

## Plazmidové profily mliekárenských kultúr

ZDENO SAMEK – JÁN BURIAN – VOJTECH SAXA

**Súhrn.** Skúmala sa prítomnosť plazmidov v 8 kmeňoch rodu *Lactobacillus*, v jednom kmeni *Bifidobacterium bifidum* a v jednom kmeni *Streptococcus lactis*. V piatich kmeňoch sa zistila prítomnosť plazmidov, ktorých veľkosť stanovená agarózovou elektroforézou bola v intervale 2–50 kb. Skúmané kmene sa bežne používajú ako štartovacie kultúry na výrobu mliekárenských výrobkov.

Kmene rodov *Streptococcus* a *Lactobacillus* sa vo veľkej miere využívajú v mliekárenskom priemysle. Pri mnohých kmeňoch *Lactobacillus* a *Streptococcus* bol opísaný výskyt plazmidov [1–8]. Pri niektorých z nich sa podarilo identifikovať genotyp, ale väčšina zistených plazmidov ostala kryptická. Vlastnosti determinované plazmidom sa zistili napr. u *L. casei* – laktózový metabolizmus [2, 3], *L. helveticus* – *N*-acetyl-D-glukózamínový metabolizmus [7] a pri mnohých laktobaciloch rezistencia proti antibiotikám [4, 6, 9]. Podobne pri rode *Streptococcus* sa dokázali vlastnosti kódované plazmidom: utilizácia laktózy [10], galaktózy [11, 12], sacharózy [13, 14], manózy a xyulózy [13], proteínázová aktivita [10], utilizácia citrátu [10], produkcia nižínu [13, 15] a rôznych bakteriocínov [16, 17], rezistencia proti UV žiareniu [18], bakteriofágom [19], zlúčeninám medi [20] a kanamycínu [21]. Gén pre fosfo- $\beta$ -galaktozid galaktohydrolázu z plazmidu pLZ64 (35 kb) *L. casei* bol klonovaný a exprimovaný v *Escherichia coli* K12 [22]. V súčasnosti sa rozpracúvajú metódy transformácie streptokokov a laktobacilov. Tým sa otvárajú možnosti ovplyvniť produkčné vlastnosti priemyselných mliečnych kultúr pomocou technológie rekombinantnej DNA. V predloženej práci sa analyzovali

---

RNDr. Zdeno Samek, RNDr. Vojtech Saxa, Výskumný ústav potravinársky, Fučíkova 45, 900 01 Modra.

RNDr. Ján Burián, Ústav biochémie a biotechnológie UK, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava.

kmene rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium bifidum* a *S. lactis* ako potenciálny hostiteľia plazmidov, ktoré môžu obsahovať gény zaujímavé z biotechnologického hľadiska.

## Materiál a metódy

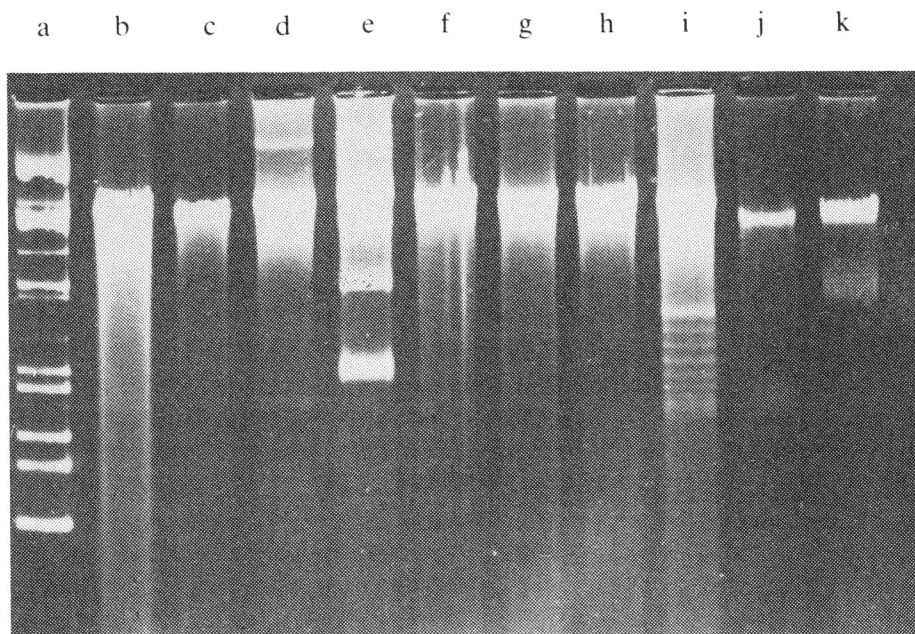
**Bakteriálne kmene a kultivačné médiá.** Použili sa kmene *Lactobacillus bulgaricus* 118, *L. acidophilus* 982, *L. delbrueckii* 237 a 238, *L. casei* 150, *L. lactis* 447, *L. helveticus-pragensis* Tx 121, *Bifidobacterium bifidum* 707, *Streptococcus lactis* 53 (kmene získané z Laktoflóry Praha), *L. helveticus* (kmeň získaný z Mliekárenského závodu, Nové Mesto nad Váhom) a multiplazmidový kmeň *Escherichia coli* KL4, ktorého plazmidy sa použili ako štandard na zistenie veľkosti sledovaných plazmidov. Kmene rodu *Lactobacillus* sa kultivovali v MRS médiu s prídavkom 20 mmol . l<sup>-1</sup> treonínu [1] pri 37 °C, kmeň *Streptococcus lactis* 53 v mäsovopeptónovom bujóne s 20 mmol . l<sup>-1</sup> treonínu pri 30 °C a kmeň *E. coli* KL4 v LB médiu pri 37 °C.

**Izolácia plazmidov.** Plazmidy sa izolovali modifikovaným postupom podľa Klaenhammera [5]. Premyté bunky (10 ml kultivácia) TE tlmivým roztokom (10 mmol . l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8,0; 1 mmol . l<sup>-1</sup> EDTA) sa suspendovali v 1 ml roztoku, ktorý obsahoval 25 % sacharózy, 50 mmol . l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 7,5 a 5 mmol . l<sup>-1</sup> EDTA. K suspenzii sa pridal lyzozým (5 mg . ml<sup>-1</sup>) (Drùbežárský průmyslový koncern, Praha) a EDTA do konečnej koncentrácie 20 mmol . l<sup>-1</sup>. Po hodinovej inkubácii pri 37 °C sa pridal alkalizovaný 10 % laurylsulfát sodný (SDS) pH 12,2 do výslednej koncentrácie 4 %. Bunky lyzovali pri 62 °C počas 1 hodiny. Po ochladení sa hodnota pH lyzátu upravila na 7 pomocou 2 mol . l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 7 a denaturovaná DNA sa vyzrážala pri 0 °C 5 mol . l<sup>-1</sup> NaCl (výsledná koncentrácia 1 mol . l<sup>-1</sup>). Po centrifugácii sa supernatant deproteinizoval zmesou fenol–chloroform (1 : 1) a plazmidová DNA sa vyzrážala dvojnásobným množstvom etanolu pri -20 °C. Sediment sa po centrifugácii rozpustil v 0,5 ml TE. RNA sa čiastočne odstránila precipitáciou 4 mol . l<sup>-1</sup> octanom sodným vo výslednej koncentrácii 2 mol . l<sup>-1</sup> pri teplote 0 °C. Supernatant sa po centrifugácii prezrážal 2 ml etanolu pri -20 °C 1 h. Po následnej centrifugácii sa sediment plazmidovej DNA rozpustil v 20 µl TE. Pre elektroforézu sa vzorka pripravila pridaním 1/5 objemu R roztoku (50 % glycerol, 4 % EDTA, 1 % SDS a 0,2 % brómfenolová modrá). Elektroforéza prebiehala, 0,7 % agaróze (Lachema Brno), v tlmivom roztoku 0,89 mol . l<sup>-1</sup> Tris 0,89 mol . l<sup>-1</sup> kys. boritá pH 8,3 a 1 mmol . l<sup>-1</sup> EDTA pri potenciálnom spáde 5 V . cm<sup>-1</sup> počas 3 hodín. Gél sme po elektroforéze 1 hodinu farbili

v 1 mmol . l<sup>-1</sup> etídium bromide (Fluka) a fotografovali na planfilm ORWO PN 22 v prechádzajúcom UV svetle vlnovej dĺžky 254 nm (Transilluminator Chroma 41, Vetter, NSR).

### Výsledky a diskusia

Bunková stena gram-pozitívnych baktérií je na rozdiel od gram-negatívnych baktérií menej senzitívna na lyzozým a nižšie koncentrácie SDS. To spôsobuje problémy pri lýze buniek, ktorá je pre úspešnosť izolácie plazmidov rozhodujúca. Preto sa vyhodnoteniu jej účinnosti venovala zvýšená pozornosť. Na základe mikroskopického pozorovania úspešnosti lýzy sa zvýšila koncentrácia lyzozýmu oproti pôvodnej práci z 1 mg . ml<sup>-1</sup> na 5 mg . ml<sup>-1</sup> a koncentráciu SDS z 3 % na 4 %. Na zvýšenie efektívnosti lýzy buniek sa do kultivačného média pridávalo 20 mmol . l<sup>-1</sup> treonínu [1].



a – *E. coli* KL4, b – *L. acidophilus* 982, c. – *L. bulgaricus* 118, d – *L. casei* 150, e – *L. delbrueckii* 237, f – *L. delbrueckii* 238, g – *L. helveticus-pragensis* Tx 121, h – *L. helveticus*, i – *L. lactis* 447, j – *Bifidobacterium bifidum* 707, k – *S. lactis* 53.

Obr. 1. Elektroforetická pohyblivosť plazmidov testovaných baktérií.

Fig. 1. Electrophoresis mobility of plasmides of the bacteria studied.

Tabuľka 1. Elektroforetická pohyblivosť a plazmidová veľkosť študovaných baktérií.

Table 1. Electrophoretic mobility and plasmide size of bacteria studied.

PLAZMID <sup>1</sup>	POHYBLIVOSŤ (mm) <sup>2</sup>	STANOVENÁ VEĽKOSŤ (kb) <sup>3</sup>
pLC1	2.1	cca 46
pLC2	19.8	1.8
pLD237.1	14.0	3.5
pLD237.2	9.2	6.5
pLD237.3	2.0	cca 50
pLH1	10.0	5.7
pLH2	2.0	cca 50
pLL	16.0	2.7
pSL53	10.5	5.4

1 – plasmide, 2 – mobility, 3 – determined size.

Prítomnosť plazmidov sa zistila pri 4 kmeňoch rodu *Lactobacillus* a v kmeni *S. lactis* 53. *L. delbrueckii* 237 hostí aspoň tri plazmidy, *L. casei* 150 obsahuje dva plazmidy, *L. helveticus* dva plazmidy a *L. lactis* 447 jeden plazmid. U *S. lactis* 53 bol identifikovaný jeden plazmid (obr. 1, tab. 1).

Z obrázku 1 vidieť, že v prípade *L. lactis* 447 a *S. lactis* 53 sa podarilo identifikovať viaceré topoizomérmé formy plazmidovej DNA. Je predpoklad, že to bolo spôsobené prítomnosťou vysokej aktivity topoizomérázy. V štyroch kmeňoch rodu *Lactobacillus* a v jednom kmeni *Bifidobacterium bifidum* sa plazmidy nezistili. Výskyt plazmidov v sledovanom rode je rôzny. Vescovo a kol. [8] identifikovali plazmidovú DNA v 19 % skúmaných kmeňoch *L. acidophilus*, 27 % kmeňoch *L. helveticus* a 5 % *L. bulgaricus*. Podobné výsledky dosiahli i Savage a Lin [23], z dvadsiatich kmeňov rodu *Lactobacillus* iba desať obsahovalo plazmidy.

Získané výsledky by ďalej mohli slúžiť genetickému štúdiu mliečnych baktérií v zmysle zisťovania vlastností závislých od prítomnosti plazmidov.

## Literatúra

1. CHASSY, B. M. – GIBSON, E. – GIUFFRIDA, A., J. Bacteriol. 127, 1976, s. 1576.
2. CHASSY, B. M. – GIBSON, E., – GIUFFRIDA, A., Curr. Microbiol., 1, 1978, s. 141.
3. HOFER, F., FEMS Microbiol. Lett., 1, 1977, s. 167.
4. ISHIWA, H. – IWATA, S., J. Gen. Appl. Microbiol., 26, 1980, s. 71.
5. KLAENHAMMER, T. R., Curr. Microbiol., 10, 1984, s. 23.
6. MORELLI, L. – VESCOVO, M. – BOTTAZZI, V., Microbiologia, 6, 1983, s. 145.

7. SMILEY, M. B. – FRYDER, V., Appl. Environ. Microbiol., 35, 1978, s. 777.
8. VESCOVO, M. – BOTTAZZI, V. – SARA, P. G. – DELLAGLIO, F., Microbiologia, 4, 1981, s. 413.
9. VESCOVO, M. – MORELLI, L. – BOTTAZZI, V., Appl. Environ. Microbiol., 43, 1982, s. 50.
10. McKAY, L. L., Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., 49, 1983, s. 259.
11. PARK, Y. H. – McKAY, L. L., J. Bacteriol., 149, 1982, s. 420.
12. CROW, V. L. – DAVEY, G. P. – PEARCE, L. E. – THOMAS, T. D., J. Bacteriol., 153, 1983, s. 76.
13. LeBLANC, D. J. – CROW, V. L. – LEE, L. N., In: Plasmids and Transposons: Environmental Effects and Maintenance Mechanism. New York, Academic Press 1980, s. 31.
14. GASSON, M. J., FEMS Microbiol. Lett., 21, 1984, s. 7.
15. GONZALEZ, C. P. – KUNKA, B. S., Appl. Environ. Microbiol., 49, 1985, s. 627.
15. DAVEY, G. P., Appl. Environ. Microbiol., 48, 1984, s. 985.
17. SCHERWITZ, K. M. – BALDWIN, K. A. – McKAY, L. L., Appl. Environ. Microbiol., 45, 1983, s. 1506.
18. CHOPIN, M. C. – MOILLO-BATT, A. – ROUAULT, A., FEMS Microbiol. Lett., 26, 1985, s. 243.
19. SANDERS, M. E. – KLAENHAMMER, T. R., Appl. Environ. Microbiol., 42, 1981, s. 944.
20. OTTO, R. – DeVOS, W. M. – GAVRIELI, J., Appl. Environ. Microbiol., 43, 1983, s. 1272.
21. DOBRZANSKI, W. T. – BARDOWSKI, J. – KOZAK, W. – ZAJDEL, J., Microbiology, 1982, s. 225.
22. LEE, L. J. – HANSEN, J. B. – JAGUSZTYN-KRYNICKA, E. K. – CHASSY, B. M., J. Bacteriol., 152, 1982, s. 1138.
23. SAVAGE, D. C. – LIN, J. H., Appl. Environ. Microbiol., 49, 1985 s. 1004.

Do redakcie došlo 26. 11. 1988

### Профили плазмидов молочных культур

#### Резюме

Исследовалось наличие плазмидов в 8 штаммах рода *Lactobacillus*, в одном штамме *Bifidobacterium bifidum* и в одном штамме *Streptococcus lactis*. В пяти штаммах обнаружилось наличие плазмидов, у которых величина определена методом электрофореза на агарозе находится в интервале с 2 кб до 50 кб. Исследованные штаммы обычно применяются в качестве заквасочных культур для производства молочных продуктов.

### Plasmide profiles of dairy cultures

#### Summary

The presence of plasmides in 8 *Lactobacillus* strains, one *Bifidobacterium bifidum* strain and one *Streptococcus lactis* strain has been investigated. The presence of plasmides has been found in five strains and their size evaluated by agarose electrophoresis ranged between 2 kb and 50 kb. The strains investigated are being regularly used as starting cultures in dairy production.