

# Bakteriocyny syntetyzowane przez *Lactobacillus*

Łucja Łaniewska-Moroz

Iwona Warmińska-Radyko

Zakład Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności  
Akademia Rolniczo-Techniczna  
Olsztyn

**B**akterie fermentacji mlekowej syntetyzują szereg metabolitów o oddziaływaniu antybakteryjnym. Wśród nich wymienia się: kwas mlekowy, kwas octowy, nadtlenek wodoru, diacetyl, aldehyd octowy, związki systemu lakto-peroksydazy oraz substancje określane mianem bakteriocyn.

W ostatnich latach wyraźnie wzrosło zainteresowanie bakteriocynami. Prowadzone są intensywne poszukiwania nowych szczepów produkujących peptydy i białka o działaniu antybakteryjnym (1-7).

Publikowane dotąd prace na temat bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej dotyczą głównie ich budowy, funkcji biologicznej oraz warunków ich biosyntezy (8-16).

Od początku lat osiemdziesiątych prowadzone są intensywne badania w zakresie:

- poszukiwania nowych szczepów zdolnych do syntezy bakteriocyn;
- określenia spektrum ich aktywności i mechanizmu działania;
- charakteryzowania tych antybakteryjnych białek pod względem biochemicznym i molekularnym;
- optymalizowanie warunków biosyntezy;
- zastosowania ich jako biokonserwantów różnego typu produktów żywnościowych (17-22).

Bakteriocyny różnią się masą cząsteczkową, termostabilnością, wrażliwością na działanie enzymów proteolitycznych i zakresem działania. W ich charakterystyce uwzględnia się:

- rodzaj bakterii producentów,
- spektrum antybakteryjnego działania,
- sposób oddziaływania,
- właściwości biochemiczne.

Ogólnie przyjmuje się, że są to proste lub złożone białka, zdolne do bakteriostatycznego lub bakteriobójczego działania (23-29).

Zasadniczy wpływ na jakość i ilość wytwarzanych bakteriocyn ma skład podłoża zastosowanego do hodowli szczepu „producenta” bakteriocyn oraz warunki hodowli takie jak: temperatura, pH, napowietrzenie, wiek hodowli. Dobór składu pożywek i pH często decyduje o syntezie bakteriocyny. Ważnym czynnikiem w ocenie jakości uzyskanej bakteriocyny jest stopień oczyszczenia preparatu (tab. 1).

TABELA 1  
WARUNKI SYNTEZY, METODY OCZYSZCZANIA ORAZ MASA CZĄSTECZKI BAKTERIOCYN  
SYNTETYZOWANYCH PRZEZ *Lactobacillus*

Szczep producenta	Nazwa bakteriocyny	Podłoża hodowlane	Metody oczyszczania	Masa cząsteczki [KDa]	Literatura
1	2	3	4	5	6
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 11088	laktacyna F	MRS, pH 7,0	AS, GF, HPLC, SDS-PAGE	6,3	30, 31
<i>Lactobacillus acidophilus</i> N2	laktacyna B	MRS, pH 6,0	IEX, VF, GF	6,0	32
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAPT 1060	acidofilicyna A	MRS, 0,5% glukozy 0,5% laktozy	NO	NB	33
<i>Lactobacillus acidophilus</i> M 46	acidocyna B	MRS	SDS-PAGE	2,4	21
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM 1132	acidocyna J 1132	MRS	AS, CEX, UF	NB	7
<i>Lactobacillus amylovorus</i> DCE 471	amylovoryna L 471	MRS	SDS-PAGE, AS	NB	4
<i>Lactobacillus bavaricus</i> M 1401	bavarycyna A	MRS	AS, IEX, HIC, SDS-PAGE	3,5-4,0	34
<i>Lactobacillus bavaricus</i> MN	bavarycyna MN	MRS, ATP, MRS-Tween 80 pH 6,5	SDS-PAGE	22,6	35
<i>Lactobacillus brevis</i> B 37	brevicyna 37	TJM SM-2p	NO	NB	7
<i>Lactobacillus brevis</i> B 155	NN	TSA – (w/o glukoza w 0,15% YE)	NO	NB	36
<i>Lactobacillus brevis</i> SB 27	brevicyna 27	MRS	AS, CEX	10-30	37
<i>Lactobacillus brevis</i> VB 286	brevicyna 286	MRS, pH 6,2 YEG	AS, GF, VF, dializa	NB	4
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 705	brevicyna 705	MRS	NO	NB	38
<i>Lactobacillus casei</i> B 80	kazeicyna 80	TMJ SM-2	VF, CEX, GF-FPLC	~41	39
<i>Lactobacillus curvatus</i> LHT 1174	curvacyna A	MRS	AS, CEX	NB	40
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> JCM 1248	laktacyna B	MRS, 0,5% glukozy 0,5% laktozy	NO	NB	41
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> JCM 1106	laktacyna A	MRS, 0,5% glukozy 0,5% laktozy	NO	NB	41

1	2	3	4	5	6
<i>Lactobacillus fermenti</i> 466	NN	MRS	zagęszczanie próżniowe, dializa, GF, CEX	NB	42
<i>Lactobacillus gasserii</i> LA 39	gasserycyna A	MRS w/o Tween 80	RP-HPLC, SDS-PAGE	3,8	43
<i>Lactobacillus gasserii</i> (szczepy)	gasserycyna A	MRS	NO	NB	44
<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	helvetycyna J	MRS, pH 5,5	AS, GF, SDS-PAGE	~37	45
<i>Lactobacillus helveticus</i> LP 27	lactocyna 27	APT Tween 80	GF, wytrącanie CHCl <sub>3</sub> , SDS-PAGE	12,4	46
<i>Lactobacillus plantarum</i> C-11	planarycyna A	MRS	koncentracja przez dializę	NB	10
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCDO 1193	planarycyna B	MRS (0,5% glukoza)	NO	NB	47
<i>Lactobacillus plantarum</i> C-19	planarycyna C19	MRS	AS, IEX, GF	3,5	48
<i>Lactobacillus plantarum</i> BN	planarycyna BN	MRS, ATP, MRS-Tween 80 pH 6,5	SDS-PAGE	10,0	35
<i>Lactobacillus plantarum</i> LC 74	planarycyna LC74	MRS	AS, CEX, HIC	5	49
<i>Lactobacillus plantarum</i> LPC010	planarycyna S planarycyna T	MRS	AS	NB	50, 51
<i>Lactobacillus reuteri</i> LA 6	reuterycyna 6	MRS	VF, dializa	NB	52
<i>Lactobacillus sake</i> Lb 706	sakocyna A	MRS (0,2% glukozy)	dializa, zagęszczanie próżniowe	NB	13
<i>Lactobacillus sake</i> L 45	laktocyna S	MRS	AS, GF, IEX, HIC, HPLC	NB	53
<i>Lactobacillus sake</i> 148	NN	MRS	NP	NB	54
<i>Lactobacillus sake</i> 251	sakocyna B	MRS	SDS-PAGE, AS	6,3	55
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. salicinius T 140	salivacyna 140	MRS (0,2% glukozy) pH 7,5-8,5	NP	NB	1
<i>Lactobacillus</i> sp. 100-37	NN	MRS	AS, dializa	NB	56

Objaśnienia skrótów: MRS, ATP — nazwy handlowe podłoży; TJM — podłoże z sokiem pomidorowym; TSA — podłoże z wyciągiem sojowym; YE — ekstrakt drożdżowy; SM-2, SM-2p. — buliony modyfikujące podłoża; AS — wytrącanie siarczynem amonu; AP — wytrącanie kwasami; GF — filtracja na żelu; IEX — wymiana jonowa; CEX — wymiana kationów; HPLC — wysokosprawna chromatografia cieczowa; UF — ultrafiltracja; HIC — chromatografia oparta na oddziaływaniach hydrofobowych; SDS-PAGE — elektroforeza na żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecylu sodu; NO — nie oczyszczano; NN — nie nazwano; NB — nie badano.

Od kilku lat w centrum zainteresowania znajdują się bakteriocynty syntetyzowane przez *Lactobacillus* (57-66). Aktywność bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej zależy od:

- pH;
- obecności proteaz — wszystkie bakteriocynty, ponieważ mają białkową naturę, są wrażliwe na enzymy proteolityczne;
- temperatury — znaczna część bakteriocyn traci aktywność w wysokich temperaturach przy niskim pH; tylko niektóre są termostabilne i poddane sterylizacji nie tracą aktywności (20,67,68);
- innych czynników środowiskowych, jak np. ciśnienia osmotycznego, obecności substancji hydrofobowych w pożywce.

Wiele bakterii fermentacji mlekowej produkuje jeden lub więcej typów bakteriocyn, np. *Lactobacillus helveticus* syntetyzuje dwie bakteriocynty: laktocynę 27 i helwetycynę J, *Lactobacillus sake* produkuje sakacynę A i laktocynę S (tab. 2). Zdolność bakterii do wytwarzania tych metabolitów zakodowana jest w DNA plazmidowym lub chromosomalnym (11,20,69-71). Genowi odpowiedzialnemu za produkcję tego typu substancji towarzyszy zawsze gen odporności na własną bakteriocynę.

TABELA 2  
CHARAKTERYSTYKA BAKTERIOCYN SYNTETYZOWANYCH PRZEZ *Lactobacillus* (9)

Producent	Bakteriocyna	Spektrum działania	Właściwości
1	2	3	4
<i>L. fermenti</i>	bakteriocyna	<i>Lactobacillus fermenti</i>	kompleks wielkocząsteczkowy; część lipokarboksylowa
<i>L. gasseri</i>	gassericyna A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	białko, wrażliwe na trypsynę, stabilne w 120°C przez 20 min; charakterystyka podobna do laktacyny B i F
<i>L. helveticus</i>	laktocyna 27	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	kompleks białkowo-lipopolisacharydowy o masie 200 kDa; oczyszczony do masy 12,4 Da;
	helwetycyna J	<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> i <i>bulgaricus</i>	kompleks o masie >300 kDa, oczyszczony do 37 kDa

1	2	3	4
<i>L. plantarum</i>	plantaricyna A	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Leuconostoc</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp. <i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	białko o masie > 8 kDa; stabilne w 100°C przez 30 min, aktywne w szerokim pH od 4 + 6,5
	plantacyna B	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus damnosus</i>	białko
	bakteriocyna	<i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Streptococcus</i>	wrażliwe na proteazy, $\alpha$ -amylazy i lipazy, ciepłostabilne w 100°C przez 30 min, nieustalony fenotyp sugeruje, że są one determinowane przez plazmidy
Szczep 75 i 592	bakteriocyna	<i>Lactobacillus sake</i> <i>Lactobacillus curvatis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus divergens</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>spores</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	białko
<i>L. sake</i>	sakacyna A	<i>Carnobacterium piscicola</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Lactobacillus sake</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	determinowane przez plazmidy; 28 kb; białko
	laktocyna S	<i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Pediococcus</i>	zawiera lantioninę, aktywne w pH od 4,5 + 7,5
<i>L. acidophilus</i>	laktacyna B	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> (?)	kompleks o dużej masie cząsteczkowej, oczyszczony do 6,3 kDa, determinowany chromosomalnie;
	laktacyna F	<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	kompleks o dużej masie cząsteczkowej, oczyszczony, 57 aminokwasów, peptyd o masie 6,3 kDa. N-terminal rozciągnięty do 18 aminokwasu, ciepłostabilny w 121°C przez 15 min;
	acidophilicyna A	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	białko, inaktywowane przez trypsynę, ciepłolabilne w 60°C przez 10 min
<i>L. brevis</i>	brevicyna 37	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Leuconostoc oenos</i>	białko, ciepłostabilne w 121°C przez 1 godzinę, aktywne w pH od 2 + 10, inaktywowane chloroformem

1	2	3	4
<i>L. casei</i>	kazeicyna 80	<i>Lactobacillus casei</i>	40-kDa białko, pI = 4,5, ciepłostabilne w 60° przez 10 min, aktywne w pH od 3 ÷ 9, indukowane przez mitomycynę C
<i>L. carnis</i>	bakteriocyna(y)  karnocyna U149	<i>Lactobacillus</i>  <i>Carnobacterium</i> <i>Pediococcus Enterococcus</i> <i>Listeria</i>	białko, ciepłostabilne w 100°C przez 30 min, stabilne w pH od 2 ÷ 11, determinowane przez plazmidy; lantionina, 4635 Da, ciepłostabilne
<i>L. delbrueckii</i>	lakticyna A  lakticyna B	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>  <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>delbrueckii</i>	białko, ciepłolabilne w 60°C przez 10 min

Skład aminokwasowy bakteriocyn bakterii gramdodatnich wskazuje na częste występowanie w relatywnie większych ilościach lizyny, alaniny, leucyny i glicyny oraz brak lub niską zawartość aminokwasów siarkowych.

Klaenhammer (20,26) wyróżnia dwa typy bakteriocyn. Pierwszy o wąskim spektrum aktywności — tylko w stosunku do pokrewnych bakterii, np. laktocyna 27, laktocyna S oraz drugi, o szerokim spektrum działania w stosunku do innych bakterii gramdodatnich, w tym również *Clostridium botulinum* i *Listeria monocytogenes* (tab. 2). Bakteriocyny bakterii gramdodatnich mają wyraźnie szersze spektrum działania, niż bakteriocyny bakterii gramujemnych. Niektóre z bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej działają na szczepy wrażliwe wielu rodzajów i gatunków bakterii gramdodatnich.

Biorąc pod uwagę wielkość cząstek, termostabilność i właściwości hydrofobowe wyróżniono trzy główne klasy bakteriocyn produkowanych przez *Lactobacillus* (9):

- I — lantybiotyki: laktocyna S                    3,7 kDa  
                                 carnocyna U 149                    4,6 kDa
- II — małe hydrofobowe peptydy (<13 kDa) — termostabilne  
     100°C: laktocyna 27                    12,4 kDa  
                 carnobakteriocyna                    4,9 kDa  
                 laktacyna B                    6,3 kDa  
     121°C: laktacyna F                    6,3 kDa  
                 brevicyna 37
- III — większe (>30 kDa) termolabilne białka  
                 helvetycyna J                    37 kDa  
                 acidophilicyna A  
                 lakticyna A i B

W ostatnich latach dodatkowo wyodrębnia się grupę bakteriocyn o budowie kompleksowej z udziałem lipidów i węglowodanów.

Mortvedt i wsp. (52) wykazali, że laktocyna S (*Lactobacillus sake*) zawiera w swoim składzie lantioninę. De Klerk i Smith (42) w 1967 r. oczyścili i scharakteryzowali pierwszą bakteriocynę pałeczek fermentacji mlekowej syntetyzowaną przez *Lactobacillus fermenti*. Metabolit ten zawiera lipokarboksylowy składnik i jest hydrofobowym białkiem, względnie termostabilnym (96°C przez 30 min). W jej składzie stwierdzono 11,1% glicyny oraz 13,4% alaniny. Od tego czasu scharakteryzowano wiele termostabilnych bakteriocyn *Lactobacillus*. Laktocyna 27 (*Lactobacillus helveticus*), podobnie jak bakteriocyna *Lactobacillus fermenti* została wyizolowana jako białkowo-lipopolisacharydowy kompleks o ciężarze molekularnym ok. 200 kDa. Metabolit ten jest wrażliwy na trypsynę i pronazę, ale nie na ficynę. Charakteryzuje się niezwykle wysoką koncentracją glicyny (15,1%) i alaniny (18,1%) oraz jest bardziej termostabilny (100°C, 60 min). Ma działanie bakteriostatyczne w stosunku do *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus helveticus* (tab. 2).

*Lactobacillus acidophilus* N2 i 11088 syntetyzują odpowiednio laktocynę B i F. Są one termostabilne (121°C przez 15 min) i posiadają podobne masy cząsteczkowe — 6,3 kDa. Różnią się one zakresem działania, a mechanizmu ich działania jeszcze dokładnie nie poznano (tab. 2). Inny szczep *Lactobacillus acidophilus* JCM1132 wytwarza termostabilną, dwuskładnikową bakteriocynę zwaną acidocyną J1132, o wąskim spektrum działania. Maksimum jej produkcji na podłożu MRS przypada w pH 5. Odkryto, że aktywność tego metabolitu powiązana jest z dwoma peptydami, wchodzącymi w jej skład, określonymi jako A i B. Działa bakteriobójczo na organizmy wrażliwe poprzez zahamowanie transportu aminokwasów i powoduje wypływ niezbędnych składników przez błonę cytoplazmatyczną na zewnątrz komórki. Bakteriocyna ta nie zawiera lantioniny i zaliczana jest do klasy II (7).

Inną, scharakteryzowaną bakteriocyną jest laktocyna S wytwarzana przez *Lactobacillus sake* L45. Jest ona małym, termostabilnym peptydem (100°C, 30 min), należącym do klasy I. Bakteriocyna ta wykazuje zarówno bakteriostatyczny, jak i powolny bakteriobójczy wpływ na organizmy wrażliwe, np. na *Pediococcus acidilactici* Pacl,0. Mortvedt-Abildgaard w uzyskanych przez siebie wynikach badań wskazują na to, że zarówno synteza, jak i aktywność laktocyny S zależą od czynników środowiskowych: pH, składu podłoża, obecności tlenu (67).

*Lactobacillus gasseri* LA 39 produkuje gasserycynę A. Należy ona do klasy II. Charakteryzuje się wysoką termostabilnością (121°C, 20 min) i szerokim spektrum działania. Działa bakteriobójczo na komórki *Listeria monocytogenes*, nie powodując ich lizy. Jest to peptyd o masie cząsteczkowej 3,8 kDa, o właściwościach hydrofobowych (19).

Do tej samej klasy, co gasserycyna A należy brevicyna 286, produkowana przez szczep *Lactobacillus brevis* VB 286. W przeciwieństwie do brevicyny 37 (37), brevicyna 286 wykazuje aktywność przeciwko ograniczonej liczbie gramodatnich bakterii: *Listeria* sp., *Enterococcus* sp., *Lactococcus curvatus* i kilka szczepów (od 3 do 4) *Streptococcus thermophilus* (4).

*Lactobacillus plantarum* KKY12 produkuje plantarynę N-bakteriocynę o małej masie cząsteczkowej. Jest ona termostabilna i charakteryzuje się wąskim spektrum działania (29). *Lactobacillus plantarum* LPCO10 jest w stanie syntetyzować dwie bakteriocyny: plantarynę S i T (51). Inne szczepy *Lactobacillus plantarum* wytwarzają plantarynę A o szerokim spektrum działania (6,8), plantarynę B (47) i plantarynę C19 (48,49). Szczep 75 *Lactobacillus plantarum* produkuje bakteriocynę aktywną wobec mikroorganizmów patogennych, jak *Clostridium botulinum* i *Staphylococcus aureus* (tab. 2).

Analizując spektrum działania bakteriocyn należy uwzględnić to, że wrażliwość bakterii na poszczególne bakteriocyny jest cechą szczepową, a nie gatunkową. Ponadto ta sama bakteriocyna może odmiennie działać na dwa różne szczepy wrażliwe, np. gasserycyna A działa bakteriobójczo na komórki *Listeria monocytogenes*, a bakteriostatycznie wobec *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* JCM1002 (19). Wrażliwość szczepu podatnego na bakteriocynę zależy od jego wieku.

Znane są bakteriocyny bakterii fermentacji mlekowej, które hamują wzrost bakterii gramujemnych, np. pediocyna A działa antybakteryjnie na komórki *Yersinia enterocolitica* (1,72).

Uwarunkowania genetyczne produkcji bakteriocyn obejmują m.in. takie zagadnienia jak:

- lokalizację genu lub genów kierującego syntezą bakteriocyny i jego stabilności,
- regulację syntezy bakteriocyn, zmienności, segregacji,
- międzykomórkowe przekazywanie tego rodzaju genów odporności, oporność na bakteriocyny.

Komórki syntetyzujące bakteriocyny zwykle charakteryzują się odpornością na własną bakteriocynę. Często wraz z utratą plazmidu zawierającego gen bakteriocyny i geny kodujące białko ochronne, komórka traci też odporność. „Odporność”, której mechanizmy w omawianym zakresie nie są właściwie poznane, jest różna od „oporności” komórek na bakteriocyny. Ta druga bywa związana z utratą bądź modyfikacją receptorów bakteriocyn. Ważne jest kontrolowanie przez długi okres, czy komórki badanego szczepu faktycznie utraciły zdolność produkcji bakteriocyny (68).

W badaniach nad *Lactobacillus sake* 45 obserwowano, że zdolność do produkcji aktywnej laktocyny S była często tracona jako rezultat niestalości plazmidu (29).

Analizując mechanizm działania bakteriocyn należy mieć na uwadze, że większość z nich zalicza się do silnie i szybko działających *in vitro* substancji przeciwbakteryjnych (9,20). Substancje te, jak wykazano w badaniach *in vitro*, mają działanie antagonistyczne w stosunku do patogennych szczepów: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Listeria*, *Yersinia* (1,25,72,73).

Według Bruno i Montville (25), bakteriocyny inaktywując komórkę wrażliwą wiążą się z receptorami membrany przez łączenie się z fosfolipidami lub z glikoproteinami. Wiązania te powodują zmiany w przepuszczalności plazmalemy, czego efektem są:



- utrata elektrolitu,
- utrata jonów K<sup>+</sup>,
- obniżenie zawartości ATP w komórkach.

Zahamowane zostają również procesy energetyczne zachodzące w strefie błony cytoplazmatycznej komórki, co prowadzi do inaktywacji komórek.

Zasadniczy wpływ na jakość i ilość syntetyzowanych bakteriocyn ma skład podłoża, warunki hodowli: temperatura, pH, napowietrzanie oraz wiek hodowli. Synteza niektórych bakteriocyn jest intensywniejsza na podłożach stałych, innych na podłożach płynnych lub o zwiększonej lepkości, np. plantacyna B syntetyzowana przez *Lactobacillus plantarum* jest wykrywalna na podłożu agarowym, natomiast nie jest wykrywalna w hodowlach na podłożach płynnych (20,26). Również dobór składu pożywek i ich pH często decyduje o produkcji bakteriocyny, np. brevicyna (*Lactobacillus brevis*) wykazuje największą aktywność w pH 5,2 i przy okresowej neutralizacji hodowli bakteriocyna ta traci aktywność (9), laktocyna B (*Lactobacillus acidophilus*) jest produkowana w pH 6,0, ale w pH 6,6 nie wykazuje aktywności (32). Największa aktywność helwetycyny J (*Lactobacillus helveticus* 481) przypada na pH 5,0 (50,67).

Aktywność bakteriocyn można oznaczyć jakościowo lub ilościowo. W tym celu wyróżnia się dwie podstawowe grupy stosowanych metod. W pierwszej, bezpośrednio wykrywa się antagonizm międzyszczepowy. Badany szczep hoduje się w podłożu stałym równocześnie ze szczepem wskaźnikowym. Syntetyzowana przez producenta bakteriocyna dyfunduje do podłoża, co objawia się strefą zahamowania wzrostu mikroorganizmu wskaźnikowego (7,29,64,74). W drugiej, określa się bezpośrednio aktywność antybakteryjną bakteriocyn wydzielonych do podłoża hodowlanego. Szczep producenta inkubowany jest przez różne okresy w podłożu stałym lub płynnym. Następnie, komórki producenta są zabijane (np. chloroformem lub promieniami UV) lub eliminowane (np. przez wirowanie hodowli płynnej). Do oznaczenia pobiera się bądź wycinek podłoża agarowego zawierającego bakteriocynę, bądź płyn pochodzący. W tym celu stosuje się następujące procedury:

— w warstwie pożywki agarowej, zaszczipionej mikroorganizmem wskaźnikowym, wycina się studzienki i wypełnia je supernatantem hodowli producenta. Na to nakłada się drugą warstwę podłoża agarowego, po czym całość się inkubuje i obserwuje strefy zahamowania wzrostu wokół studzienek. Aktywność bakteriocyny znajduje wyraz w różnicach w średnicy stref inhibicji kultury wskaźnikowej. (Metoda dyfuzji studzienkowej jest także powszechnie stosowana do badania oddziaływania antybakteryjnego) (4,18,19);

— w przypadku stosowania podłoża płynnego, do hodowli szczepu wrażliwego dodaje się próbkę supernatantu hodowli producenta i mierzy liczebność żywych komórek organizmu wskaźnikowego (20);

— na podłożu zestalonym agarowym, z wsianym szczepem wskaźnikowym, nakrapla się niewielką ilość wyciągu zawierającego bakteriocynę i określa sferę rozjaśnienia (36). Aktywność bakteriocyny określa się często w formie miana związanego z krotnością rozcieńczenia roztworu bakteriocyny działającego hamująco na wzrost szczepu wskaźnikowego.

Fakt wykształcenia i zachowania u wielu szczepów bakteryjnych zdolności do syntezy bakteriocyn uważany jest za argument świadczący o ich istotnej roli regulującej liczebność określonych populacji mikroorganizmów w przyrodzie.

## Literatura

1. Arihara K., Ogihara S., Mukai T., Hoh M., Kondo Y., (1996), *Lett. Appl. Microbiol.*, 22, 420-424.
2. Axelsson L., Holck A., (1995), *J. Bacteriol.*, 177 (8), 2125-2137.
3. Balasubramanyam B. V., Varadaraj M. C., (1995), *Cultured Dairy Products Journal*, 22-27.
4. Coventry M. J., Wan J., Gordon J. B., Mawson R. F., Hickey M. W., (1996), *Appl. Bacteriol.*, 80, 91-98.
5. de Vuyst L., Callewaert R., Crabbé K., (1996), *Microbiology*, 142, 817-827.
6. Diep D. B., Haverstein L. S., Nissen-Meyer J., Nes I. F., (1994), *Appl. Environ Microbiol.*, 60(1), 160-166.
7. Tahara T., Oshinura M., Umezawa Ch., Kanatani K., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(3), 892-897.
8. Daeschel M. A., McKenney M. C., McDonald L. C., (1990), *Food Microbiol.*, 7, 91-98.
9. Daeschel M. A., (1993), in: *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Eds. D. G. Hoover, L. K. Steenson, Academia Press Inc., New York, 63-91.
10. de Vuyst L., Callewaert R., Pot B., (1996), *System. Appl. Microbiol.*, 19, 9-20.
11. Klaenhammer T. R., (1995), *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 39-86.
12. Plockova M., Chumchalova J., Pluhařova B., (1996), *Potrav. Vedy*, 1 4(3), 165-174.
13. Schillinger U., Lucke F. K., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1901-1906.
14. Tagg J. R., Dajani A. S., Wannamaker L. W., (1976), *Bacteriol. Rev.*, 40, 722-756.
15. Vingolo G. M., Fadda S., de Ruiz Kairuz M. N., Oliverg G., (1996), *Internat. J. Food Microbiol.*, 29, 397-402.
16. Zajdel J., Dobrzański W. T., (1990), *Food Microbiol.*, 7, 91-98.
17. Czajkowska D., (1994), *Przem. Ferm. Owoc.-Warzy.*, 12, 11-13.
18. Daba H., Pandian S., Gosselin J. F., Simard R. E., Huang J., Lacroix C., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (2), 3450-3455.
19. Itoh T., Fujimoto Y., Kawai Y., Toba T., Saito T., (1995), *Lett. Appl. Microbiol.*, 21, 137-141.
20. Kone K., Fung D. Y. C., (1992), *Dairy, Food and Environ. Sanit.*, 12(5), 282-285.
21. ten Brink B., Minekus M., van der Vossen J. M. B. M., Leer R. J., Huis in't Veld J. H. J., (1994), *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 140-148.
22. Yusof R. M., Baker T. A., Morgan J. B., Adams M. R., (1995), *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 654-657.
23. Barefoot S. F., Klaenhammer T. R., (1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1808-1815.
24. Bednarski W., (1991), *Przem. Spoż.*, 7, 177-178.
25. Bruno M. E. C., Montville T. J., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (9), 3003-3010.
26. Klaenhammer T. R., (1985), *Biochimie*, 70, 337-349.
27. Marugg J. D., (1991), *Food Biotechnol.*, 5(3), 305-312.
28. Olasupo N. A., Olukoya D. K., Odunfa S. A., (1994), *Folia Microbiol.*, 39(3), 181-186.
29. Olasupo N. A., Olukoya D. K., Odunfa S. A., (1995), *Basic Microbiol.*, 35, 319-324.
30. Muriana P. M., Klaenhammer T. R., (1987), *Environ. Microbiol.*, 53, 553-560.
31. Muriana P. M., Klaenhammer T. R., (1991), *Environ. Microbiol.*, 57, 114-121.
32. Barefoot S. F., Klaenhammer T. R., (1984), *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 26, 328-334.
33. Toba T., Yoshioka E., Itoh T., (1991c), *Lett. Appl. Microbiol.*, 12, 106-108.
34. Larsen A. G., Vogensen F. K., Josephsen J., (1993), *J. Appl. Bacteriol.*, 75(2), 113-122.
35. Lewus C. B., Montville T. J., (1992), *Food Biotechnol.*, 6(2), 153-174.

36. Lewus C. B., Montville T. J., (1991), *J. Microbiol. Meth.*, 13, 145-150.
37. Benoit V., Mathis R., Lefebure G., (1994), *Curr. Microbiol.*, 28, 53-61.
38. Vingolo G. M., Suriani F., Pesca de Ruiz Holgado A. A. P., Oliverg G., (1993), *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 344-349.
39. Rammelsberg M., Muller E., Radler F., (1990), *Arch. Microbiol.*, 154, 249-252.
40. Vogel R. F., Pohle B. S., Tichaczek P. S., Hammes W. P., (1993), *System. Appl. Microbiol.*, 16, 457-462.
41. Toba T., Yoshioka E., Itoh T., (1991b), *Lett. Appl. Microbiol.*, 12, 43-45.
42. de Klerk H. C., Smit J. A., (1967), *J. Gen. Microbiol.*, 48, 309-316.
43. Kawai Y., Saito T., Toba T., Samant Sh.K., Itoh T., (1994), *Biosci. Biotech Biochem.*, 58(7), 1218-1221.
44. Toba T., Yoshioka E., Itoh T., (1991d), *Lett. Appl. Microbiol.*, 12, 228-231.
45. Joerger M. C., Klaenhammer T. R., (1986), *J. Bacteriol.*, 167, 439-446.
46. Upreti G. C., Hinsdill R. D., (1973), *Antimicrob. Agents Chemother*, 4, 487-494.
47. West C. A., Warner P. J., (1988), *FEMS Microbiol. Lett.*, 49, 163-165.
48. Atrih A., Rekhif N., Millierre J. B., Lefebure G., (1993), *Can. J. Microbiol.*, 39, 1173-1179.
49. Rekhif N., Atrih A., Lefebure G., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16(8), 771-776.
50. Jimenez-Diaz R., Rios-Sancher R. M., Desmazeaud M., Ruiz-Barba J. L., Piard J.C., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1416-1424.
51. Jimenez-Diaz R., Ruiz-Barba J. L., Cathcart D. P., Holo H., Nes I. F., Sletten K. H., Warner P.J., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(12), 4459-4463.
52. Toba T., Samant S. K., Yoshioka E., Itoh T., (1991a), *Lett. Appl. Microbiol.*, 13, 281-286.
53. Mortvedt C. I., Nissen-Meyer J., Sletten K., Nes I., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1829-1834.
54. McCormick E. L., Savage D. C., (1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1103-1112.
55. Samelis J., Roller S., Metaxopoulos J., (1994), *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 475-486.
56. Sobrino O. J., Rodriguez J. M., Moreira W. L., Fernandez M. F., Sanz B., Hernandez P. E., (1991), *Int. J. Food Microbiol.*, 13, 1-10.
57. Cradndall A. D., Montville T. J., (1993), *J. Food Protection*, 56 (6), 485-488.
58. Garriga M., Hugas M., Aymerich T., Monfort J. M., (1993), *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 142-148.
59. Farias M. E., de Ruiz Holgado A. A. P., Sesma F., (1994), *J. Food Protection*, 57(11), 1013-1015.
60. Kalchayanand N., Hanlin M. B., Ray B., (1992), *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 239-243.
61. Kanatani K., Oshimura M., (1994), *Biosci. Botech. Biochem.*, 58(11), 2084-2086.
62. Kanatani K., Tahara T., Oshimura M., Sano K., Umezawa C., (1995), *Lett Appl. Microbiol.*, 21, 384-386.
63. Kim W. K., (1993), *Food Review. International*, 9(2), 299-313.
64. Lewus C. B., Kaiser A., Montville T. J., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(6), 1683-1688.
65. Rammelsberg M., Radler F., (1990), *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 177-184.
66. Remiger A., Ehrmann M. S., Vogel R. F., (1996), *System. Appl. Microbiol.*, 19, 28-34.
67. Mortvedt-Abildgaard Ch.I., Nissen-Meyer R. J., Jelle B., Grenov B., Skaugen M., Nes I. F., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(1), 175-179.
68. Zajdel J., Dobrzański W. T., (1983), *Post. Mikrobiol.*, 22(3/4), 223-256.
69. Dodd H. M., Gasson M. J., (1994), in: *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*, Eds. M. J. Gasson, W. M. de Vos, Blackie Academic & Professional, Glasgow, 210-251.
70. Klaenhammer T. R., Sankozky R. B., (1985), *J. Gen. Microbiol.*, 131(6), 1531-1541.
71. Libudzisz Z., (1992), *Biotechnologia*, 2(17), 66-78.
72. Rodriguez J., Sobrino O. J., Moreira W. L., Cinas L. M., Casaus P., Fernandez M. F., Sanz B., Hernandez P. E., (1994), *Meat Science*, 37, 305-314.
73. Stiles M., Hastings J. W., (1991), *TRENDS in Food Sci. and Technol.*, 247-251.
74. Nunez M., Tomillo J., Gaya P., Medina M., (1996), *Milchwissenschaft*, 51(1), 7-10.

**Bacteriocins synthesized by *Lactobacillus***

## Summary

This paper presents results of research concerning conditions of bacteriocin production by *Lactobacillus* strains. Characteristics and methods of bacteriocin purification are discussed. Particularly, an influence of physico-chemical conditions on bacteriocins stability and an effect of bacteriocins on tested pathogenic strains are presented.

**Key words:**

bacteriocin, *Lactobacillus*, culture condition, medium, purification, bacteriocin assay.

*Adres do korespondencji:*

Lucja Łaniewska-Moroz, Zakład Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Akademia Rolniczo-Techniczna, ul. Plac Cieszyński 1, 10-957 Olsztyn-Kortowo bl. 43.