

Zdzisława Libudzisz

Instytut Technologii  
Fermentacji i Mikrobiologii  
Politechnika Łódzka  
Łódź

## Genetyczne determinanty metabolizmu bakterii fermentacji mlekowej

Biokonserwacja i biokonwersja żywności i paszy jest istotnym działem nowoczesnej biotechnologii, wydaje się nawet, że o ciągle rosnącym znaczeniu. W procesach tych bakterie mlekowe są obok drożdży drobnoustrojami najczęściej wykorzystywanymi w praktyce przemysłowej. Ich stosowanie umożliwia produkcję wielu fermentowanych artykułów żywnościowych, takich jak: sery twarogowe i dojrzewające, masło, śmietana, mleczne napoje, kiszonki roślinne, pieczywo na zakwasach, niektóre rodzaje wędlin oraz całej gamy orientalnych produktów spożywczych. Z udziałem bakterii mlekowych przygotowuje się również kiszonki paszowe, stanowiące istotne źródło odżywcze dla zwierząt. Bakterie wykorzystywane w tych technologiach należą do rodzajów *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*. Wielokierunkowość aplikacji bakterii mlekowych w rozmaitych procesach przetwórczych, z podkreśleniem dominującej mikroflory odpowiedzialnej za końcową jakość produktu ilustruje tab. 1.

Tabela 1

Bakterie mlekowe wykorzystywane w przetwórstwie spożywczym

Przetwórstwo	Dominujące gatunki bakterii
fermentowane produkty mleczarskie	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>Leuconostoc lactis</i> <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i>
fermentacja warzyw	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
fermentacja mięsa i ryb	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus leichmani</i>
napoje: – alkoholowe – kawa, kakao	<i>Leuconostoc oenos</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> różne gatunki bakterii mlekowych
sosy sojowe	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Pediococcus soyae</i>
fermentowane pieczywo	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus sanfrancisco</i>

Fermentacja mlekowa nadaje żywności nie tylko korzystny smak i aromat, hamuje także rozwój mikroflory przetrwalnikującej i chorobotwórczej. Należy podkreślić, że większość fermentowanych produktów zawiera żywe bakterie mlekowe, których terapeutyczne właściwości są udokumentowane w leczeniu schorzeń jelitowych, zwiększaniu odporności organizmu, kontroli poziomu cholesterolu we krwi, uznawane są również za czynnik przeciwnowotworowy.

Pomimo nie kwestionowanego znaczenia bakterii fermentacji mlekowej wiedza o ich fizjologii, metabolizmie i budowie genetycznej jest jeszcze dalece niewystarczająca. Obecnie ponad 40 ośrodków naukowych na świecie prowadzi badania z tego zakresu. W 1989 r. w ramach tzw. „Laboratorium bez granic” (European Laboratory Without Walls-ELWW) sponsorowanego przez Wspólnotę Europejską został utworzony zespół badawczy współpracujący w dziedzinie biotechnologii bakterii fermentacji mlekowej. Podstawowe zagadnienia, których rozwiązanie jest planowane w ramach ELWW, obejmują poznanie systemów naturalnego przenoszenia genów, funkcjonalnej i molekularnej charakterystyki plazmidów, sposobów stabilizacji szlaków metabolicznych kodowanych przez geny plazmidowe, a także czynników kontrolujących ekspresję genów u bakterii mlekowych.

Najbardziej zaawansowane badania systemów przekazywania informacji genetycznej u bakterii mlekowych dotyczą problemów najistotniejszych dla praktyki przemysłowej, a mianowicie kodowania katabolizmu węglowodanów, metabolizowania białek i cytrynianu w mleku, mechanizmów oporności na bakteriofagi, zdolności wytwarzania i oporności na substancje antybiotyczne oraz wrażliwości na jony metali. Intensyfikacji wymagają natomiast badania zmierzające do wyjaśnienia mechanizmów genetycznego kodowania zdolności pewnych szczepów *L. acidophilus* i *B. bifidum* do kolonizacji przewodu pokarmowego człowieka i zwierząt, zdolności detoksyfikacji prokancerogenów i kancerogenów, braku wrażliwości na aglutynację oraz zdolności produkcji polimerów (6,68).

## 1. Aparat genetyczny bakterii fermentacji mlekowej

Niejednorodność diagnostyczna bakterii mlekowych znalazła odbicie w ich budowie genetycznej. Geny bakterii *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* i ssp. *cremoris* są ukonstytuowane w cząsteczkę DNA chromosomalnego o wielkości od 2,3 do 2,6 Mb (1500–1700 MDa), przy czym wyższe masy cząsteczkowe są charakterystyczne dla genomów *L. lactis* ssp. *cremoris* (44). Rozmiar genomów badanych szczepów *S. salivarius* ssp. *thermophilus* wynosi od 1690 do 2012 kb, zazwyczaj ok. 1900 kb, (44,56).

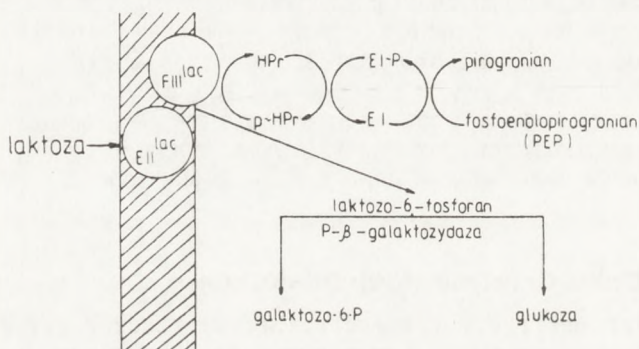
Poza DNA chromosomalnym geny bakterii mlekowych są bardzo często zlokalizowane w DNA plazmidowym. Genetyka bakterii mlekowych w znacznie większym stopniu zajmuje się plazmidowym niż chromosomalnym DNA. Wynika to z faktu, że większość genów kodujących właściwości istotne dla przetwórstwa spożywczego jest zlokalizowana właśnie w plazmidach. Prezentowany przegląd osiągnięć w badaniach genetyki bakterii fermentacji mlekowej jest głównie poświęcony tym zagadnieniom.

Liczba plazmidów w komórkach bakterii z rodzaju *Lactococcus* może się wahać zależnie od szczepu od 2 do 11, najczęściej spotyka się od 4 do 7 plazmidów (26,49,50,75). Masa cząsteczkowa plazmidów wynosi od 1 do 90 MDa, część z nich ma charakter kryptyczny, a więc dotąd nie znamy ich funkcji. Profil plazmidowy szczepów jest wykorzystywany do identyfikacji składu mieszanych populacji (10,75) oraz wskazuje na stopień pokrewieństwa bakterii mlekowych (10,16).

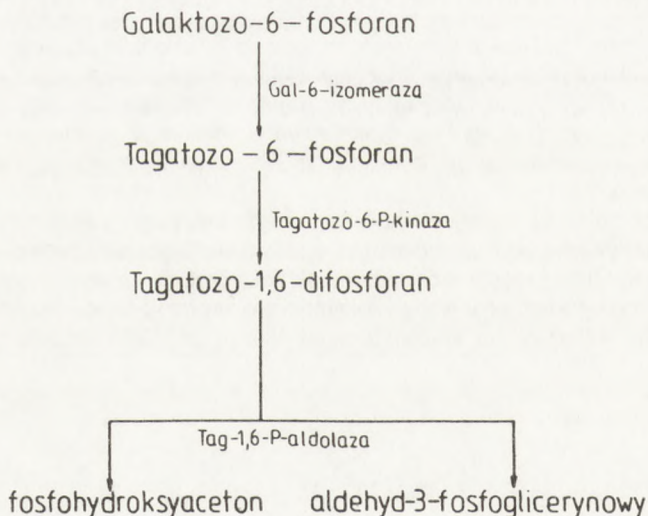
## 2. Genetyczne determinanty metabolizmu bakterii z rodzaju *Lactococcus*

### 2.1. Metabolizm laktozy

Zdolność bakterii mlekowych do fermentowania laktozy jest ich podstawową właściwością technologiczną. Już w latach trzydziestych w warunkach przemysłowych obserwowano pojawianie się spontanicznych odmian niezdolnych do wzrostu w mleku. Częstość ich występowania jak wykazali McKay i wsp. (52), zwiększa się podczas hodowli w obecności barwników akrydynowych lub w podwyższonej temperaturze, wskazuje to na rolę plazmidowego DNA w kodowaniu tej cechy. Obecnie istnieją już fizyczne dowody, że za zdolność paciorkowców mlekowych do fermentowania laktozy odpowiedzialne są geny zlokalizowane w DNA plazmidowym o wysokiej masie cząsteczkowej, od ok. 30 do 67 MDa (26,38,50) (tab. 2). Wykazano ponadto (rys. 1), że są to geny kodujące dwa specyficzne białka systemu transportu laktozy za pomocą fosfotransferazy zależnej od fosfoenolpirogonianu (PEP:PTS), a mianowicie  $E II^{lac}$  oraz  $F III^{lac}$ , a także fosfo- $\beta$ -galaktozydazę, enzym rozszczepiający laktozę (1,49).



Rys. 1. Transport laktozy do komórek bakterii mlekowych przy udziale systemu PEP:PTS (wg Thompsona, (74)).



Rys. 2. Metabolizm galaktozy przez paciorkowce mlekowe (wg Kandleira, (31)).

Crow i wsp. (14) stwierdzili, że również geny odpowiedzialne za syntezę trzech kluczowych enzymów szlaku tagatozy, tj. izomeryzy galaktozofosforanowej, 6-fosfotagatozokinazy oraz aldoazy tagatozobisfosforanowej (rys. 2) zlokalizowane są u szczepów *L. lactis ssp. lactis* C10, H1 i 133 w plazmidzie laktozowym. Interesujące jest to, że odmiany nie zawierające plazmidu *lac* zdolne są do wykorzystywania galaktozy, w znacznie jednak wolniejszym stopniu; są to tzw. odmiany Lac<sup>-</sup> Gal<sup>d</sup>. Wyjaśniono, że szczepy *L. lactis ssp. lactis* poza specyficznym dla galaktozy systemem PEP:PTS (63) mogą transportować ten cukier również przy udziale permeazy zależnej od ATP (szlak Leloir'a) (42,51,74), prawdopodobnie kodowanej genami zlokalizowanymi w chromosomalnym DNA (26).

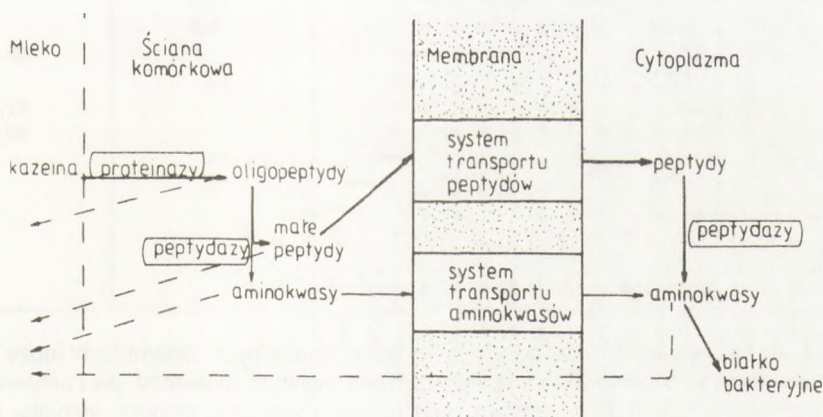
## 2.2. Aktywność proteolityczna

Bakterie fermentacji mlekowej cechują się wysokimi wymaganiami pokarmowymi, szczególnie w stosunku do źródła azotu. W mleku, w którym stężenie wolnych aminokwasów jest niskie, zaledwie rzędu 70 µg/ml (57), możliwe jest osiągnięcie gęstości komórek wynoszące ok. 8–16% w porównaniu z warunkami nielimitowanymi. Taki poziom bakterii jest niewystarczający dla zabezpieczenia odpowiedniej dla celów technologicznych produkcji kwasu mlekowego. Właściwy rozwój bakterii mlekowych w mleku jest zatem w znacznym stopniu zależny od ich zdolności rozkładu białek mleka, przede wszystkim kazeiny, a zatem od wyposażenia komórek w enzymy proteolityczne.

System enzymów proteolitycznych bakterii mlekowych jest trudny do zdefiniowania ze względu na dużą liczbę enzymów oraz znaczne ich zróżnicowanie w komórkach poszczególnych gatunków, a nawet szczepów. Obejmuje zarówno proteinazy jak i peptydazy, przy czym niektóre z nich mogą być wydzielane pozakomórkowo.

Proteinazy bakterii mlekowych zlokalizowane w ścianie komórkowej hydrolizują białka mleka do polipeptydów. Polipeptydy są następnie degradowane przez peptydazy do mniejszych jednostek, które mogą już być transportowane do wnętrza komórek (41,73). Wielkość tych peptydów nie może przekraczać 4–6 jednostek aminokwasowych (72). Funkcjonowanie systemu proteolitycznego bakterii mlekowych przedstawiono na rys. 3.

Badania biochemiczne proteinaz paciorkowców mlekowych wykazały, że są to białka o masie od 80 do 145 kDa i optymalnym pH działania w zakresie 5,5–6,5, aktywowane bądź stabilizowane jonami Ca (38,73).



Rys. 3. Wykorzystanie kazeiny przez bakterie mlekowe (wg Thomasa i Pritcharda, (73)).

Tworzenie proteinaz u bakterii z rodzaju *Lactococcus* jest cechą niestabilną. Obserwuje się często pojawianie spontanicznych odmian  $\text{Prt}^-$  niezdolnych do ukwaszenia mleka w ciągu 24 godzin; są to tzw. odmiany *slow*. Szczepy dzikie ( $\text{Prt}^+$ , tzw. szczepy *fast*) dają skrzep mleka już po 16–18 godzinach. Łatwość utraty zdolności trawienia białek, szczególnie po traktowaniu bakterii barwnikami akrydynowymi, bromkiem etydyny oraz po hodowli w podwyższonej temperaturze, wskazuje na plazmidowe kodowanie cechy *prt*. Identyfikacja plazmidów proteinazowych wykazała, że ich rozmiary mogą się wahać od ok. 2,2 do 62 MDa. U części szczepów geny decydujące o aktywności proteolitycznej są zlokalizowane w plazmidzie, w którym znajdują się również geny odpowiedzialne za metabolizm laktozy (tab. 2).

Tabela 2

Umiejscowienie genów laktozowych i proteinazowych u *Lactococcus* sp.  
(wg Gasson i Davies (26) oraz Kok (38))

Podgatunek i szczep		Rozmiar plazmidu (MDa)		
		Lac	Prt	Lac/Prt
<i>lactis</i>	C2		18/12,5	45
	712			37,3
	ML3			33,0
	763			36,7
	C10			40,0
	M18			45,0
	DRC1			31,0
	UC317			46,0
	DR1251	32		
	H1	33		
	18-16	41		
	DRC3	52		
	11007	32		
<i>cremoris</i>	HP		9	
	ML1		2,2	
	Wg2		16,0	
	Sk11		48,0	
	UC205		23,0	
	UC411		20,0	
	P8/2/47		9,3	
	H2			63
	SD8,SD9,SD11		62	
	V16			62,7
	V18			62,0
	1200		14	
	M12R		13	
	B1	37		
	C3	34/27		
R1	34			
EB7	42			

Uważa się, że występowanie genów *prt* i *lac* w oddzielnych plazmidach może wynikać z fragmentacji dużego plazmidu, kodującego zarówno metabolizm laktozy, jak i aktywność proteolityczną. Dowodem jest podobieństwo map genetycznych otrzymanych techniką trawienia endonukleazami restrykcyjnymi odmian  $\text{Prt}^+ \text{Lac}^+$  i  $\text{Prt}^- \text{Lac}^+$ ; u tych ostatnich wykazano jedynie delecję pewnego regionu DNA (26).



Już w latach sześćdziesiątych wykazano, że *var. diacetylactis* może spontanicznie tracić zdolność fermentowania cytrynianu bez możliwości rewersji tej cechy (13). Ponadto stwierdzono, że po traktowaniu komórek oranżem akrydyny częstość konwersji odmian  $Cit^+$  do  $Cit^-$  jest bardzo wysoka; może sięgać aż do 5% (32). Wskazuje to wyraźnie na plazmidową lokalizację genów kodujących enzymy przemiany cytrynianu u szczepów odmiany *diacetylactis*. Ostateczne jednakże dowody uzyskano po wykazaniu korelacji pomiędzy utratą cechy  $Cit^-$  i utratą plazmidu o masie cząsteczkowej 5,5 MDa (32).

Po eliminacji tego plazmidu z komórek *L. lactis ssp. lactis var. diacetylactis* obserwowano utratę aktywności permeazy cytrynianowej. Odmiany  $Cit^-$  zachowały jednakże aktywność liazy cytrynianowej. Kempfer i McKay (33) z wykorzystaniem techniki trawienia endonukleazami restrykcyjnymi wykazał, że 5,5 MDa plazmidy z komórek szczepów DRC1, DRC3, 11007 18-16 i WM4 były identyczne. Podobne wyniki uzyskał również Gasson (26) dla szczepu 176. Mapę genetyczną plazmidu pCT176 przedstawiono na rys. 4.

## 2.4. Tworzenie bakteriocyn

Produkcja przez niektóre szczepy bakterii fermentacji mlekowej substancji antagonistycznych jest zjawiskiem znanym od wielu lat. Już w 1928 r. Rogers (47) wykazał, że *L. lactis* ma zdolność hamowania rozwoju *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Odpowiedzialny za ten efekt okazał się polipeptyd, antagonistyczny również w stosunku do innych gramdodatnich bakterii z rodzaju *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* i *Clostridium*. Substancja ta została nazwana nizyną. Jej odkrycie spowodowało duże zainteresowanie zdolnością tworzenia związków antagonistycznych przez bakterie mlekowe. Związki te, nazywane bakteriocynami mogą być produkowane również przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *S. salivarius ssp. thermophilus* (3). Szczególnie wielu producentów bakteriocyn znajdujemy wśród bakterii z rodzaju *Lactobacillus*.

Klaenhammer (37) wyróżnia dwa typy bakteriocyn. Pierwszy – o wąskim spektrum aktywności, tylko w stosunku do pokrewnych bakterii oraz drugi – o szerokim zakresie działania, w stosunku do innych bakterii gramdodatnich, w tym również *Clostridium botulinum* i *Listeria monocytogenes*. Znany jest również związek białkowy (5,4 kDa) produkowany przez *L. acidophilus*, aktywny w stosunku do bakterii gramujemnych z rodzaju *Salmonella*, *Shigella* i *Pseudomonas* (55).

Zaledwie część tworzonych przez bakterie mlekowe bakteriocyn ma ustaloną budowę chemiczną. Najlepiej scharakteryzowaną jest nizyna – peptyd o masie cząsteczkowej 3500 nie zawierający aminokwasów aromatycznych, zawierający natomiast nietypowe aminokwasy siarkowe, takie jak lantionina i  $\beta$ -metylolantionina. Określono ponadto budowę produkowanej przez *L. acidophilus* laktacyny B, substancji białkowej o masie 6000–6500 Da (4). Są również doniesienia o niskocząsteczkowych (200–700 Da), niebiałkowych substancjach antagonistycznych, w większości o nieznanym budowie chemicznej (47). Ostatnio udało się określić budowę produkowanej przez *L. reuteri* reuteryny aktywnej w stosunku do bakterii gramujemnych, gramdodatnich, drożdży, pleśni i pierwotniaków. Reuteryna jest równoważną mieszaniną uwodnionego monomeru i cyklicznego dimeru aldehydu 3-hydroksypropionowego (71).

Pierwsze informacje dotyczące lokalizacji genetycznych determinantów biosyntezy nizyny pochodzą już z 1974 r. (40), kiedy stwierdzano wysoką, ok. 2–8%, częstość tworzenia odmian  $Nis^-$  po hodowli w obecności akrydyny, bromku etyldyny, proflawiny oraz w podwyższonej temperaturze. Dopiero jednak w latach osiemdziesiątych wykazano, że cecha nizynotwórczości jest skorelowana z 28 MDa plazmidem u *L. lactis* 11454 (43). Funkcję taką spełnia 30 MDa plazmid u 8 badanych przez Gassona szczepów (24) oraz 17,5 MDa plazmid u *L. lactis* 7962 (76). Zdolność biosyntezy nizyny jest genetycznie powiązana z opornością na nizynę i zdolnością do fermentowania sacharozy (plazmid SN). Właściwości te mogą być przenoszone na drodze ko-

niugacji pomiędzy paciorkowcami mlekowymi (24,28,69), jak również do *Leuc. dextranicum* (76). Są również wyniki wskazujące na możliwość kodowania produkcji nizyny genami chromosomalnymi (15). Szczepy te, jako bardziej stabilne, powinny być stosowane w przemysłowej produkcji nizyny. W latach 88–89 dwa laboratoria doniosły o wyizolowaniu i zsekwencjonowaniu genu nizynowego (5,30).

Uzyskano również dowody genetyczne i fenotypowe na występowanie 88 MDa plazmidu bakteriocynowego u *L. lactis ssp. lactis var. diacetylactis* WM4 (53). Neve i wsp. (59) zidentyfikowali 40 MDa plazmid – bakteriocynowy szczepów *L. lactis ssp. cremoris* 4G6 i 9B4 oraz 75 MDa plazmid u *L. lactis ssp. lactis var. diacetylactis* 6F7. Analiza tych plazmidów z wykorzystaniem techniki trawienia endonukleazami restrykcyjnymi wykazała, że 40 MDa plazmidy szczepów *ssp. cremoris* są identyczne z częścią 75 MDa plazmidu *ssp. lactis var. diacetylactis* 6F7.

## 2.5. Oporność na bakteriofagi

Jednym z głównych problemów przemysłu mleczarskiego są zakłócenia technologiczne związane z infekcjami bakteriofagowymi. Badania z ostatnich lat wykazały, że bakterie mlekowe są wyposażone w mechanizmy obronne, z których do tej pory udało się zidentyfikować takie systemy jak (36,64):

- restrykcji i modyfikacji (R/M),
- ochrony przed adsorpcją fagów,
- poronnej infekcji ograniczający reprodukcję cząstek fagowych.

Systemy restrykcji i modyfikacji występujące często u paciorkowców mlekowych, stanowią nie tylko barierę przed infekcjami fagów heterologowych, lecz również są istotnym czynnikiem ograniczającym rozwój gospodarzy dla fagów występujących w danym zakładzie mleczarskim. Biochemiczna charakterystyka systemów R/M jest praktycznie ograniczona do identyfikacji endonukleazy restrykcyjnej typu II Scr FI, u *L. lactis ssp. cremoris* F dokonanej przez Fitzgeralda i wsp. (21). Poza tą informacją brak jest w dostępnej literaturze danych na temat enzymów restrykcyjnych i systemów modyfikacji u paciorkowców mlekowych.

Znaczenie plazmidowego DNA w kodowaniu fagooporności paciorkowców mlekowych zostało po raz pierwszy zasugerowane przez Collinsa (12), który wykazał, że 4–miesięczne pasażowanie kultur w mleku powoduje stopniowe narastanie wrażliwości na fagi. Podobnie jak zdolność fermentowania laktozy i aktywność proteolityczna, fagooporność bakterii mlekowych została uznana za cechę niestabilną genetycznie. Również Limsowtin i wsp. (45) donieśli o szybkim pojawianiu się fagowrażliwych odmian podczas hodowli w podłożu bulionowym M17. Fizyczne dowody na znaczenie plazmidowego DNA w kodowaniu mechanizmów obrony przed atakiem bakteriofagów uzyskano dopiero w latach 1980–1981 w zespole Klienhammera (36,64,65). Wyizolowane odmiany *L. lactis ssp. cremoris* KH wykazujące podwyższoną fagowrażliwość nie zawierały plazmidu pME100 o masie cząsteczkowej 10 MDa (65). Obniżony poziom zarówno aktywności restrykcji, jak i modyfikacji wskazywał na genetyczne powiązanie tych dwóch mechanizmów. Stwierdzenie jednakże pewnego poziomu aktywności R/M u odmian nie zawierających plazmidu pME100 wskazywało dodatkowo na występowanie więcej niż jednego systemu R/M oraz, że geny odpowiedzialne za tę aktywność mogą być również zlokalizowane w DNA chromosomalnym.

Istnienie jednocześnie kilku systemów R/M u paciorkowców mlekowych potwierdzono dla szczepów *L. lactis ssp. lactis* IL594. Uzyskane odmiany o różnej kombinacji 9 plazmidów wykazywały zróżnicowaną wrażliwość na różne bakteriofagi, zależnie od tego czy zawierały plazmid pIL 6 (17,5 MDa) lub pIL 7 (20,7 MDa) (9). Gautier i Chopin (27) wykazali również dla szczepu *L. lactis ssp. cremoris* IL964 istnienie dwu plazmidów odpowiedzialnych za aktywność R/M, a mianowicie pIL103 (3,8 MDa) i pIL107 (10,1 MDa). Szczep IL964 zawierał ponadto plazmid pIL 105 (5,8 MDa) odpowiedzialny za system poronnej infekcji. Odmienne od tych szcze-



pów, *L. lactis ssp. cremoris* M49 był wyposażony tylko w jeden system R/M, kodowany przez geny umiejscowione na 20 MDa plazmidzie pLR1020 (70).

Adsorpcja cząstek fagowych na powierzchni komórki jest niezbędna dla powodzenia infekcji. System obrony przed adsorpcją jest u bakterii mlekowych również kodowany genami plazmidowymi. Fizyczne dowody uzyskano na istnienie plazmidów pME0030 (30 MDa) i pSK112 (34 MDa) odpowiedzialnych za system ochrony przed adsorpcją fagów na komórkach *L. lactis ssp. lactis* ME2 (66) i *L. lactis ssp. cremoris* SK11 (19). System blokowania adsorpcji kodowany przez plazmid pME0030 był jednym z kilku mechanizmów obronnych wykazanych dla szczepu ME2, w przeciwieństwie do szczepu *L. lactis ssp. cremoris* SK11, dla którego był to jedyny system ochronny przed atakiem fagów.

Pierwsze informacje o występowaniu u bakterii mlekowych systemu poronnej infekcji pochodzą z badań McKaya i Baldwina z 1984 r. (54), którzy stwierdzili występowanie u *L. lactis ssp. lactis var. diacetylactis* D65 plazmidu o masie cząsteczkowej 40 MDa (pNP40) niosącego geny oporności na nizynę i na bakteriofagi. Kodowany przez ten plazmid system okazał się wrażliwy na temperaturę i ulegał inaktywacji w 40°C. Podobny system wykazano u *L. lactis ssp. lactis* ME2 (67), kodowany przez geny zlokalizowane w plazmidzie pTR2030 (30 MDa). Kultury zawierające ten plazmid charakteryzowały się 10-krotnie niższą wydajnością cząstek fagowych niż odmiany pozbawione plazmidu. Informacje o plazmidach niosących geny kodujące systemy ochronne przed infekcją bakteriofagów u paciorkowców fermentacji mlekowej zestawiono w tab. 3.

Tabela 3

**Plazmidy oporności na bakteriofagi u paciorkowców mlekowych  
(wg 9,19,25,27,36,66,70)**

Plazmid	Rozmiar (MDa)	Mechanizm oporności
pIL6	17,5	restrykcja/modyfikacja
pIL7	20,7	restrykcja/modyfikacja
pTN20	20	restrykcja/modyfikacja
pIL107	10,1	restrykcja/modyfikacja
pLR1020	20	restrykcja/modyfikacja
pIL103	3,8	restrykcja/modyfikacja
pNP40	40	poronna infekcja
pTR2030	30	poronna infekcja
pCJ750	50	poronna infekcja
pCJ1829	29	poronna infekcja
pBUJ-80	40	poronna infekcja
pLJ105	8,7	poronna infekcja
pME0030	30	blokowanie adsorpcji
pSK112	34	blokowanie adsorpcji

## 2.6. Inne właściwości

Poza szeroko prowadzonymi badaniami genetycznych determinantów podstawowych dla praktyki przemysłowej uzdolnień paciorkowców mlekowych są również w literaturze informacje o lokalizacji w plazmidzie laktozowym u *L. lactis ssp. lactis* C2 genów oporności na arseniany, arseniny, chromiany oraz wrażliwości na miedź (20). Chopin i wsp. (11) wykazali ponadto, że geny podwyższonej oporności szczepu *L. lactis ssp. lactis* IL594 na promieniowanie UV mieszczą się w 22 MDa plazmidzie. Uzyskano również dowody na znaczenie plazmidowego DNA w kodowaniu zdolności *L. lactis ssp. lactis* 354-07 do metabolizowania glukozy i mannozy oraz szczepu *L. lactis ssp. lactis* DR1253 do wykorzystywania ksylozy (50).

Prezentowane wyniki badań nad systemami genetycznej regulacji metabolizmu paciorkowców mlekowych wskazują na ogromne zróżnicowanie, również międzyszczepowe tej grupy bakterii. Może to wyjaśnić ich fizjologiczną i metaboliczną zmienność, umożliwiającą jednocześnie wykorzystanie tych bakterii w różnych procesach biotechnologicznych.

### 3. Genetyczne determinanty metabolizmu bakterii z rodzajów *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Streptococcus*

W przeciwieństwie do mezofilnych paciorkowców mlekowych termofilny *S. salivarius ssp. thermophilus* jest gatunkiem ubogim w plazmidy, podobnie zresztą jak jego jogurtowy partner *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Większość opisanych szczepów *S. salivarius ssp. thermophilus* izolowanych zarówno z mleka, ze szczepionek przemysłowych, jak i ze szczepów kolekcyjnych nie zawiera plazmidów (tab. 4).

Tabela 4

Zawartość plazmidów w komórkach *S. salivarius ssp. thermophilus* (56)

Liczba badanych szczepów	Liczba szczepów przemysłowych	Liczba szczepów zawierających plazmidy	Rozmiar plazmidu (Kb)
23	15	5	2,2 – 3,5
35	– <sup>a)</sup>	13 <sup>b)</sup>	2,2 – 14,7
10	3	1	2,2
50	20	9 <sup>c)</sup>	2,9 – 7,6
1	–	1 <sup>d)</sup>	2,2 3,4 25,5
30	25	4	2,2 – 6,9

a) Brak informacji; b) 3 z tych 13 szczepów zawierają więcej niż 1 plazmid; c) 3 z tych 9 szczepów zawierają 2 plazmidy; d) zawiera 3 plazmidy (szczep IP6631).

Jedynie 33 na 149 badanych do 1990 r. szczepów jest wyposażonych, zazwyczaj w pojedynczy plazmid o niskiej masie cząsteczkowej, od 1,5 do 9,8 MDa (56). Wszystkie te plazmidy mają charakter kryptyczny. Ze względu na małe rozmiary jest mało prawdopodobne aby kodowały jakieś cechy fenotypowe.

Komórki jednego zaledwie szczepu *S. salivarius ssp. thermophilus* IP6631 zawierają większy, 17 MDa plazmid pNST31 również o nieznannej funkcji. Odmiany pozbawione tego plazmidu nie wykazują różnic w metabolizmie węglowodanów i profilu oporności na antybiotyki w porównaniu ze szczepem wyjściowym (56).

Mercenier i wsp. (56) określili sekwencję zasad w 4,6 MDa plazmidzie szczepu *S. salivarius ssp. thermophilus* AO33. Zwrócono uwagę właśnie na ten plazmid, ponieważ jego brak lub obecność w komórkach wpływała na zmianę morfologii kolonii. Mercenier uważa, że plazmid pA33 ma zdolność integracji i odrywania się od DNA chromosomalnego. Wówczas, gdy występuje jako składnik autonomicznie replikujący, szczep AO33 rośnie w postaci małych kolonii, a w podłożu bulionowym tworzy krótkie łańcuszki (10–20 komórek). Małe kolonie koagulują znacznie wolniej mleko niż duże, złożone z komórek zawierających plazmid pA33 w postaci zintegrowanej z DNA chromosomalnym. Wykazują również zwiększoną oporność na kanamycynę oraz zmieniony profil fagooporności. Zaobserwowano, że małe kolonie mogą wyrastać z komórek pochodzących z dużych i odwrotnie. Są to jedyne informacje w dostępnej literaturze wyjaśniające znaczenie plazmidów u bakterii *S. salivarius ssp. thermophilus*.

Pierwsze informacje o występowaniu plazmidów w komórkach bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pochodzą z badań Chassy i wsp. (7), którzy stwierdzili, że *L. casei* ssp. *casei* 64H i *L. casei* ssp. *rhamnosus* zawierają po jednym plazmidzie o masach cząsteczkowych odpowiednio 23 i 19 MDa. Nie ustalono w tych badaniach ich funkcji metabolicznych. Fenotypowy dowód na kodowanie metabolizmu laktozy uzyskał Hofer (29) dla *L. casei* 1185. Szczep 1185 spontanicznie tracił zdolność fermentowania tego cukru w podwyższonej temperaturze lub w obecności akryflawin. Chassy i wsp. (8) również stwierdzili, że pasażowanie *L. casei* 64H w obecności barwników akrydynowych i mitomycyny C daje blisko 100% konwersję odmian Lac<sup>+</sup> do Lac<sup>-</sup> przy czym odmiany Lac<sup>-</sup> były pozbawione 23 MDa plazmidu.

Wiadomo, że transport laktozy do komórek *L. casei* odbywa się przy udziale systemu PEP:PTS. Laktozo 6-fosforan jest następnie rozszczepiany, podobnie jak u bakterii z rodzaju *Lactococcus*, przez fosfo- $\beta$ -galaktozydazę (31). Chassy i wsp. (8) wykazali, że 23 MDa plazmid u *L. casei* 64H jest miejscem lokalizacji zarówno genów odpowiedzialnych za system transportu i fosforylacji laktozy, jak i za aktywność fosfo- $\beta$ -galaktozydazy. Stwierdzili ponadto, że miejscem kodowania metabolizmu laktozy jest 15 MDa plazmid u *L. casei* ATCC 395 i 36 MDa plazmid u *L. casei* ATCC 4646.

Szeroko zakrojone badania Vescovo i wsp. (78) dla 195 szczepów należących do różnych gatunków *Lactobacillus* sp. pozwoliły na określenie częstości występowania plazmidów w obrębie tego rodzaju. Ustalono, że 63% szczepów *L. reuteri*, 27% szczepów *L. helveticus* i 4% *L. casei* zawiera w komórkach plazmidy. Stwierdzono ponadto, że zaledwie u 1 z 19 badanych szczepów *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* występują plazmidy oraz nie wykazano ich obecności u żadnego z 9 badanych szczepów *L. plantarum*, 6 badanych *L. coryneformis* i 5 *L. brevis*. Występowanie plazmidów w komórkach pałeczek mlekowych jest zatem cechą szczepową a nie cechą gatunku. Dla nielicznych jedynie szczepów udało się ustalić cechy fenotypowe kodowane przez te plazmidy. Wiadomo, że 7,0 MDa plazmid u *L. reuteri* 1063 jest odpowiedzialny za podwyższoną oporność na erytromycynę (>500  $\mu$ g/ml) (2), za wykorzystanie maltozy są odpowiedzialne geny umiejscowione w 51 MDa plazmidzie u *Lactobacillus* sp. DB29 i w 42 MDa plazmidzie u szczepów DB27, DB28, i DB31 (46). U *L. helveticus* HLM-1 utracie 3,5 MDa plazmidu towarzyszy utrata aktywności proteinaz (58). Wśród 30 badanych szczepów *L. sake*, izolowanych z mięsa i produktów mięsnych, 30% było szczepami bezplazmidowymi, pozostałe zawierały od 1 do 3 plazmidów o masie cząsteczkowej od 1,3 do 26,7 MDa. Plazmid o najniższej masie cząsteczkowej występował u 20% szczepów. Nie ustalono jednak ich fenotypowych funkcji (48).

Ostatnio bardzo duże zainteresowanie towarzyszy szczepom *L. acidophilus* ze względu na ich znaczenie dla zdrowia człowieka i zwierząt. Badania genetyczne tego gatunku są jednak bardzo ograniczone. Według Klaenhammera i Sutherlanda (35) oporność na antybiotyki, produkcja bakteriocyn, jak również zdolność do kolonizacji przewodu pokarmowego jest kodowana genami plazmidowymi. Jednakże zaledwie 1 na 8 badanych szczepów zawierał DNA plazmidowy. Był to szczep izolowany z przewodu pokarmowego świń i zawierał dwa krytyczne plazmidy 6,3 MDa i 13,7 MDa. Vescovo i wsp. (78) stwierdzili występowanie plazmidów zaledwie w 19% badanych szczepów *L. acidophilus*. Należy jednak sądzić, że w najbliższym czasie gatunek ten ze względu na rosnące zainteresowanie zdrową żywnością będzie poddany dokładnej charakterystyce genetycznej. Również nieliczne są informacje dotyczące szczepów *Leuconostoc* sp. O'Sullivan i Daly (61) dla 10 badanych szczepów należących do gatunków *Leuc. lactis*, *Leuc. mesenteroides* i podgatunku *cremoris* oraz *Leuc. paramesenteroides* wykazali obecność DNA plazmidowego. Liczba plazmidów zależnie od szczepu wahała się od 1 do 6, a ich rozmiar od 2,5 do 40 MDa. Geny odpowiedzialne za metabolizm laktozy były zlokalizowane u *Leuc. mesenteroides* w plazmidzie o masie cząsteczkowej 34 MDa, a u *Leuc. lactis* w plazmidzie 16 MDa. Odmiany nie metabolizujące cytrynianu nie zawierały plazmidu 10 MDa. Orberg i Sandine (60) również stwierdzili występowanie plazmidów w komórkach 14 szczepów z rodzaju *Leuconostoc*.

Jedynie 4 badane szczepy z gatunku *Leuc. oenos* były pozbawione plazmidów. Według autorów wskazuje to na odrębność gatunku *Leuc. oenos* oraz na podobieństwo pozostałych kultur do bakterii z rodzaju *Lactococcus*. Tsai i Sandine (77) w komórkach 3 szczepów *Leuc. mesenteroides* ssp. *cremoris* (CAF7, HT6, HT32) stwierdzili obecność 4 (CAF7) lub 6 plazmidów o masie cząsteczkowej od 4,8 do 58 MDa.

#### 4. Podsumowanie

Pomimo ponad dziesięcioletniego gromadzenia informacji na temat genetycznych systemów regulacji metabolizmu bakterii mlekowych wiele jeszcze problemów pozostaje do wyjaśnienia. Panuje ogólny pogląd o konieczności zintensyfikowania badań zmierzających do wyjaśnienia funkcji, licznych u bakterii mlekowych, plazmidów kryptycznych. Równie ważne jest poznanie budowy genomu tej grupy bakterii. Badania z tego zakresu są zaledwie rozpoczęte pracami Bourgeois i wsp. (44) oraz Tanksanena i wsp. (56).

Istotnym utrudnieniem w osiągnięciu założonego celu jest ogromne zróżnicowanie nie tylko między poszczególnymi gatunkami bakterii mlekowych, ale również znaczące między szczepami tego samego gatunku, a nawet podgatunku.

Ostatecznym zamierzeniem ośrodków badawczych zajmujących się genetyką bakterii mlekowych jest stworzenie podstaw dla zastosowania metod inżynierii genetycznej i uzyskanie nowych, ulepszonych kultur spełniających oczekiwania przemysłu fermentacyjnego. Ograniczeniem w przemysłowym wykorzystaniu skonstruowanych metodami inżynierii genetycznej szczepów bakterii mlekowych są stosowane w badaniach wektory oparte na markerach oporności na antybiotyki. Stwarza to ryzyko przeniesienia cechy oporności na drobnoustroje stanowiące zakażenia żywności. Wektory akceptowne przez przemysł spożywczy muszą być tzw. bezpiecznymi wektorami (*food grade*), w których markery oparte są na naturalnych właściwościach bakterii mlekowych, takich jak: zdolność fermentowania laktozy, oporność na bakteriocyny czy metale ciężkie. Prace z tego zakresu zostały rozpoczęte w 1988 r. (18, 22) i uważa się, że będą dominującymi w najbliższych latach, łącznie z przemysłową aplikacją skonstruowanych szczepów. Interesujące są również badania, których celem jest zwiększenie stabilności szczepów przemysłowych przez integrację DNA plazmidowego z DNA chromosomalnym.

Jednakże, aby wykorzystać techniki inżynierii genetycznej dla ulepszania szczepów bakterii mlekowych muszą być w dalszym ciągu prowadzone badania podstawowe systemów genetycznych. Bez tej wiedzy osiągnięcie efektów jest utrudnione, jeżeli w ogóle możliwe.

#### Literatura

1. Anderson D. G., McKay L. L., (1977), *J. Bacteriol.*, 129, 367–377.
2. Axelsson L., Ahrne S., Andersson M., Ståhl S., (1987), *FEMS Microbiol., Rev*, 46, P23 (A37).
3. Babel F. J., (1977), *J. Dairy Sci.*, 60, 815–821.
4. Barefoot S. F., Klaenhammer T. R., (1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1808–1815.
5. Buchman G. W., Banerjee S., Hansen J. N., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 16260–16266.
6. Chassy B. M., (1987), *FEMS Microbiol. Rev*, 46, 297–312.
7. Chassy B. M., Gibson E. M., Giuffrida A., (1976), *J. Bacteriol.*, 127, 1576–1578.
8. Chassy B. M., Gibson E. M., Giuffrida A., (1979), *Plasmid*, 2, 296–299.
9. Chopin A., Chopin M.-C., Moillo-Batt A., Langella P., (1984), *Plasmid*, 11, 260–263.
10. Chopin A., Langella P., (1982), *Le Lait*, 62, 705–719.
11. Chopin M.-C., Moillo-Batt A., Rouault A., (1985), *FEMS Microbiol. Lett.*, 26, 243–245.
12. Collins E. B., (1958), *J. Dairy Sci.*, 41, 41–48.
13. Collins E. B., Harvey R. J., (1962), *J. Dairy Sci.*, 45, 32–38.

14. Crow V. L., Davey G. P., Pearce L. E., Thomas T. D., (1983), *J. Bacteriol.*, 153, 76–83.
15. Davey G. P., Pearce L. E., (1982), *Microbiology*, Ed. D. Schlessinger, 221–224, *Am. Soc. Microbiol. Washington, D. C.*
16. Davies F. L., Gasson M. J. J., (1981), *Dairy Res.*, 48, 363–376.
17. De Vos W. M., (1987), *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 281–295.
18. De Vos W. M., Vos P., Simons G., David S., (1989), *J. Dairy Sci.*, 72, 3398–3405.
19. De Vos W. M., Underwood H. M., Davies F. L., (1984), *FEMS Microbiol. Lett.*, 23, 175–178.
20. Efstathiou Y. D., McKay L. L., (1977), *J. Bacteriol.*, 130, 257–265.
21. Fitzgerald G. F., Daly C., Brown L. R., Gingeras T. R., (1982), *Nucleic Acids Res.*, 10, 8171–8179.
22. Froseth B. F., Herman R. E., McKay L. L., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2136–2139.
23. *Ibidem.*
24. Gasson M. J., (1984), *FEMS Microbiol. Lett.*, 21, 7–10.
25. Gasson M. J., (1990), *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 43–60.
26. Gasson M. J., Davies F. L., (1984), *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks*. Ed. F. L. Daves, B. A. Law, 99–126, Elsevier, New York.
27. Gautier M., Chopin M.-C., (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 923–927.
28. Gonzales L. F., Kunka B. S., (1985), *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 627–633.
29. Hofer F., (1977), *FEMS Microbiol. Lett.*, 1, 167–170.
30. Kaleta C., Entian K. D., (1989), *J. Bacteriol.*, 171, 1597–1601.
31. Kandler O., (1983), *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209–224.
32. Kempler G. M., McKay L. L., (1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 316–323.
33. Kempler G. M., McKay L. L., (1981), *J. Dairy Sci.*, 64, 1527–1539.
34. Kiwaki M., Ikemura H., Shimizu-Kadota M., Hirashima A., (1989), *Mol. Microbiol.*, 3, 359–369.
35. Klaenhammer T. R., Sutherland S. M., (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 592–600.
36. Klaenhammer T. R., (1987), *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 313–325.
37. Klaenhammer T. R., (1988), *Biochimie*, 70, 337–349.
38. Kok J., (1990), *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 15–42.
39. Kok J., Venema G., (1988), *Biochimie*, 70, 475–488.
40. Kozak W., Rajchert-Trzpił M., Dobrzański W. T., (1974), *J. Gen. Microbiol.*, 83, 295–302.
41. Law B. A., Kolstad J., (1983), *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 225–245.
42. LeBlanc D. J., Crow V. L., Lee L. N., Garon C. F., (1979), *J. Bacteriol.*, 137, 878–882.
43. LeBlanc D. J., Crow V. L., Lee L. N., (1980), *Plasmids and Transposons: Environmental effects and maintenance mechanisms*. Ed. C. Stuttard, K. R. Rozee, 31–41, Ac. Press, New York.
44. LeBourgeois P., Mata M., Ritzenthaler P., (1989), *FEMS Microbiol. Lett.*, 59, 65–70.
45. Limsowtin G. K. Y., Heap H. A., Lawrence R. C., (1978), *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 13, 1–8.
46. Lin M. L., Kondo J. K., Bartholomew D. T., (1987), *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, P19 (A30).
47. Lindgren S. F., Dobrogosz W. J. (1990), *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 149–163.
48. Lücke F.-K., Berg C. M., Buckley L., Schillinger U., (1987), *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, P19 (A29).
49. McKay L. L., (1983), *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 259–274.
50. McKay L. L., (1985), *Bacterial Starter Cultures for Foods*. Ed. S. E. Gilliland, 160–174, CRC Press, Boca Raton, Florida.
51. McKay L. L., Miller A., Sandine W. E., Elliker P. R., (1970), *J. Bacteriol.*, 102, 804–809.
52. McKay L. L., Baldwin K. A., Zottola E. A., (1972), *Appl. Microbiol.*, 23, 1090–1096.
53. McKay L. L., Baldwin K. A., (1982), *Microbiology*. Ed. D. Schlessinger, 210–212, *Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.*
54. McKay L. L., Baldwin K. A., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 68–74.
55. Mehta A. M., Patel K. A., Dave P. J., (1983), *A. C. Microbios*, 37, 37–43.
56. Mercenier A., (1990), *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 61–78.
57. Mills O. E., Thomas T. D., (1981), *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 16, 43–55.
58. Morelli L., Vescovo M., Coconcelli P., Bottazzi V., (1986), *Can. J. Microbiol.*, 32, 758–760.
59. Neve H., Geis A., Teuber M., (1984), *J. Bacteriol.*, 113, 833–838.
60. Orberg P. K., Sandine W. E., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 1129–1133.
61. O'Sullivan T., Daly C., (1982), *Ir. J. Food Sci. Technol.*, 6, 206–210.
62. Otto R., De Vos W. M., Gavrieli J., (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1272–1277.
63. Park Y. H., McKay L. L., (1982), *J. Bacteriol.*, 149, 420–425.

64. Sanders M. E., (1988), *Biochimie*, 70, 411–421.
65. Sanders M. E., Klaenhammer T. R., (1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 944–950.
66. Sanders M. E., Klaenhammer T. R., (1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1125–1133.
67. Sanders M. E., Klaenhammer T. R., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 979–985.
68. Sandine W. E. (1987), *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 205–220.
69. Steele J. L., McKay L. L., (1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 57–64.
70. Steenson L. R., Klaenhammer T. R., (1986), *J. Dairy Sci.*, 69, 2227–2236.
71. Talarico T. L., Dobrogosz W. J., (1989), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33, 674–679.
72. Thomas T. D., Milles D. E., (1981), *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 255–273.
73. Thomas T. D., Pritchard G. G., (1987), *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 245–268.
74. Thompson J. K., (1987), *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 221–231.
75. Thompson J. K., Collins M. A., (1989), *Milchwissenschaft*, 44, 65–69.
76. Tsai H.-J., Sandine W. E., (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 352–357.
77. Tsai H.-J., Sandine W. E., (1987), *J. Ind. Microbiol.*, 2, 25–33.
78. Vescovo M., Bottazzi V., Sarra P. G., Dellaglio F., (1981), *Microbiologica*, 4, 413–417.

### Genetic determinants of lactic acid bacteria metabolism

#### Summary

This review describes genetic determinants responsible for industrially important features of lactic acid bacteria.

Special attention has been paid to plasmids that direct lactose metabolisms, proteolytic activity, citrate metabolisms, bacteriocin production and bacteriophage resistance.

#### *Adres dla korespondencji:*

Zdzisława Libudzisz, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90–924 Łódź.