

ANNA SIP, MICHAŁ WIĘCKOWICZ, JUSTYNA JARKA, AGNIESZKA OLEJNIK-SCHMIDT,
WŁODZIMIERZ GRAJEK

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

BADANIE OSCYPKÓW NA OBECNOŚĆ BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ O ZDOLNOŚCI SYNTEZY LISTERIOBÓJCZYCH BAKTERIOCYN KLASY IIA*

Streszczenie. Celem pracy było ustalenie, jakie rodzaje bakterii fermentacji mlekowej (LAB) występują w oscypkach i czy są wśród nich mikroorganizmy zdolne do syntezy listeriobójczych bakteriocyn klasy IIA. W ramach pracy oscypki poddano także rutynowym ilościowym analizom mikrobiologicznym. Badanym materiałem było dziewięć prób oscypków. Skład ilościowy ich mikroflory oznaczano, stosując klasyczne metody mikrobiologiczne, a jakościowy – określano na podstawie wyników analizy metagenomowej. Analiza metagenomowa obejmowała detekcję obecności siedmiu potencjalnie bakteriocynogennych rodzajów LAB oraz fragmentów genów listeriobójczych bakteriocyn klasy IIA. Do wykrywania LAB wykorzystywano technikę PCR i specyficzne rodzajowo startery opisane w literaturze. Fragmenty genów kodujących listeriobójcze bakteriocyny klasy IIA wykrywano, stosując startery zaprojektowane w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii UP w Poznaniu. Przeprowadzone badania wykazały, że w większości prób oscypków liczba komórek LAB przekraczała poziom 10^8 jtk w 1 g. Liczebność populacji tlenowych bakterii mezofilnych i drożdży była mniejsza, odpowiednio o jeden i dwa cykle logarytmiczne. We wszystkich próbach metaDNA wyizolowanego z natywnej mikroflory oscypków występowały sekwencje charakterystyczne dla bakterii rodzajów *Lactococcus* i *Leuconostoc*. W ośmiu z dziewięciu badanych prób oscypków wykryto także obecność DNA bakterii rodzajów *Lactobacillus* i *Enterococcus*. W żadnej próbie oscypka nie stwierdzono materiału genetycznego typowego dla bakterii rodzajów *Carnobacterium*, *Pediococcus* i *Weissella*. We wszystkich badanych próbach metagenomowego DNA wykryto ponadto obecność fragmentów genów kodujących listeriobójcze bakteriocyny klasy IIA. W chwili obecnej niezbędne jest rozpoczęcie prac izolacyjnych i ustalenie, czy LAB, będące nośnikami genów listeriobójczych bakteriocyn klasy IIA, są zdolne do syntezy aktywnych bakteriocyn, a co za tym idzie do oddziaływania na chorobotwórcze bakterie *Listeria monocytogenes*.

*Pracę finansowano z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N312 204435 (2044/B/P01/2008/35) na lata 2008-2011.

Słowa kluczowe: osypek, bakterie fermentacji mlekowej, bakteriocyny klasy IIa, analiza metagenomowa

Wstęp

W ostatnich latach w badaniach mikrobiologicznych coraz częściej jest wykorzystywana analiza metagenomowa (GIRAFFA i NEVIANI 2001, BRUGERE i IN. 2009, BAYER i IN. 2010). Jej przedmiotem jest materiał genetyczny (zwykle metaDNA) pochodzący ze wszystkich drobnoustrojów zasiedlających dane środowisko. W materiale tym poszukuje się określonych sekwencji genów lub ich fragmentów za pomocą technik molekularnych opartych m.in. na hybrydyzacji DNA lub technice PCR. W związku z tym, że analizie metagenomowej jest poddawany materiał genetyczny całej puli drobnoustrojów, metoda ta daje szansę na wykrycie w badanym środowisku nie tylko drobnoustrojów możliwych do oznaczenia klasycznymi metodami mikrobiologicznymi, lecz także tych, w odniesieniu do których nie opracowano jeszcze podłoży mikrobiologicznych (ang. *unculturable microorganisms*), a także drobnoustrojów martwych. W efekcie przyczynia się ona do poznania składu całej mikroflory danego środowiska oraz dostarcza bezcennych informacji o jej potencjale genetycznym i metabolicznym. W odróżnieniu od klasycznych metod mikrobiologicznych nie wiąże się ona z koniecznością izolacji pojedynczych drobnoustrojów i ich hodowlą (STREIT i SCHMITZ 2004).

Analiza metagenomowa może być też wykorzystywana do oceny przydatności danego środowiska jako źródła izolacji drobnoustrojów o poszukiwanych uzdolnieniach (zasobnych w daną cechę genotypową), umożliwi ona bowiem ustalenie, w jakich środowiskach występują sekwencje DNA charakterystyczne dla tych drobnoustrojów. Z tego powodu analiza ta może być etapem wstępnym wszystkich prac izolacyjnych mających na celu pozyskanie drobnoustrojów o zdefiniowanych wcześniej zasobach genetycznych i związanej z nimi aktywności metabolicznej (STREIT i SCHMITZ 2004, DEJA-SIKORA i IN. 2007).

Interesującym przedmiotem analizy metagenomowej może być mikroflora fermentowanych produktów regionalnych. Produkty te powstają w efekcie spontanicznych fermentacji, w których biorą udział mikroorganizmy reprezentujące lokalną, często bardzo specyficzną mikroflorę. Z danych literaturowych wynika, że w gronie drobnoustrojów uczestniczących w procesie fermentacji produktów regionalnych znajduje się wiele mikroorganizmów o unikalnych właściwościach, m.in. o silnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej (OHMOMO i IN. 2003, GHRAIRI i IN. 2004, TODOROV i DICKS 2006, BELGACEM i IN. 2008). Aktywność ta jest zwykle wypadkową syntezy wielu różnych metabolitów, wśród których największą wybiórczością działania cechują się związki białkowe zwane bakteriocynami (CHEN i HOOVER 2003, O'SULLIVAN i IN. 2002). Wiele bakteriocyn nie działa antagonistycznie na mikroorganizmy niezbędne w procesie fermentacji, lecz jedynie na drobnoustroje chorobotwórcze, dlatego też bakteriocyny odgrywają ważną rolę w zabezpieczeniu produktów fermentowanych, a zwłaszcza probiotycznych, przed rozwojem niepożądanych mikroorganizmów, m.in. bakterii *Listeria monocytogenes*, chorobotwórczych dla człowieka (CLEVELAND i IN. 2001, GALVEZ i IN. 2007). Spośród wielu bakteriocyn działających na *Listeria*, najsilniejszą listeriobójczą aktywnością charakteryzują się bakteriocyny klasy IIa. Zdolność ich syn-

tezy wykryto, jak dotąd, u niektórych szczepów bakterii rodzajów *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Weissella* (ENNAHAR i IN. 1999, EJSINK i IN. 2002, FIMLAND i IN. 2005, DRIDER i IN. 2006). Większość z nich wyizolowano z produktów regionalnych (TOPISIROVIC i IN. 2006, SIP i IN. 2009). Polskie produkty regionalne, takie jak np. oscypek, nie były, jak dotąd, badane na obecność bakterii fermentacji mlekowej (LAB) zdolnych do syntezy listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa. W literaturze brak jest również wyników identyfikacji LAB uczestniczących w procesie produkcji oscypka. Z tego powodu postanowiono przebadać metagenomowe DNA mikroflory oscypków na obecność sekwencji typowych dla wybranych potencjalnie bakteriocynogennych rodzajów LAB oraz ustalić, czy występują w nim fragmenty genów kodujących listeriobójcze bakteriocyny klasy IIa. Dzięki temu uzyskano informacje o składzie rodzajowym LAB oscypków oraz dokonano wstępnej oceny ich potencjału listeriobójczego. W pracy określono również liczebność wybranych grup drobnoustrojów, stosując klasyczne metody mikrobiologiczne.

Materiały i metody

Oscypek

Materiałem badawczym było dziewięć prób oscypków wyprodukowanych we wrześniu 2009 roku w okolicach Nowego Targu. Wytypowane do badań oscypki pochodziły od dziewięciu różnych producentów.

Oznaczanie liczebności wybranych grup drobnoustrojów

Z każdej próby oscypka pobierano 10 g, zawieszano w 90 ml cytrynianu trójsodowego, homogenizowano za pomocą homogenizatora mikrobiologicznego Pulsifier i rozcieńczano w wodzie peptonowej metodą rozcieńczeń dziesiętnych. Rozcieńczony materiał posiewano na odpowiednie podłoża w celu oznaczenia ogólnej liczby tlenowych bakterii mezofilnych, liczby bakterii fermentacji mlekowej oraz drożdży i pleśni. Do oznaczania liczby bakterii tlenowych stosowano bulion wzbogacony (Biocorp) z 2% (v/v) glukozy, do oznaczania liczby bakterii fermentacji mlekowej (odpowiednio: pałeczek mlekowych, paciorkowców mlekowych oraz kwasolubnych LAB) używano podłoża MRS agar (Biocorp), M17 agar (Biocorp), Raka-Ray agar (R-R, Biocorp), a liczbę drożdży i pleśni oznaczano na podłożu chloramfenikol agar (Biocorp). Wszystkie podłoża do oznaczeń liczebności bakterii suplementowano 50 mg natamycyny na 1 l (Devocid®, Gist-brocades). Posiewy wykonywano metodą zalewową (płytki Petriego). Hodowle bakterii tlenowych oraz LAB prowadzono w temperaturze 37°C przez 48-72 h, a drożdży i pleśni – w temperaturze 20°C przez 72-96 h. Po inkubacji liczono otrzymane kolonie za pomocą automatycznego licznika kolonii (Colony Counter, Easy Count 2) i na tej podstawie obliczano liczebność populacji badanych grup drobnoustrojów, którą wyrażano w jednostkach tworzących kolonie w 1 g oscypka.

Izolacja metagenomowego DNA

10 g każdego sera zawieszano w 200 ml bulionu wzbogaconego, rozdrabniano w Pulsifierze i inkubowano w temperaturze 37°C przez 16 h. 2 ml otrzymanej hodowli

odwirowywano (5500 g, 10 min), a następnie z osadu izolowano metagenomowe DNA. Do jego izolacji stosowano zestaw Genomic Mini (A&A Biotechnology). Izolacje prowadzono według instrukcji podanej przez producenta. W otrzymanych próbach potwierdzano obecność DNA bakteryjnego poprzez przeprowadzenie reakcji PCR ze starterami EUBAC (tab. 1) zaprojektowanymi na podstawie analizy sekwencji genów małej podjednostki 16S rybosomu bakteryjnego. Amplifikacje prowadzono w aparacie firmy Biometra T Gradient w warunkach przedstawionych w tabeli 2. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 2-procentowym żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (0,5 µg/ml). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze TBE (1×) przy stałym natężeniu 80 mA przez 60 min.

Tabela 1. Zastosowane startery

Table 1. Primers used

Starter	Sekwencja (5' → 3')	Zastosowanie	Wielkość produktu PCR (pz)	Źródło
EUBAC-50F	AACACATGCTCGAACG	Bakteryjne DNA	≈ 300	Dawson, dane niepublikowane
EUBAC-338R	CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT			
LactogrP1F	GCGGCGTGCCTAATACATGC	<i>Lactococcus</i>	319	KLIJN i IN. 1995
LactogrP2Rkr	CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT			
LeucgrpF	GCGGCTGCGGCGTCACCTAG	<i>Leuconostoc</i>	1 200	SCHILLINGER i IN. 2008
Leucgr-WeissgrR	GGNTACCTTGTTACGACTTC			
WeissgrpF	GATGGTTCTGCTACCACTAAG	<i>Weissella</i>	1 200	SCHILLINGER i IN. 2008
Leucgr-WeissgrR	GGNTACCTTGTTACGACTTC			
Entgr1F	TACTGACAAACCATTTCATGATG	<i>Enterococcus</i>	112	KE i IN. 1999
Entgr2R	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
Lactob0677F	CTCCATGTGTAGCGGTG	<i>Lactobacillus</i>	950	MOURA i IN. 2007
Lactob71R	TCAAAACTAAACAAAGTTTC			
Carnob1F	CCGTCAGGGGATGAGCAGTTAC	<i>Carnobacterium</i>	820	NISSEN i IN. 1994
Carnob2R	ACATTCGAAACGGATGCTAAT			
Pediogr23SF	GAACTCGTGTACGTTGAAAAGTGCTGA	<i>Pediococcus</i>	701	PFANNEBECKER i FRÖHLICH 2008
Pediogr23SR	GCGTCCCTCCATTGTTCAAACAAG			
BCgr1F	GGTGGTAAATACTATGGTAA	Geny kodujące bakteriocyny klasy IIa	≈ 50	WIĘCKOWICZ i IN. 2010
BCgr1R1K	CCCCAGTTAACAGAGCA			

Sip A., Więckowicz M., Jarka J., Olejnik-Schmidt A., Grajek W., 2011. Badanie oscypków na obecność bakterii fermentacji mlekowej o zdolności syntezy listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa. *Nauka Przyr. Technol.* 5, 2, #12.

Tabela 2. Warunki reakcji PCR
Table 2. PCR reaction conditions

Etap	Temperatura (°C)	Czas (min)
1. Denaturacja wstępna	94 ⁹ , 95 ¹⁻⁸	3 ¹⁻⁵ , 5 ⁶⁻⁹
2. Przyłączanie starterów	52 ¹ , 55 ^{2,5} , 53 ³ , 50 ^{4,6,8} , 69 ⁷ , 48 ⁹	0,5 ^{1,5-8} , 1 ^{3,4,9} , 1,5 ²
3. Synteza	72	0,5 ^{1,6-8} , 1 ^{5,9} , 1,5 ^{3,4} , 2,5 ²
4. Denaturacja	94 ^{1-4,7,9} , 95 ^{5,6,8}	0,5 ^{1,5-8} , 0,75 ⁹ , 1 ² , 3 ^{3,4}
5. Przyłączanie starterów	52 ¹ , 55 ^{2,5} , 53 ³ , 50 ^{4,6,8} , 69 ⁷ , 45-56 gradient ⁹	0,5 ⁵⁻⁸ , 0,75 ⁹ , 1 ^{1,3,4} , 1,5 ²
6. Synteza końcowa	72	5 ^{1-4,7-9} , 7 ⁵ , 10 ⁶

¹EUBAC, ²*Lactococcus*, ³*Leuconostoc*, ⁴*Weissella*, ⁵*Enterococcus*, ⁶*Lactobacillus*, ⁷*Pediococcus*, ⁸*Carnobacterium*, ⁹geny kodujące bakteriocyny klasy IIa.

Wykrywanie wybranych rodzajów LAB

MetaDNA stosowano jako matrycę do analizy PCR, w której toku amplifikowano sekwencje charakterystyczne dla potencjalnie bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej rodzajów *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Weissella*. Sekwencje starterów wykorzystywanych do wykrywania fragmentów DNA wymienionych rodzajów LAB, wielkości produktów ich amplifikacji oraz warunki reakcji PCR podano w tabelach 1 i 2. Produkty PCR, w zależności od wielkości, rozdzielano w 1-, 2- lub 3-procentowym żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy (0,5 µg/ml). W przypadku amplikonów o długości poniżej 1000 pz stosowano specjalną agarozę o dużej zdolności rozdziału (Merck). Elektroforezę prowadzono w buforze TBE (1x) przy stałym natężeniu 80 mA mniej więcej przez 45 min.

Wykrywanie genów bakteriocyn klasy IIa

Fragmenty genów kodujących listeriobójcze bakteriocyny klasy IIa amplifikowano, stosując startery (tab. 1) zaprojektowane przez WIĘCKOWICZA i IN. (2010). Jako matrycę do reakcji ich wybiórczej amplifikacji stosowano metaDNA bakterii występujących w oscypku. Analizy PCR prowadzono w sposób zgodny z danymi zawartymi w tabeli 2. Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie w 3-procentowym żelu agarozowym w buforze 1× TBE przy stałym natężeniu 60 mA przez 45 min. DNA w żelu wizualizowano przez dodanie bromku etydy do stężeniu 5 µg/ml.

Wyniki i dyskusja

Dziewięć prób oscypków wyprodukowanych bez udziału kultur starterowych z niepasteryzowanego mleka owczego poddano złożonym badaniom mikrobiologicznym. W ich ramach metodą posiewową oznaczono liczebność bakterii mezofilnych, drożdży i pleśni oraz LAB. Z mikroflory oscypków izolowano ponadto metagenomowe DNA

i na podstawie wyników jego analizy prowadzonej metodą PCR z zastosowaniem odpowiednio dobranych starterów określono, jakie rodzaje LAB są typowe dla tych serów oraz czy są wśród nich mikroorganizmy o zdolnościach syntezy listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa.

Przeprowadzone badania, których wyniki przedstawiono w tabeli 3, wykazały, że liczebność grup drobnoustrojów oznaczanych w oscypkach była zróżnicowana. W sześciu próbach spośród dziewięciu badanych liczba bakterii mezofilnych mieściła się w przedziale od $1,2 \times 10^7$ jtk·g⁻¹ (próba 4.) do $7,1 \times 10^7$ jtk·g⁻¹ (próba 5.). W trzech oscypkach była ona mniejsza niż 10^7 jtk·g⁻¹, ale maksymalnie o jeden cykl logarytmiczny (próba 7.). Liczba drożdży w badanych próbach była bardziej wyrównana: w większości oscypków oscylowała wokół poziomu 10^6 jtk·g⁻¹. Jedynie w próbce oznaczonej jako 3. była mniej więcej o jeden rząd wielkości mniejsza. W żadnym oscypku nie wykryto obecności pleśni. Spośród oznaczanych grup drobnoustrojów we wszystkich oscypkach najbardziej liczna była populacja LAB. Do oznaczeń jej liczebności wykorzystano trzy podłoże: podłoże M17 rekomendowane do oznaczeń paciorkowców mlekowych, MRS zalecane do oznaczania pałeczek mlekowych oraz Raka-Ray faworyzujące wzrost kwasolubnych LAB. Dzięki temu oznaczono liczebność LAB o zróżnicowanych wymaganiach pokarmowych i warunkach rozwoju. Ustalono, że w oscypkach dominowały LAB zdolne do wzrostu na podłożach M17 i Raka-Ray. Średnio w badanych oscypkach ich liczebność wynosiła 5×10^8 jtk·g⁻¹. Liczba LAB rosnących na podłożu MRS była średnio mniej więcej o 0,4 cyklu logarytmicznego mniejsza.

Tabela 3. Liczebność wybranych mikroorganizmów w świeżym oscypku
Table 3. Cell counts of selected microorganisms in the fresh oscypek cheese

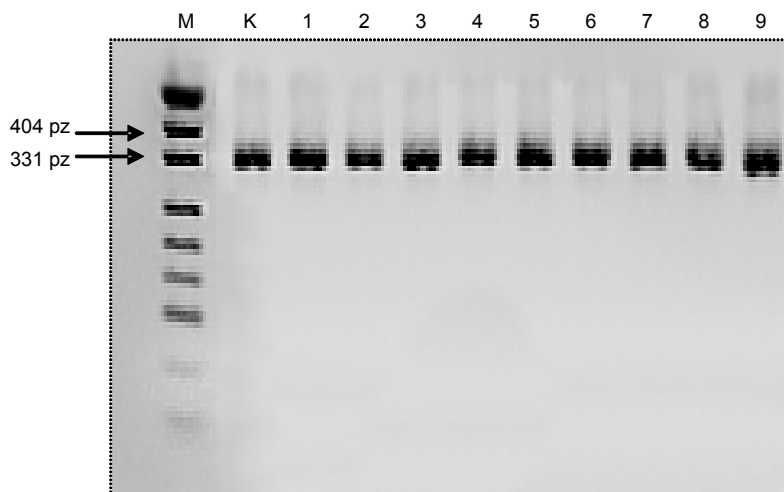
Próba oscypka	Logarytm liczebności komórek (jtk·g ⁻¹)					
	tlenowe bakterie mezofilne	bakterie fermentacji mlekowej			drożdże	pleśnie
		MRS	M17	R-R		
1.	7,454	7,914	8,907	8,794	6,035	0
2.	7,760	7,917	8,973	8,738	6,040	0
3.	7,557	7,904	8,682	8,584	5,104	0
4.	7,092	8,901	8,056	8,738	6,471	0
5.	7,854	8,977	8,976	9,083	6,421	0
6.	6,901	7,747	7,865	7,919	5,938	0
7.	6,017	7,679	7,789	7,928	5,777	0
8.	6,742	7,904	7,932	8,058	5,952	0
9.	7,809	7,862	8,833	8,202	5,609	0
Średnia	7,243	8,089	8,446	8,449	5,927	0
Odchylenie standardowe	0,6121	0,489	0,4901	0,4290	0,4132	0

Badaniem jakości mikrobiologicznej oscypków zajmowali się już inni badacze. Prezentowane przez nich wyniki oznaczeń liczebności wybranych grup drobnoustrojów różnią się jednak od wyników naszych badań. Przykładowo, według danych opublikowanych przez WOŁOSZEK i BONCZAR (2003) ogólna liczba drobnoustrojów w oscypkach wytworzonych w rejonie, z którego pochodziły również „nasze” oscypki, wynosiła około 10^9 jtk·g⁻¹, a liczebność drożdży mieściła się w przedziale od $4,4 \times 10^3$ do $7,2 \times 10^5$ jtk·g⁻¹. W oscypkach badanych przez wymienione autorki obecne były ponadto pleśnie. Z doświadczeń innych autorów również wynika, że skład ilościowy i jakościowy mikroflory produktów regionalnych wytwarzanych metodą spontanicznych fermentacji wykazuje znaczne zróżnicowanie z uwagi na zmienność składu mikroflory surowca oraz różnice w stanie mikrobiologicznym środowiska produkcyjnego, będącego jednocześnie głównym źródłem drobnoustrojów uczestniczących w procesie produkcji (GULAHMADOV i IN. 2006, BELGACEM i IN. 2008). Czynniki te prawdopodobnie były również odpowiedzialne za zaobserwowane przez nas różnice w jakości mikrobiologicznej badanych oscypków.

W pracy podjęto także próbę ustalenia, jakie rodzaje LAB wchodzi w skład naturalnej mikroflory oscypków. W celu uzyskania pełnej informacji o składzie rodzajowym LAB oscypków metagenomowe DNA (wyizolowane z naturalnie zasiedlającej je mikroflory) przebadano na obecność sekwencji typowych dla siedmiu rodzajów LAB, które, jak wynika z danych literaturowych (GRAJEK i SIP 2004, SIP i GRAJEK 2004), odgrywają kluczową rolę w utrwalaniu serów. W badaniach tych wykorzystano startery rodzajowe zaprojektowane na podstawie analizy sekwencji 16S i 23S rDNA. W wyniku reakcji PCR prowadzonej ze starterami LactocgrP1F/LactocgrP2Rkr oraz LeucgrpF/Leucgr-WeissgrR we wszystkich badanych próbach (ścieżki 1-9) otrzymano produkty amplifikacji o pożądanym wielkości, tj. 319 pz w przypadku starterów do wykrywania *Lactococcus* (rys. 1) oraz 1200 pz w przypadku starterów specyficznych dla *Leuconostoc* (rys. 2). Amplikony o długości typowej dla *Enterococcus* (112 pz) i *Lactobacillus* (950 pz) otrzymano z kolei w ośmiu próbach spośród dziewięciu badanych (rys. 3, 4). W próbie 2. nie otrzymano produktu amplifikacji sekwencji typowych dla bakterii *Lactobacillus*, a w próbie 9. – dla bakterii *Enterococcus*. W żadnej próbie nie uzyskano także produktów amplifikacji sekwencji charakterystycznych dla *Carnobacterium*, *Pediococcus* i *Weissella*.

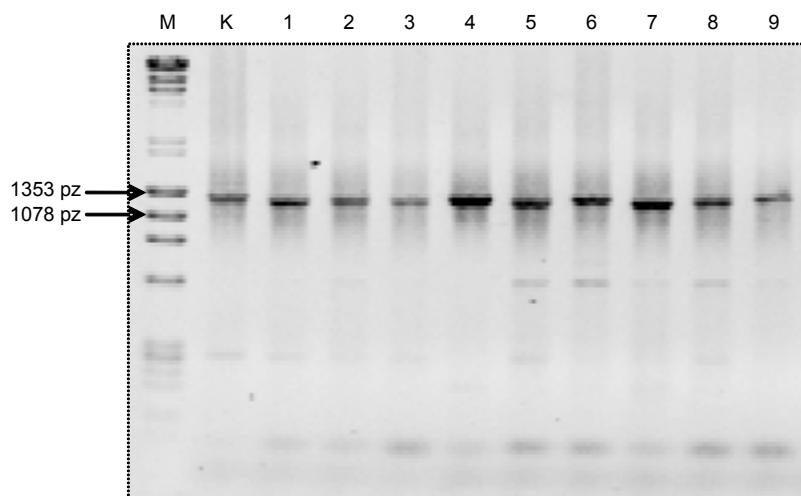
Oznacza to zatem, że w metagenomowym DNA mikroflory wszystkich badanych prób oscypków było obecne DNA bakterii *Lactococcus* i *Leuconostoc*. W ośmiu oscypkach na dziewięć badanych występowało także DNA bakterii *Enterococcus* i *Lactobacillus*. W żadnej próbie badanego metagenomowego DNA nie wykryto sekwencji typowych dla bakterii z rodzajów *Carnobacterium*, *Pediococcus* i *Weissella* (tab. 4). Obecność materiału genetycznego bakterii *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* i *Lactobacillus* w większości prób oscypków dowodzi jednocześnie, że wymienione rodzaje bakterii są charakterystyczne (typowe) dla oscypków i to one prawdopodobnie nadają im unikalne właściwości. W chwili obecnej niezbędne jest dokładne zidentyfikowanie tych bakterii i wyjaśnienie ich roli w procesie produkcji oscypków. Przyczyny oraz konsekwencje braku obecności bakterii *Enterococcus* i *Lactobacillus* w dwóch oscypkach powinny być także przedmiotem dalszych szczegółowych badań.

Z danych literaturowych wynika, że wiele bakterii fermentacji mlekowej rodzajów *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* i *Lactobacillus*, których bogatym źródłem



Rys. 1. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji PCR ze starterami LactocgrP1F/LactocgrP2Rkr; M – marker DNA pUC *Msp*I, K – kontrola dodatnia – *Lactococcus lactis* ATCC 11454, 1-9 – próby oscypka

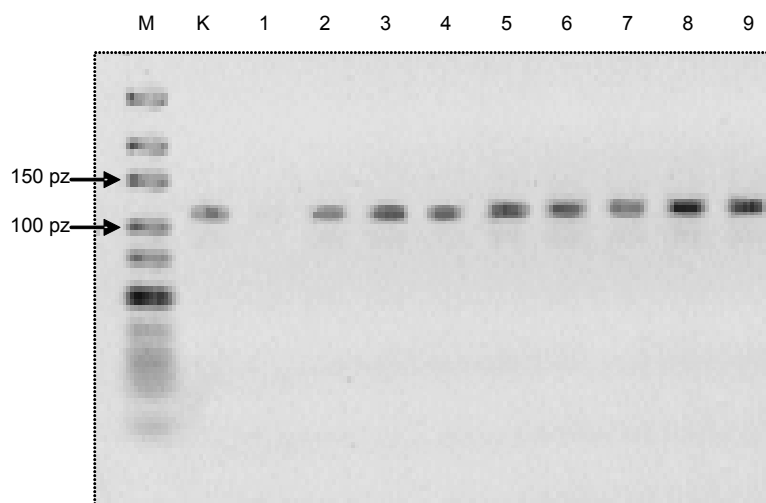
Fig. 1. Electrophoretical pattern of PCR products with primers LactocgrP1F/LactocgrP2Rkr; M – DNA marker pUC *Msp*I, K – positive control – *Lactococcus lactis* ATCC 11454, 1-9 – oscypek samples



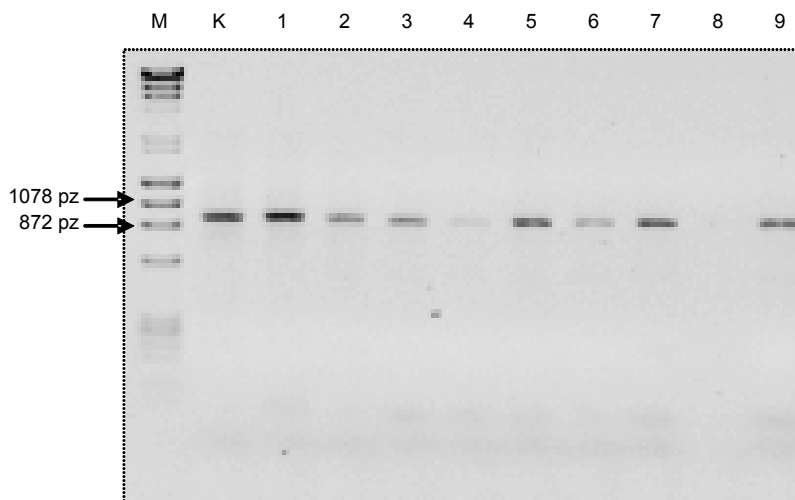
Rys. 2. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji PCR ze starterami LeucgrpF/Leucgr-WeissgrR; M – marker λ DNA *Hind*III / ϕ X174 DNA *Hae*III, K – kontrola dodatnia – *Leuconostoc mesenteroides* KBiMŻ 1AS, 1-9 – próby oscypka

Fig. 2. Electrophoretical pattern of PCR products with primers LeucgrpF/Leucgr-WeissgrR; M – λ DNA marker *Hind*III / ϕ X174 DNA *Hae*III, K – positive control – *Leuconostoc mesenteroides* KBiMŻ 1AS, 1-9 – oscypek samples

Sip A., Więckowicz M., Jarka J., Olejnik-Schmidt A., Grajek W., 2011. Badanie oscypków na obecność bakterii fermentacji mlekowej o zdolności syntezy listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa. *Nauka Przyr. Technol.* 5, 2, #12.



Rys. 3. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji PCR ze starterami Entgr1F/Entgr2R; M – marker O'Gene Ruler DNA Ladder Ultra Low Range, K – kontrola dodatnia – *Enterococcus faecium* ATCC 27270, 1-9 – próby oscypka
 Fig. 3. Electrophoretical pattern of PCR products with primers Entgr1F/Entgr2R; M – O'Gene Ruler DNA Ladder Ultra Low Range marker, K – positive control – *Enterococcus faecium* ATCC 27270, 1-9 – oscypek samples



Rys. 4. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji PCR ze starterami Lactob0677F/Lactob71R; M – marker O'Gene Ruler DNA Ladder Ultra Low Range, K – kontrola dodatnia – *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, 1-9 – próby oscypka
 Fig. 4. Electrophoretical pattern of PCR products with primers Lactob0677F/Lactob71R; M – O'Gene Ruler DNA Ladder Ultra Low Range marker, K – positive control – *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, 1-9 – oscypek samples

Tabela 4. Wyniki amplifikacji metaDNA mikroflory oscypka ze starterami specyficznymi dla sześciu rodzajów LAB oraz ze starterami do wykrywania fragmentów genów kodujących bakteriocyny klasy IIa

Table 4. Results of amplification of metaDNA of oscypek microflora with primers specific for six genera of LAB, as well as primers for detection fragments of the genes-encoding class IIa bacteriocins

Cel detekcji	Starter	Próby oscypka								
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
<i>Lactococcus</i>	LactogrP1F/LactogrP2Rkr	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Leuconostoc</i>	LeucgrpF/Leucgr-WeissgrR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus</i>	Lactob0677F/Lactob71R	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Enterococcus</i>	Entgr1F/Entgr2R	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Carnobacterium</i>	Carnob1F/Carnob2R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus</i>	Pediogr23SF/Pediogr23SR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Weissella</i>	WeissgrpF/Leucgr-WeissgrR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geny kodujące bakteriocyny klasy IIa	BCgr1F/BCgr1R1K	+	+	+	+	+	+	+	+	+

„+” – produkt PCR, „-” – brak produktu amplifikacji.

okazał się oscypek, jest zdolnych do syntezy bakteriocyn klasy IIa, czyli bakteriocyn działających zabójczo na *L. monocytogenes* (ENNAHAR i IN. 1999, EIJSINK i IN. 2002, FIMLAND i IN. 2005, DRIDER i IN. 2006, SIP i IN. 2009). Większość autorów badania nad potencjałem listeriobójczym mikroflory danego środowiska rozpoczyna od czasochłonnych prac izolacyjnych (OHMOMO i IN. 2003, GHRAIRI i IN. 2004, BELGACEM i IN. 2008). Z pracami tymi wiąże się zwykle konieczność prowadzenia hodowli i oznaczania aktywności wytworzonych w ich trakcie związków. Nasze wcześniejsze doświadczenia wskazują jednak, że wyniki oznaczeń aktywności nie są miarodajnym wyznacznikiem zdolności mikroflory do syntezy listeriobójczych bakteriocyn, wiele bakteriocyn w warunkach laboratoryjnych jest bowiem syntetyzowanych w stężeniach zbyt małych do oznaczenia (poniżej progu detekcji) lub ulega inaktywacji (HOOVER i HARLANDER 1993). Często również w produktach finalnych bakteriocynogenne drobnoustroje występują w liczbie zbyt niewielkiej, by możliwe było ich wyizolowanie i/lub oznaczenie ich aktywności. Z tego też względu prezentowane w literaturze wyniki oznaczeń potencjału listeriobójczego są zwykle zaniżone. Niedoskonałość klasycznych metod mikrobiologicznych utrudnia również efektywne pozyskiwanie drobnoustrojów zdolnych do syntezy bakteriocyn. Uzupełnieniem klasycznego postępowania analitycznego i jednocześnie dobrym sposobem na jego ukierunkowanie może być analiza metagenomowa. W przypadku badań potencjału listeriobójczego mikroflory oscypka przeprowadzono ją na obecność fragmentów genów kodujących listeriobójcze bakteriocyny klasy IIa. Geny listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa zawierają w obrębie końca 5' genu domenę o wysokim stopniu podobieństwa, odpowiadającą motywowi YGNGVxCxxxxC, zlokalizowanemu na końcu aminowym propeptydu tych bakteriocyn. W obrębie sekwencji

końców 3' badanych genów znajdują się także krótkie motywy o wysokim stopniu podobieństwa (FIMLAND i IN. 2005, DRIDER i IN. 2006, SIP i IN. 2009). Informacje te poparte przeprowadzeniem wnikliwej analizy bioinformatycznej pozwoliły na zaprojektowanie panelu unikalnych starterów do detekcji genów kodujących listeriobójcze bakteriocyny klasy IIa (WIĘCKOWICZ i IN. 2010). Przykładowe startery (tab. 1) wykorzystano jako narzędzie do analizy metagenomowego DNA mikroflory oscypków. W rozdziale elektroforetycznym po analizie PCR ze starterami BCgr1F/BCgr1R1K otrzymano produkty o długości ≈ 50 pz (rys. 5). Produkty te zawierały fragmenty poszukiwanych genów. Na tej podstawie stwierdzono, że w obrębie mikroflory oscypków znajdują się drobnoustroje będące nośnikami genów listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa. Wykrycie w obrębie metagenomowego DNA mikroflory oscypków fragmentów tych genów sugeruje jednocześnie, że oscypki mogą być źródłem LAB zdolnych do syntezy bakteriocyn klasy IIa. W chwili obecnej niezbędne jest ustalenie, czy wykryte geny ulegają ekspresji, a więc czy LAB będące ich nośnikami są zdolne do syntezy aktywnych bakteriocyn. Potwierdzenie w oscypkach obecności LAB syntetyzujących bakteriocyny może być w przyszłości ważnym elementem marketingowym promocji oscypka jako produktu naturalnie zabezpieczonego przed chorobotwórczymi bakteriami *L. monocytogenes*.



Rys. 5. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji PCR ze starterami BCgr1F/BCgr1R1K; M – marker O'Gene Ruler DNA Ladder Ultra Low Range, K – kontrola dodatnia – *Carnobacterium divergens* AS7, 1-9 – próby oscypka

Fig. 5. Electrophoretical pattern of PCR products with primers BCgr1F/BCgr1R1K; M – O'Gene Ruler DNA Ladder Ultra Low Range marker, K – positive control – *Carnobacterium divergens* AS7, 1-9 – oscypek samples

Wnioski

1. Mikroflora oscypków wytworzonych w tym samym regionie przez różnych producentów jest zróżnicowana pod względem liczby obecnych bakterii.
2. Typową mikroflorą oscypków są bakterie rodzajów *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* i *Lactobacillus*.
3. Wśród LAB wchodzących w skład naturalnej mikroflory oscypków są mikroorganizmy zdolne do syntezy bakteriocyn klasy IIa.

Literatura

- BAYER S., KUNERT A., BALLSCHMITTER M., GREINER-STOEFFELE T., 2010. Indication for a new lipolytic enzyme family: isolation and characterization of two esterases from a metagenomic library. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 18: 181-187.
- BELGACEM B.Z., FERCHICHI M., PRÉVOST H., DOUSSET X., MANAI M., 2008. Screening for anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria from “Gueddid” – a traditionally Tunisian fermented meat. *Meat Sci.* 78: 513-521.
- BRUGERE J.F., MIHAJLOVSKI A., MISSAOUI M., PEYRET P., 2009. Tools for stools: the challenge of assessing human intestinal microbiota using molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 9: 353-365.
- CHEN H., HOOVER D.G., 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2: 82-100.
- CLEVELAND J., MONTVILLE T.J., NES I.F., CHKINDAS M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1-20.
- DEJA-SIKORA E., SIKORA M., GOLEBIEWSKI M., TRETYN A., 2007. Metagenomic libraries as sources of genes useful for biotechnology. *Biotechnology* 4: 125-139.
- DRIDER D., FIMLAND G., HECHARD Y., MCMULLEN L.M., PRÉVOST H., 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 24: 85-106.
- EIJSINK V.G.H., AXELSSON L., DIEP D.B., HAVARSTEIN L.S., HOLO H., NES I.F., 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria: an example of biological warfare and communication. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol.* 81: 639-654.
- ENNAHAR S., SONOMOTO K., ISHIZAKI A., 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 705-716.
- FIMLAND G., JOHNSEN L., DALHUS B., NISSEN-MEYER J., 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Pept. Sci.* 11: 688-698.
- GALVEZ A., ABRIQUEL H., LOPEZ R.L., OMAR N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 12: 51-70.
- GHRAIRI T., MANAI M., BERJEAUD J.M., FRÈRE J., 2004. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. *J. Appl. Microbiol.* 94: 621-628.
- GIRAFFA G., NEVIANI E., 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 19-34.
- GRAJEK W., SIP A., 2004. Biologiczne utrwalanie żywności z wykorzystaniem bakterii mlekowych i ich metabolitów. W: *Bakterie fermentacji mlekowej – klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie*. Red. Z. Libudzisz. Wyd. PŁ, Łódź: 175-226.
- GULAHMADOV S.G., BATDORJ B., DALGALARRONDO M., CHOBERT J.-M., KULIEV A.A., HAERTLE T., 2006. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from lactic acid bacteria isolated from traditional Azerbaijani cheese. *Eur. Food Res. Technol.* 224: 229-235.
- HOOVER D.G., HARLANDER S.K., 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity. W: *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Red. D.G. Hoover, L.R. Steenson. Academic Press, San Diego: 23-39.
- KE D., PICARD F.J., MARTINEAU F., MENARD CH., ROY P.H., OUELLETTE M., BERGERON M.G., 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3497-3503.
- KLIJN N., WEERKAMP A.H., DE VOS W.M., 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 788-792.
- MOURA P., SIMÕES F., GIRIO F., LAUREIRO-DIAS M.C., 2007. PCR monitoring of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* dynamics in fermentations by piglet intestinal microbiota. *J. Basic Microbiol.* 47: 148-157.

Sip A., Więckowicz M., Jarka J., Olejnik-Schmidt A., Grajek W., 2011. Badanie oscypeków na obecność bakterii fermentacji mlekowej o zdolności syntezy listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa. *Nauka Przyr. Technol.* 5, 2, #12.

- NISSEN H., HOLCK A., DAINTY R.H., 1994. Identification of *Carnobacterium* spp. and *Leuconostoc* spp. in meat by genus-specific 16S rRNA probes. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 165-168.
- OHMOMO S., NITISINPRASART S., HIRANPRADIT S., 2003. How to screen favorable lactic acid bacteria strain, from the case of bacteriocin producing strain and silage fermentation starter strain. W: The world of indigenous fermented foods for technology development and food safety. Kasetsart University, Bangkok, August, 2003. Proceeding CD-ROM. Kasetsart University, Bangkok: I-6. [CD-ROM].
- O'SULLIVAN R., ROSS R.P., HILL C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie (Paris)* 84: 593-604.
- PFANNEBECKER J., FRÖHLICH J., 2008. Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 288-296.
- SCHILLINGER U., BOEHRINGER B., WALBAUM S., CAROLINE L., GONFA A., HUCH M., 2008. A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* 286: 222-226.
- SIP A., GRAJEK W., 2004. Zastosowanie bakteriocyn i bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej w przemyśle spożywczym. W: Bakterie fermentacji mlekowej – klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie. Red. Z. Libudziś. Wyd. PŁ, Łódź: 121-174.
- SIP A., WIĘCKOWICZ M., KRASOWSKA M., 2009. Charakterystyka listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa bakterii fermentacji mlekowej. *Biotechnologia* 3: 111-128.
- STREIT W.R., SCHMITZ R.A., 2004. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 492-498.
- TODOROV S.D., DICKS L.M.T., 2006. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Comparison of the bacteriocins. *Process Biochem.* 41: 11-19.
- TOPISIROVIC L., KOJIC M., FIRA D., GOLIC N., STRAHINIC I., LOZO J., 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 112: 230-235.
- WIĘCKOWICZ M., SCHMIDT M., GRAJEK W., w rejestracji. Sposób i zestaw do detekcji genów kodujących listeriobójcze bakteriocyny klasy IIa. Zgłoszenie patentowe WIPO ST/10C P-390490, 2010. Maszynopis. Państwowy Urząd Patentowy, Warszawa.
- WOŁOSZEK M., BONCZAR G., 2003. Jakość mikrobiologiczna oscypeków z mleka owczego, owczokrowiego i krowiego. *Żywność* 3 (suppl.): 103-116.

EVALUATION OF CLASS IIA BACTERIOCINOGENIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM THE OSCYPEK CHEESE

Summary. The main objective of the study was the phylogenetic identification on the genus level of the main LAB isolated from the oscypek cheese and the assessment of their bacteriocinogenic potential. Primarily, a routine qualitative analysis of the microbiota was performed. Nine oscypek cheese samples were subjected to the analysis. The quantitative analysis of the cheese microbiota was performed using culture-based techniques, while the qualitative assessment was made using PCR-based analysis of total DNA preparations. Metagenomic DNA isolates derived from the cheese natural microbiota were screened for the existence of DNA sequence fragments typical for seven main potentially bacteriocinogenic LAB genera. Moreover, metagenomic DNA extracts were also screened for class IIa bacteriocin-coding gene sequences. The presence of seven main LAB genera was determined using primers originating from reference publications, while the

class IIa bacteriocin-coding gene was detected using custom-designed primer panel created in the Department of Biotechnology and Food Microbiology at the Poznań University of Life Sciences. The study revealed, that in most cheese samples the counts of LAB exceeded 10^8 cfu·g⁻¹. The counts of aerobic bacteria and yeasts was lower 1 and 2 log cycles, respectively. In all metagenomic DNA extracts, sequences typical for *Lactococcus* and *Leuconostoc* genera were found. In addition to this, eight cheese samples revealed the presence of *Lactobacillus*- and *Enterococcus*-specific sequences. The DNA sequences typical for the genera *Carnobacterium*, *Pediococcus* and *Weissella* were not present in any of the analysed material. Class IIa bacteriocin-coding sequences were detected in all metagenomic DNA preparations subjected to this study. It is essential to undertake further isolation procedures in order to determine, whether LAB rich in class IIa bacteriocin-coding genes are able to synthesize active bacteriocins and reveal inhibitory activity towards *Listeria*.

Key words: oscypek cheese, lactic acid bacteria, IIa class bacteriocins, metagenomic analysis

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Anna Sip, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, Poland, e-mail: aniasip@up.poznan.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

18.01.2011

Do cytowania – For citation:

*Sip A., Więckowicz M., Jarka J., Olejnik-Schmidt A., Grajek W., 2011. Badanie oscypków na obecność bakterii fermentacji mlekowej o zdolności syntezy listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa. *Nauka Przyr. Technol.* 5, 2, #12.*