija je veoma česta, tako da su takvi mutanti prilično nestabilni.

### Konjugacija

Plazmid koji kontroliše procese uključene u transfer gena iz ćelije donora u ćeliju recipijenta je dobro poznat kod gram negativnih bakterija (Willetts 1972). Kod streptokoka N grupe, do sad su poznata dva sistema konjugacije. Jedan sistem koristi »sticky« mutacije kod *Str. lactis* (Gasson i Davies

1979, Gasson i Davies 1980, McKay i dr. 1980). U ovom slučaju frekvencija transfera je velika, ali se može primeniti kod malog broja sojeva. Drugi sistem koristi »promiskuitetni« plazmid pAMB koji nosi gene za rezistenciju prema eritromicinu i koji je prebačen iz *Str. faecalis* u različite vrste roda *Streptococcus* (Clewel i dr. 1974, LeBlanc i Hassel 1976, LeBlanc i dr. 1978) kao i u *L. casei* (Gibson i dr. 1979). Konjugacija je veoma koristan proces, koji se odvija velikom efikasnošću i može pokrenuti transfer znatnih količina kako plazmidne tako i hromozomske DNK. Šta više, veoma transmisivni plazmid pAMB omogućuje genetičku vezu između različitih vrsta streptokoka i nekih laktobacila (Gasson i Davies 1980a, Davies i Gasson 1981, Gibson i dr. 1979).

### Transdukcija

Transfer gena pomoću bakteriofaga je ostvaren prvi put kod vrste *Str. lactis*. Plazmidni geni za laktozu, proteinazu i rezistenciju na eritromicin, a također hromozomski geni za hidrolizu maltoze i manoze su na ovaj način transdukovani u ove sojeve (McKay i dr. 1973).

Takođe, indukcijom bakteriofaga *Str. cremoris*, transdukovani su lak geni u *Str. lactis* (lak-) soj (Snook i dr. 1981).

Količina DNK koja se prebacuje transdukcijom je ograničena kapacitetom glave faga i to je činjenica koja umanjuje značaj ove metode kada je u pitanju konstrukcija soja, ali u isto vreme to je tehnika za fino genetičko mapiranje laktoznog plazmida (Campbell 1971, Novic 1969, Anderson i McKay 1977).

### Fuzija protoplasta

Ova metoda se uveliko koristi kod vrsta iz roda *Bacillus* (Schaeffer i dr. 1976) i *Streptomyces* (Hopwood 1981), a odnedavno je primenjena i kod bakterija mlečne kiseline. Upotrebom odgovarajućih enzima otklanja se ćelijski zid, protoplasti se spajaju i njihovi kompletni genomi se mešaju, zatim se regeneriše ćelijski zid i bakterija se umnožava. Primena fuzije protoplasta je genetička metoda ogromnih mogućnosti za poboljšanje osobina industrijskih sojeva. Pošto je proces fuzije potpuno nespecifičan, to je kombinovanje celih genoma široko primenljivo.

Dosadašnje informacije o praktičnim rezultatima, pokazuju da je ovom tehnikom izvršen transfer lak i eri gena, a takođe je postignuta rekombinacija hromozomskih gena za rezistenciju prema nekim antibioticima (Gasson 1980a).

### Transformacija

Transformacija, kao genetička metoda, primenjuje se kod streptokoka grupe F (Hershfiel 1979) i H (Hehnke i Ferretti 1980). Nedavno je uspešno izvršena transformacija protoplasta *Str. lactis*, sa laktoznim plazmidom iz drugog soja, koji je prethodno skraćen transdukcijom na 20 Md (Kondo i McKay 1982). Dalji razvoj efikasnog sistema transformacije je osnovni preduslov za svaki pokušaj genetičkog inženjeringa kod ovih bakterija.

## Bakteriofaci

Fenomen bakteriofaga kod streptokoka N grupe, ispituje se već duže vreme (Reiter 1949, Sandine i dr. 1962, Keogh i Shimmin 1969, McKay i Baldwin 1973). Upotrebom indukujućih agenasa, utvrđeno je da su mnogi sojevi streptokoka grupe N lizogeni, odnosno nose bakteriofage u ćeliji (Lowrie 1974, Kozak i dr. 1973). Obzirom da lizogeni sojevi mogu biti značajan izvor faga u mlekarstvu, neke laboratorije su razvile metode za indukciju faga (Lawrence i dr. 1976, Huggins 1977, Park 1975). Pošto restrikcioni enzimi stvaraju zaštitu protiv faga, prave se pokušaji da se stvore fag rezistentni sojevi starter kultura, upotrebom plazmida koji kontrolišu modifikacione enzime (Lawrence i dr. 1976, Arber 1971).

## Genetički inženjering

Veoma uspešni eksperimenti u oblasti genetičkog inženjerstva, skreću sve veću pažnju istraživača, a također, u nekim zemljama se razvija i komercijalna proizvodnja bazirana na ovoj novoj biotehnologiji.

Ove tehnike se zasnivaju na procesima enzimatskog isecanja gena, koji se prebacuju, na DNK plazmida ili faga, koji se zatim ubacuje u ćeliju bakterije ili kvasca, gde se repliciraju. Da bi se primenile tehnike genetičkog inženjerstva kod bakterija mlečne kiseline, potrebna su detaljnija saznanja na molekularnom nivou gena, plazmida, sistema transformacije itd. Do danas, ne raspolazemo sa svim potrebnim saznanjima o ovim bakterijama, ali intenzivnim genetičkim istraživanjima u prethodno navedenim oblastima, verovatno će se uskoro razviti i primeniti potrebna tehnologija.

## Mogućnost primene

Smatra se da ispitivanja u oblasti genetike industrijskih sojeva bakterija mlečne kiseline, mogu naći primenu pre svega u mlekarskoj industriji pa i šire.

Moguće je rešiti problem nestabilnosti starter kultura prebacivanjem laktoznih gena sa plazmida na hromozom i na taj način stabilizovati svojstvo u ćeliji u čemu su već uspeli McKay i dr. 1973. Povećavajući broj kopija gena, moguće je povećati nivo njihovih produkata, na pr. mlečne kiseline ili nizina.

Skraćivanje vremena potrebnog za zrenje sireva može se postići povećanjem proizvodnje postojećih starter enzima ili ubacivanjem gena u starter kulture za proizvodnju drugih odgovarajućih enzima.

Upotreba liofiliziranih startera za direktnu inokulaciju, danas je u centru pažnje. Moguće je metodom fuzije protoplasta proširiti broj sojeva sa dobrom otpornošću na liofilizaciju.

Veoma često se u proizvodnji koriste sojevi više kultura, pošto nijedan pojedinačni soj ne poseduje sve potrebne osobine. Transferom određenih gena, moguće bi bilo dobiti soj koji nosi dve ili više potrebnih osobina i na taj način smanjiti broj sojeva, što znači jednostavniju kombinaciju starter kultura, a također i njihovo jednostavnije održavanje.

Smatra se također, da se problemi u proizvodnji, nastali usled aktivnosti bakteriofaga, odnosno prisustva antibiotika, mogu prevazići dobijanjem novih sojeva, koji se odlikuju većom stabilnošću i većom specifičnom rezistencijom nego ona što je dobijena mutagenozom.

Osim navedenog može se reći da su bakterije mlečne kiseline našle primenu i u drugim oblastima prehrambene industrije i tehnologija razvijena za bakterije mlečne kiseline biće podjednako primenljiva i u ovim procesima.

### Zaključak

Ranija opažanja da su neka vrlo važna industrijska svojstva bakterija mlečne kiseline, kao što su razlaganje laktoze i proteina mleka, često nestabilna, utjecala su da su se genetička ispitivanja ovih bakterija skoncentrisala na ispitivanje njihovih plazmidnih komplemenata sa različitih aspekata. Iako je lokacija pojedinih gena na plazmidima još nejasna, postoje dokazi da pojedini određeni plazmidni molekuli nose tzv. citratne (cit), laktozne (lak) i proteinazne (prt) gene. Od postojećih metoda koje se koriste za transfer gena i modifikaciju genoma bakterija, transdukcija, konjugacija i fuzija protoplasta se uspešno koriste kod ovih bakterija. Tek nedavno, upotrebom protoplasta kao recipijenta, izvršena je transformacija *Str. lactis* sa plazmidnom DNA. Dosadašnja znanja o genetici bakterija mlečne kiseline naglo se povećavaju i mogućnosti izmene sojeva putem genetičkih metoda danas predstavljaju realnu mogućnost. Visoko frekventni sistemi konjugacije kao onaj koji koristi promiskuitetni plazmid pAMB, ili fuzija protoplasta, nude za sada najbolju primenu. Drugi sistemi će igrati važnu ulogu u konstrukciji novih sojeva u laboratorijskim uslovima. Kroz ove metode, zajedno sa primenom tehnike kloniranja kod streptokoka, novo polje genetike bakterija mlečne kiseline će se veoma brzo razvijati.

### Literatura

- ANDERSON, D. G., MC KAY, L. L. (1977): **J. Bacteriol.** **129**; 367—377.  
BANNIKOVA, L. A., MYTNIK, L. G. (1971): **Moloch. Form.** **32** (4) 18—21.  
BEHNKE, D., FERRETTI, J. J. (1980): **J. Bacteriol.** **144**, 806—813.  
CAMPBELL, A. (1977): In *The Bacteriophage LAMBDA* (Ed. A. D. Hereshy), p. 13, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.  
CHASSY, B. M., GIBSON, E. M., GIUFFRIDA, A. (1976): **J. Bacteriol.** **127**, 1576—1578.  
CHASSY, B. M., GIBSON, E. M., GIUFFRIDA, A. (1978): **Current Microbiol.** **1**, 141—144.  
CLEWELL, D., B., YAGI, Y., DUNNY, G. M., SCHULTZ, S. K. (1974): **J. Bacteriol.** **117**, 283—289.  
CORDS, B. R., MC KAY, L. L., GUERRY, P. (1974): **J. Bacteriol.** **117**; 1149—1152.  
DAVIES, F. L., UNDERWOOD, H. M., GASSON, M. J. (1981a): **J. Appl. Bacteriol.** **51**; 325—337.  
DAVIES, F. L., GASSON, M. J. (1981): **J. Dairy Res.** **48**; 363—376.  
DILANYAN, Z. KH., MAKARION, K., SARKISAYN, R. (1970): XVIII Int. Dairy Congr. 1E:122.  
EFSTATHIOU, J. D., MC KAY, L. L. (1976): **Appl. Environ. Microbiol.** **32**; 38—44.  
FUCHS, P. G., ZAJDEL, L., DOBRZANSKI, W. T. (1975): **J. Gen. Microbiol.** **88**; 189—192.  
GASSON, M. J., DAVIES, F. L. (1979): **Soc. for Gen. Microbiol. Quart.** **6**; 87.  
GASSON, M. J., DAVIES, F. L. (1980a): **FEMS Microbiol. Lett.** **7**; 51—53.  
GASSON, M. J., DAVIES, F. L. (1980b): **J. Bacteriol.** **143**; 1260—1264.  
GIBSON, E. M., CHACE, N. M., LONDON, S. B., LONDON, J. (1979): **J. Bacteriol.** **137**; 614—619.  
GRINEVICH, A. G., SIDOROVA, I. N. (1970): XVIII Int. Dairy Congr. 1E: 121.  
GUERRY, P., LEBLANC, D. J., FALKOW, S. (1973): **J. Bacteriol.** **137**; 614—619.  
HERSHFIELD, U. (1979): **Plasmid** **2**; 137—149.  
HOPWOOD, D. A. (1981): **Ann. Rev. Microbiol.** **135**; 237—272.



- HUGGINS, A. R., SANDINE, W. E. (1977): **Appl. Environ. Microbiol.** 33; 184—191.
- HUNTER, G. J. E. (1939): **J. Dairy Res.** 10; 465.
- KEOGH, B. P., SHIMMIN, P. D. (1969): **J. Dairy Res.** 36; 87—93.
- KEMPLER, G. M., MC KAY, L. L. (1979): **Appl. Environ. Microbiol.** 37; 316—323.
- KLAENHAMMER, T. R., MC KAY, L. L., BALDWIN, K. A. (1978): **Appl. Environ. Microbiol.** 35, 592—600.
- KLAENHAMMER, T. R., SUTHERLAND, S. M. (1980): **Appl. Environ. Mikrobiol.** 39, 671—674.
- KONDO, J. K., MC KAY, L. L. (1982): **Appl. Environ. Microbiol.** 43, 1213—1215.
- KOZAK, W., RAJCHERT-TRZPIL, M., DOBRZANSKI, W. T. (1973): **Appl. Microbiol.** 25, 305—308.
- KOZAK, W., RAJCHERT-TRZPIL, M., DOBRZANSKI, W. T. (1974): **J. Gen. Microbiol.** 83, 295—302.
- KUHL, S. A., LARSEN, L. D., MC KAY, L. L. (1979): **Appl. Environ. Microbiol.** 37, 1193—1195.
- LARSEN, L. D., MC KAY, L. L. (1978): **Appl. Environ. Microbiol.** 36, 944—952.
- LAWRENCE, R. C., THOMA, T. D., TERZAGHI, E. E. (1976): **J. Dairy Res.** 43, 141—193.
- LOWRIE, R. J. (1974): **Appl. Microbiol.** 27, 210—217.
- LEBLANC, D. J., HASSELL, F. P. (1976): **J. Bacteriol.** 128, 347—355.
- LEBLANC, D. J., HAWLEY, R. J., LEE, L. N., ST. MARTIN, E. J. (1978): **Science, USA** 75, 3484—3487.
- LEBLANC, D. J., LEE, L. N. (1979): **J. Bacteriol.** 140, 1112—1115.
- MC KAY, L. L., BALDWIN, K. A., ZOTOLA, E. A. (1972): **Appl. Microbiol.** 23, 1090—1096.
- MC KAY, L. L., CORDS, B. R., BALDWIN, K. A. (1973): **J. Bacteriol.** 115, 810—815.
- MC KAY, L. L., BALDWIN, K. A. (1974): **Appl. Microbiol.** 28, 342—346.
- MC KAY, L. L., BALDWIN, K. A., WALSH, P. M. (1981): **Appl. Environ. Microbiol.** 40, 84—91.
- MILLS, O. E., THOMAS, T. D. (1980): New Zealand **J. Dairy Sci. Technol.** 15, 131—141.
- MOLSKNESS, T. A., SANDINE, W. E., BROWN, L. R. (1974): **Appl. Mikrobiol.** 28, 753—758.
- NOVIC, R. P. (1969): **Bacteriol. Rew.** 33, 210.
- OKULITCH, O. (1939): **Can. J. Res. Series B**, 17, 171.
- PARK, C., MC KAY, L. L. (1975): **J. Milk Food Technol.** 38, 594—597.
- PEARCE, L. E., SKIPPER, N. A., JARVIS, B. D. (1974): **Appl. Microbiol.** 27, 933—937.
- PEARCE, L. E. (1978): New Zealand **J. Dairy Sci. Technol.** 13, 166—171.
- PECHMANN, H., TEUBER, M. (1980): **Zentralblatt für Bacteriol. C** 1, 133—136.
- REITER, B. (1949): **Nature** 164, 667—668.
- SANDERS, M. E., KLAENHAMMER, T. R. (1980): **Appl. Environ. Microbiol.** 40, 500—506.
- SANDINE, W. E., ELLIKER, P. R., HAYS. (1962): **Can. J. Microbiol.** 8, 161—174.
- SCHAEFFER, P., CAMI, B., HOTCHKISS, R. D. (1976): **Proc. Nat. Acad. Sci., USA**, 73, 2151—2155.
- SNOOK RENE, MC KAY, L. L., GILBERT, A. (1981): **Appl. Environ. Microbiol.** 42, 897—903.
- SPECK, M. L. (1962): **J. Dairy Sci.** 45, 1281.
- YAWGER, E. S., SHERMAN, J. M. (1937): **J. Dairy Sci.** 20, 83.
- WILLETTS, N. (1972): **Ann. Rev. Gen.** 6, 257—268.