Odpowiedź komórkowa bakterii kwasu mlekowego na stresy środowiskowe

Justyna Sadowska, Włodzimierz Grajek

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Lactic acid bacteria cellular responses for enviromental stress

Summary

Lactic acid bacteria (LAB) constitute a heterogeneous group of bacteria that are traditionally used to produce fermented foods. The industrialization of food biotransformations increased the economical importance of LAB. The development of new applications such probiotic foods reinforces the need for robust LAB. They have to survive in the digestive tract, and express specific functions under conditions that are unfavorable to growth. A better understanding of the mechanisms of stress resistance and LAB cellular responses should allow to prepared these bacteria for industrial processes. Range of examples of diferent enviromental stress, related genes and molecular mechanisms of the stress responses are presented.

Key words:
lactic acid bacterium, stress response, oxidative stress, heat shock, osmotic stress.

Adres do korespondencji

Justyna Sadowska,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy,
ul. Wojska Polskiego 48,
60-627 Poznań;
e-mail:
justynasad@gazeta.pl

biotechnologia
4 (87) 115–132 2009

1. Wstęp

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) stanowią złożoną grupę mikroorganizmów, których wspólną cechą jest zdolność do beztlenowej fermentacji mlekowej. Do tej grupy bakterii zaliczamy gramdodatnie ziarniaki z najczęściej wykorzystywanych przemysłowo rodzajów: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Oenococcus* i *Pediococcus* oraz gramdodatnie, nieprzetrwalnikujące pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* i *Carnobacterium*, a także zaliczane do tej grupy, z uwagi na typ metabolizmu, bakterie z rodzaju

Bifidobacterium (1). Aktualnie trwają intensywne prace nad przygotowaniem nowej klasyfikacji opartej na analizie genetycznej. Mikroorganizmy te różnią się wymaganiami odżywczymi, rodzajem produkowanych metabolitów, tolerancją na kwas mlekowy i temperaturę hodowli. Wśród nich występują gatunki termofilne i mezofilne. Większość z nich należy do względnych beztlenowców, choć można spotkać także gatunki bezwzględnie beztlenowe. Ich naturalnym środowiskiem występowania jest biomasa roślinna, mleko ssaków oraz przewód pokarmowy człowieka i zwierząt.

Bakterie kwasu mlekowego są wykorzystywane nie tylko do produkcji kwasu mlekowego, polimerów wytwarzanych na bazie polilaktydu, rozpuszczalników farb, np. mleczany etylu, żywności fermentowanej, ale coraz częściej do produkcji heterologicznych białek i leków.

Prowadzenie intensywnych procesów fermentacyjnych w skali wielkoprzemysłowej generuje stresy środowiskowe wynikające ze stosowania stężonych brzeczek fermentacyjnych (stres osmotyczny), dużego stężenia końcowych metabolitów (stres kwasowy), zmian temperatury w trakcie hodowli (stres termiczny), wprowadzania nowych rodzajów pożywek, np. hydrolizatów ligninocelulozowych (stres toksyczny), powstawania reaktywnych form tlenu w obecności jonów metali (stres oksydacyjny), deficytu niektórych składników pożywek (stres głodowy) i z powodu występowania innych niekorzystnych czynników środowiskowych. Oprócz wymienionych stresów należy zwrócić także uwagę na stres mechaniczny wynikający z kontaktu komórek z ruchomymi elementami urządzeń. Wymienione czynniki stresotwórcze mogą występować samodzielnie, jednak w większości przypadków występują jako stres wieloczynnikowy.

Uzyskanie odpowiednio wysokiej przeżywalności komórek w warunkach stresowych wymaga stosowania wyselekcjonowanych i odpornych na stresy szczepów przemysłowych. Pozyskanie takich szczepów wymaga zastosowania długotrwałej i złożonej procedury skriningowej. Wielką pomocą w tym postępowaniu jest dobra znajomość mechanizmów adaptacji drobnoustrojów do stresów środowiskowych i umiejętne ich wykorzystanie w procedurze selekcyjnej. Znajomość odpowiedzi komórkowej na czynniki zewnętrzne ułatwia wybór właściwych szczepów dla określonych procesów biotechnologicznych i odpowiadających im specyficznych warunków hodowli.

Reakcjom mikroorganizmów na negatywne oddziaływania środowiska poświęcona jest bogata literatura naukowa. Dzięki rozległym badaniom poznawczym niektóre z tych mechanizmów całkowicie wyjaśniono, jednak wiele z nich wciąż wymaga głębszej analizy.

Celem tej pracy jest przedstawienie stanu wiedzy na temat mechanizmów odpowiedzi komórek bakterii mlekowych na główne czynniki stresowe występujące w przemysłowych procesach produkcyjnych i wskazanie możliwości wykorzystania tej wiedzy w procedurach skriningowych.

2. Odpowiedź na stres kwasowy

Bakterie kwasu mlekowego metabolizują sacharydy na drodze cyklu Embdena-Mayerhofa (homofermentacja) lub szlaku fosfoketolazy pentozowej z cyklu heksozomonofosforanowego (heterofermentacja), których końcowym produktem jest kwas mlekowy. Wydzielanie tego metabolitu do pożywki zwiększa szybko kwasowość środowiska hodowlanego i tym samym pogarsza warunki funkcjonowania komórek. W zależności od gatunku bakterie te produkują od 0,6 do 3% kwasu mlekowego.

Większość bakterii mlekowych, z wyjątkiem bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *Leuconostoc* oraz *Oenococcus*, należy do organizmów obojętnolubnych. Optymalny zakres pH dla ich wzrostu waha się w zależności od gatunku od 5 do 9 (2). Wartości tolerancji na wysokie stężenie jonów wodorowych są niższe o 3-4 jednostki w porównaniu do wartości pH mierzonych w warunkach optymalnych (1).

Wpływ środowiska kwasowego na fizjologię bakterii mlekowych nie jest jeszcze szczegółowo wyjaśniony. Wiadomo jednak, że niektóre kwasy organiczne, do których należy kwas mlekowy, mogą biernie przeniknąć przez błonę komórkową do wnętrza mikroorganizmu. W cytoplazmie zostają zdysocjowane na protony i pochodne głównego związku, dla których błona komórkowa jest nieprzepuszczalna. Akumulacja protonów w cytoplazmie może obniżyć pH wewnątrzkomórkowe i dzięki temu bezpośrednio wpływać na potencjał transmembranowy (ApH) biorący udział w procesach transportu. Zakwaszenie środowiska wewnątrzkomórkowego może doprowadzić do upośledzenia mechanizmów enzymatycznych, uszkodzeń wewnątrz łańcuchów DNA jak i spowodować denaturacje białek (3), stąd komórka stara się wydalać protony do pożywki.

Na wzrost kwasowości środowiska bakterie mlekowe reagują w dwojaki sposób, uzależniony od aktualnej fazy wzrostu drobnoustrojów. Podczas logarytmicznej fazy wzrostu bakterie uruchamiają odpowiedź komórkową zwaną ATR (ang. *Acid-Tolerance Response*), związaną z syntezą tzw. białek szoku kwasowego (ASPs, ang. *Acid-Shock Proteins*), zaś po wejściu w stacjonarną fazę wzrostu mikroorganizmy odpowiadają „ogólną odpowiedzią na stres" (GSR, ang. *General Stress Response*), występującą także podczas działania innych czynników stresowych, np. podczas niedoboru składników pokarmowych. Wciąż nie wiadomo, czy odpowiedzi te działają niezależnie, czy też częściowo się pokrywają (4).

Większość szczepów LAB uruchamia system odpowiedzi ATR pozwalający im przetrwać nie tylko w subletalnym środowisku kwasowym, lecz również podczas działania stresu oksydacyjnego, szoku związanego z wysoką temperaturą lub stresu osmotycznego (5).

Efekt działania ATR jest różny w obrębie gatunków i szczepów, nie chroniąc tym samym mikroorganizmów przed stresem w identyczny sposób (6).

W celu wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzi ATR prowadzono badania nad mutantami genetycznymi komórek *Lactobacills sanfranciscensis* CB1, charakteryzu-

jącymi się kwasoodpornością. Podczas procedur analitycznych, głównie elektroforezy dwukierunkowej, wykazano pojawienie się 15 nowych białek szoku kwasowego. Pomimo szczegółowych badań udało się scharakteryzować zaledwie kilka z nich (7). Dopiero w badaniach prowadzonych nad komórkami *Lactococcus lactis*, poddawanych działaniu pH o wartościach 5,5 oraz 4,5, wykryto syntezę 33 białek, pośród których znajdowały się białka dysmutazy ponadtlenkowej czy LuxS, indukowane podczas stresu oksydacyjnego, białka szoku cieplnego należące do regulonów CtsR, ClpP, ClpE, HrcA oraz DnaK, GroEL, GroES, GrpE (4,8).

Stres kwasowy powoduje akumulację protonów w cytoplazmie komórki bakteryjnej, obniżając pH wewnątrzkomórkowe oraz bezpośrednio wpływa na potencjał transmembranowy biorący udział w procesach transportu. Bakterie kwasu mlekowego potrafią utrzymać gradient potencjału błonowego pomimo niskich wartości pH środowiska. Niektóre bakterie utrzymują pH wewnątrzkomórkowe (pHi) w granicach wartości obojętnych, aż do przekroczenia przez środowisko hodowlane krytycznej wartości pH, po której wartość pHi zaczyna gwałtownie maleć (9), lub zachowują stałą wartość różnicy pH wewnątrzkomórkowego i środowiska hodowlanego na poziomie 0,7 jednostki (10). Na wartość pHi wpływa ponadto rodzaj związku chemicznego obniżającego pH środowiska. Potwierdzają to badania nad komórkami *Lactococcus lactis*, które poddane działaniu HCl (z pH 6,75 do 5,0) łagodnie redukowały wartość pHi z 7,0 do 6,0, zaś wystawione na działanie kwasu mlekowego zmniejszały wartości pHi liniowo z 7,0 do 5,25 (10,11).

W badaniach przeprowadzonych nad stresem kwasowym udowodniono istnienie kilku mechanizmów odpowiadających za utrzymanie transbłonowego gradientu pH i potencjału transbłonowego.

Pierwszą powierzchnią kontaktu komórki ze środowiskiem zewnętrznym i występującym w nim czynnikiem stresowym jest błona komórkowa. W przypadku komórek bakterii mlekowych poddawanych działaniu stresu pH, bardzo istotny jest skład chemiczny ścian komórkowych. Potwierdziono to w badaniach prowadzonych przez Raull i in. (12) nad komórkami *L. lactis*, w których zmiany w syntezie peptydoglikanu powodowały wzrost wrażliwości na zakwaszenie środowiska.

Jednym z głównych mechanizmów umożliwiajacym przetrwanie mikroorganizmom mlekowym w kwaśnym środowisku jest działalność F0F1-ATPazy, enzymu odpowiedzialnego za utrzymanie prawidłowego potencjału błonowego. Jego aktywność znacznie wzrasta w środowisku o niskiej wartości pH. Dzięki energii pochodzącej z hydrolizy ATP enzym ten bierze udział w czynnym wyrzucaniu protonów z komórki (13). ATPaza zbudowana jest z domeny F0 oraz z domeny F1. Domena F0 jest kanałem protonowym przechodzącym przez całą szerokość błony, zaś domena F1 odziałuje z cytoplazmatyczną stroną F0, jak również zawiera miejsca katalitycze, w których syntetyzowany jest ATP. Domena F0 obraca się względem domeny F1 w czasie translokacji protonów.

W prowadzonych doświadczeniach nad bakteriami mlekowymi posiadającymi mutację w obrębie genu odpowiedzialnego za F0F1-ATPazę, wystawionymi na dzia-

łanie kwaśnego środowiska, wykazano zmniejszenie szybkości wzrostu badanych organizmów (14). Ponadto udowodniono, że enzym ten pełni zasadniczą rolę dla wzrostu komórek *L. lactis* (14).

Dotychczas opisano kilka operonów kodujących F0F1-ATPazę (ATP-operon) oraz sekwencji ATP (14,15). Geny odpowiedzialne za działanie enzymu utrzymującego prawidłowy potencjał błonowy kodują pięć podjednostek cytoplazmatycznego kompleksu F1 *(a, fi,* 5, *y,* e) oraz trzy jednostki (a, b, c) tworzące kanał przepływu protonów F0. W różnorakich doświadczeniach prowadzonych nad odpowiedzią komórkową na stres wywołany zakwaszeniem środowiska bardzo często wykazywano powiązanie ze wszystkimi, bądź niektórymi podjednostkami kompleksu F1 (16). Quivey i in. (17) oraz Martin-Galiano i in. (18) donoszą, że w porównaniu z innymi bakteriami, genetyczna organizacja operonów ATP bakterii mlekowych różni się między sobą, jednak wciąż nie wiadomo, z czego ta różnica wynika. Koebman (14) wykazał, że bakterie *L. lactis* z nieefektywnie działającym systemem F0F1-ATPazy nie były zdolne do formowania koloni przy pH 7,0. Na podstawie tej obserwacji sugeruje się, że wydalanie kwasu mlekowego z komórki przy naturalnym pH nie dostarcza wystarczającej ilości energii potrzebnej do wzrostu komórkowego. Innym enzymem odpowiedzialnym za transport kationów oraz wymianę jonów K^+ na H^+ podczas działania stresu kwasowego jest K^+ -ATPaza. Jonowymienność zamienia potencjał transmembranowy tworzony przez K^+-ATPazę na ApH, co pozwala komórce utrzymać stan homeostazy (18).

Kolejnym mechanizmem pozwalającym utrzymać wewnątrzkomórkową równowagę pH jest deaminacja argininy do ornityny, amoniaku, karbamoilofosforanu oraz ditlenku węgla. Pozwala to na uzyskanie 1 mola ATP przypadającego na 1 mol przekształconej argininy. Reakcja grupy amonowej (NH_4^+) z jonami wodoru pomaga zalkalizować środowisko hodowlane, zaś wytworzenie ATP umożliwia wydalanie protonów z komórki przez F0F1-ATPazę (19). W doświadczeniach prowadzonych przez Arena i in. (20) na komórkach *Lactobacillus hilgaedii* X_1B wykazano, że za przekształcenia argininy odpowiedzialne są 3 enzymy (deiminaza argniny, karbamoilotransferaza ornitynowa oraz kinaza karbinianowa) kodowane przez geny *arcABC.*

Ważnym elementem systemu pozwalającego utrzymać integralność błon komórkowych podczas działania stresu kwasowego jest małe białko szoku cieplnego (smHSP, ang. *Small Heat-Shock Protein*), Lo 18, biorące udział w stabilizacji błon podczas działania czynników stresowych. Białko to ulega pobudzeniu podczas działania stresów zarówno temperaturowych, etanolowych, jak i podczas stresu pH, zaś jego ekspresja jest wywołana poprzez zmiany w płynności membran (21). Innym białkiem biorącym udział w ochronie komórek bakterii mlekowych przed kwaśnym środowiskiem jest białko Ffh, które uczestniczy w transporcie komórkowym (22). Dodatkowo oba białka funkcjonują w komórkach bakterii mlekowych jako białka opiekuńcze, ułatwiające właściwe fałdowanie i ponowne zwinięcie białek zdenaturowanych warunkami stresowymi. W badaniach nad ATR oraz szokiem cieplnym wykazano, że chaperony szoku cieplnego są zawsze uruchamiane podczas stresu pH (16).

Wzrost kwasowości środowiska wewnątrzkomórkowego powoduje uszkodzenia w łańcuchu DNA, szczególnie w purynach i pirymidynach. Komórki *L. lactis* naświetlane promieniowaniem UV zwiększały swoją odporność jednocześnie na kilka stresów, w tym na stres spowodowany zmianami stężenia jonów wodorowych (23). Promieniowanie UV uruchomiło również cztery białka, które odpowiadają za adaptację do środowiska kwasowego. Może to sugerować, że ATR bierze udział w naprawie uszkodzeń w łańcuchach DNA spowodowanych promieniowaniem ultrafioletowym (24).

Niektóre mechanizmy wewnątrzkomórkowe mogą również odgrywać ważną rolę w tolerancji na stres kwasowy, a przypuszczalnie również na inne stresy. Poolman i in. udowodnili, że niskie pH zmniejsza aktywność transporterów fosforu (25). Potwierdzili to Raull i in. (26), którzy wykazali, że komórki *L. lactis* z uszkodzonym transporterem o wysokim powinowactwie do fosforu (*pst* operon) charakteryzują się tolerancją na nadtlenek wodoru oraz odpornością na kwaśne środowisko. Na podstawie wykonanych doświadczeń sugeruje się, że regulacja genów transportu fosforu może odgrywać ważną rolę w ATR. W komórkach *L. lactis* inaktywacja genów *guaA*, syntetazy GMP i (p)ppGpp oraz *relA* zwiększa tolerancję na zakwaszenie środowiska, szok cieplny oraz na warunki niedoboru składników pokarmowych, w szczególności glukozy (26).

Dzięki analizom biochemicznym, proteomicznym lub genetycznym wykazano, że odpowiedź komórkowa na stres kwasowy jest złożonym procesem opierającym się na kilku mechanizmach i syntezie różnorodnych białek.

3. Odporność na stres osmotyczny

Jednym z wyznaczników, a zarazem warunków determinujących prawidłowe działanie komórki, jest ciśnienie wewnątrzkomórkowe (tzw. turgor). Jest to aktualne ciśnienie wywierane na warstwę peptydoglikanową, spowodowane różnicą potencjału chemicznego pomiędzy cytoplazmą a otoczeniem. Jest ono regulowane przez kontrolę ilości zawartych w cytoplazmie specyficznych substancji osmoaktywnych. Ciśnienie to ma wartość dodatnią, zatem dla jej utrzymania komórka musi utrzymywać pewną nadwyżkę potencjału osmotycznego. Oznacza to, że stężenie substancji osmotycznie aktywnych we wnętrzu komórki musi być nieco wyższe niż w otaczającym ją środowisku. Dzięki temu błona cytoplazmatyczna ściśle przylega do ściany komórkowej, podtrzymując jednocześnie sztywność komórki. Wynika z tego, że dla utrzymania turgoru komórka musi regulować ciśnienie w swym wnętrzu tak, aby było ono nieco wyższe od ciśnienia osmotycznego w otoczeniu. Zadanie to jest tym trudniejsze, że warunki środowiskowe mogą podlegać ciągłym zmianom (27).

Bakterie aktywnie reagują na zmiany zachodzące w ich otoczeniu, w tym na stres osmotyczny. Reakcja ta jest zwykle nazywana osmoregulacją lub osmoadaptacją. Ma

ona na celu utrzymanie turgoru i objętości komórki w normalnych, fizjologicznie określonych granicach.

Z utrzymaniem turgoru wiąże się również pojęcie wrażliwości osmotycznej, rozumianej jako mechanizm odbierania, rejestracji i przetwarzania sygnałów powodowanych zmianami ciśnienia osmotycznego środowiska. Polega ona na wykrywaniu zmian naprężenia lub rozciągnięcia błony cytoplazmatycznej i przetwarzaniu ich dalej na sygnał uruchamiający odpowiednie procesy biochemiczne, na przykład prowadzące do autofosforylacji odpowiedniego czynnika transkrypcyjnego. Receptory komórkowe mogą rejestrować wiele sygnałów związanych z takimi parametrami, jak: ciśnienie hydrostatyczne, osmolalność, potencjał jonowy czy koncentracja poszczególnych molekuł sygnałowych (27). Należy jednak zaznaczyć, że mechanizmy te wciąż jeszcze należą do słabo poznanych.

Stres osmotyczy wywiera na komórki mikroorganizmów bardzo niekorzystny wpływ. Aby utrzymać aktywność biologiczną bakterie wytworzyły odpowiednie mechanizmy regulacji. Jedną z pierwszych odpowiedzi na szok osmotyczny jest pobieranie ze środowiska i akumulacja w komórce jonów potasu, co pozwala na odbudowanie i utrzymanie odpowiedniego turgoru. Zawartość potasu w komórkach jest ściśle związana z osmolalnością podłoża hodowlanego, choć, jak dowiedziono, szczepy bakterii mlekowych *L. plantarum* i *L. lactis* nawet w warunkach niskiej osmolalności utrzymują stosunkowo wysokie, raczej stałe stężenie jonów potasu (27). Wynika to stąd, że bakterie *L. plantarum* nie mają silnie rozwiniętych mechanizmów osmoadaptacyjnych pozwalających na szybką akumulację dodatkowych jonów K^+ lub Na^+ (28), stanowiących pierwszą odpowiedź na stres osmotyczny.

Należy również zaznaczyć, że bakterie mlekowe, w przeciwieństwie do wielu innych grup drobnoustrojów, nie posiadają lub mają bardzo ograniczone zdolności do syntezy substancji osmoregulacyjnych, co również zmusza je do ich pobierania z pożywki. Substancje osmoregulacyjne, poza regulacją ciśnienia osmotycznego, mogą również działać stabilizująco na enzymy i inne makromolekuły (29). Dzięki temu mogą chronić komórkę nie tylko w warunkach wzrostu ciśnienia osmotycznego, ale i w przypadku wzrostu temperatury, zamarzania, czy wysuszenia (30).

Jedną z najważniejszych i najwcześniej opisywanych substancji osmoregulacyjnych jest betaina. Jej ochronny wpływ potwierdzono m.in. dla takich gatunków bakterii mlekowych, jak: *L. lactis, L. plantarum* i *Lactobacillus acidophilus* (31-33). Stwierdzono także, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, hodowane na pożywkach o podwyższonym ciśnieniu osmotycznym, znoszą wyższe stężenia soli, jeśli pożywka zawiera dodatek betainy. Podobny wpływ na komórki bakterii mlekowych wywiera glicyna, której obecność w pożywce razem z betainą powoduje zmniejszoną aktywację gromadzenia glutaminy (34). Kilstrup i in (35) zaobserwowali, że obecność betainy w pożywce zminimalizowała efekt letalny komórek *L. lactis* o 50%, wywołany obecnością 2,5% NaCl. W badaniach nad wpływem substancji wywołujących szok osmotyczny, takich jak KCl, NaCl, sacharoza, czy laktoza, wykazano, że obecność KCl lub NaCl hamuje silniej wzrost bakterii, niż to samo stężenie sacharozy lub laktozy. Wy-

wierany efekt ochronny betainy był widoczny tylko w przypadku soli mineralnych, co można wytłumaczyć faktem, że cukry wywołują tylko przejściową adaptację osmotyczną, ponieważ ich stężenie wewnętrzne i zewnętrzne bardzo szybko zostaje wyrównane poprzez pobór cukru ze środowiska (28).

Za pobór substancji osmoaktywnych w komórkach *L. plantarum*, takich jak glicyna, betaina lub analogi tych substancji (np. karnityna), odpowiedzialny jest pojedynczy, zależny od ATP system QacT. Za wypływ glicyny i betainy odpowiedzialny jest osobny, mechanozależny kanał białkowy (34). Dotychczas żaden z tych systemów nie został jednak opisany i scharakteryzowany na poziomie molekularnym.

W przypadku szczepów z rodzaju *Lactococcus*, za transport betainy i glicyny odpowiedzialny jest proteolipozomalny system OpuA, należący do rodziny ABC (ang. *ATP binding cassette*) (27). Podobnie jak wszystkie tego typu systemy, jest on aktywowany przez naprężenie błony cytoplazmatycznej, powstające w warunkach gradientu hiperosmotycznego oddziaływającego na komórkę (27). Innymi systemami działającymi jako osmoregulatory i biosensory są BusA, należący do regulatora transkrypcji jego ekspresji, jak i BusR (36). W świetle dzisiejszej wiedzy uważa się, że pierwszy sygnał stresu osmotycznego, którym są zmiany wewnątrzkomórkowej siły jonowej dociera do OpuA, co powoduje zmiany w błonie lipidowo-białkowej(37).

Pod wpływem zwiększenia ciśnienia osmotycznego w pożywce hodowlanej, w komórkach bakterii fermentacji mlekowej dochodzi do gromadzenia aminokwasów pełniących funkcję substancji osmoregulujących, takich jak alanina, glicyna, aspartam, glutaminian i prolina.

Podczas badań nad komórkami *L. lactis*, hodowanymi w obecności 0,5M KCl, zauważono wysoką akumulację proliny w środowisku wewnątrzkomórkowym. Podczas hodowli w tych samych warunkach różniących się dodatkiem do pożywki betainy zauważono gromadzenie wewnątrz komórki aspartanu, glutaminianu oraz betainy. Związki proliny znajdowały się w środowisku pozakomórkowym. W przeprowadzonych dokładnych badaniach nad mechanizmami poboru i wydalania z komórki związków betainy oraz transportu proliny wykazano, że w obecności betainy w pożywce następuje wymiana proliny na betainę, co tłumaczy obecność proliny w pożywce (37).

Badania z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej pozwoliły na zidentyfikowanie profilu białek wzbudzanych podczas szoku osmotycznego u *L. lactis*. Pośród nich zidentyfikowano białka GroES, GroEL, wiązane dotąd jedynie z warunkami szoku termicznego, oraz DnaK jako białka uczestniczące w ogólnej odpowiedzi na stres (35). W warunkach szoku osmotycznego, wywołanego dodatkiem chlorku sodu, w prowadzonych badaniach potwierdzono indukcję 17 różnych białek, z czego 12 zaliczanych jest do grupy chaperonów (HSP, ang. *Heat Shock Proteins*), zapewniających uzyskanie prawidłowej konformacji nowo syntetyzowanych łańcuchów polipeptydu, jak również umożliwiających renaturację białek, które uległy odkształceniu w wyniku określonego stresu (35). Spośród indukowanych białek przynajmniej 13 ulegało kilkukrotnej ekspresji w stosunkowo krótkim czasie po zastosowa-

niu czynnika stresowego. Przykładowo ekspresja białka Ssp21 wzrosła 35-krotnie przez 40 min po wywołaniu stresu, zaś białka ClpP czterokrotnie w przeciągu 10 min. W badaniach nad *L. lactis* odkryto dwa białka błonowe preoteazę wewnątrzkomórkową FtsH oraz zewnątrzkomórkową HtrA – biorących udział w mechanizmie osmoprotekcji (38).

Pośród innych, typowych zmian wywołanych ciśnieniem osmotycznym, wymienia się również syntezę egzopolisacharydów oraz bakteriocyn (39). W literaturze występuje bardzo mało informacji dotyczących genów oraz mechanizmów ich ekspresji podczas wystąpienia szoku osmotycznego. W badaniach przeprowadzonych nad komórkami *L. lactis* wykazano występowanie dwóch genów, których aktywacja rozpoczyna się od osmozależnego promotora uruchamianego również w niskim pH. Są to *gadC* kodujący glutamino-gama-aminomaślan oraz hflB, którego rola nie została jak dotychczas wyjaśniona.

4. Odpowiedź bakterii na szok cieplny

Wysoka temperatura należy do czynników powodujących denaturację białek i kwasów nukleinowych, jak również wywołuje uszkodzenia w błonach komórkowych. Ponadto stres temperaturowy przyczynia się do spadku wewnątrzkomórkowego pH poprzez zaburzenia w transporcie międzybłonowym.

Szok cieplny, czyli nagłe podwyższenie temperatury, prowadzi do charakterystycznej odpowiedzi adaptacyjnej w organizmach żywych. Odpowiedź ta związana jest ze wzrostem syntezy białek szoku cieplnego zwanych także chaperonami, mających wpływ na poprawną konformację nowo powstałych białek (40). Białka chaperonowe są powolnie działającymi ATPazami. Kompleks ADP-chaperon ma duże powinowactwo do niesfałdowanych polipeptydów, natomiast nie wiąże się z białkami natywnymi. Związanie segmentu niesfałdowanego peptydu z chaperonem jest sygnałem do odłączenia ADP z katalicznego miejsca chaperonu i wejścia w to miejsce ATP. Powstanie kompleksu ATP-chaperon powoduje uwolnienie segmentu peptydu. Zachodząca następnie hydroliza związanego ATP przywraca chaperonowi zdolność do związania następnego, niesfałdowanego segmentu (41). HSP są składnikami mechanizmów zwijania białek, systemów naprawczych oraz degradacji (niektóre z nich wykazują aktywność proteaz). Ponadto wykazano związek tych białek z głównymi procesami wzrostu drobnoustrojów, tj. z podziałami komórkowymi, replikacją DNA, transkrypcją, translacją, transportem oraz funkcjami biologicznymi błon (2,42).

W studiach nad bakteriami LAB w warunkach szoku cieplnego wykazano indukcję 17 białek w komórkach bakterii *L. lactis* (35), w tym części białek należących do chaperonów, takich jak: DnaK, GroEL, DnaJ oraz GroES i Grze.

W doświadczeniach porównawczych nad szczepami *L. plantarum* prowadzonych przez de Angelisa i in. (43) wykazano, że po wstępnej inkubacji drobnoustrojów w temperaturze 42°C przez 60 min, odporność mikroorganizmów na temperaturę

73°C znacznie wzrosła w porównaniu do bakterii nie poddanych wstępnej adaptacji termicznej. Na podstawie analizy profilu białkowego za pomocą elektroforezy dwukierunkowej wykazano zmiany w poziomie ekspresji 31 białek w komórkach będących w logarytmicznej fazie wzrostu oraz 18 białek przypadających na komórki z fazy stacjonarnej. Powstałe podczas szoku cieplnego białka zidentyfikowano jako DnaK, GroEL, czynnik wzrostu, białka rybosomów L1, L11, L31, S6, białko II HlbA wiążące DNA oraz CspC. W przeprowadzonej analizie proteomu potwierdzono odmienne czasowo pojawianie się białek w komórkach bakterii *L. lactis*. Dzięki niej białka indukowane szokiem cieplnym podzielono na białka pojawiające się od 10 do 15 min po zastosowanym stresie (HrcA, DnaK, GroES, GroEL, Hsp 85 (ClpE), Hsp84, Hsp100 i Hsp26), białka ClpP oraz osiem niezidentyfikowanych białek Hsp pojawiających się od 2 do 8 razy w przeciągu 25 minut po zastosowanym stresie (35).

Budowa genów kodujących białka szoku cieplnego w komórkach *L. lactis* wykazuje znaczne różnice w porównaniu z genami odpowiadającymi za indukcję wymienionych białek u innych mikroorganizmów. W większości przypadków geny *dnaJ* oraz *dnaK* podlegają regulacji przez jeden operon, jednakże w przypadku bakterii mlekowych *dnaJ* ulega transkrypcji niezależnie od *dnaK*, będącego częścią większego systemu ORF1, występującego również u innych bakterii gramdodatnich. W badaniach prowadzonych nad deficytowymi mutantami genu *dnaK* wykazano, że komórki pozbawione tego genu charakteryzowały się wzmożoną podatnością na działanie wysokich temperatur (44).

Arnau i in. (44) analizowali geny występujące w komórkach *L. lactis* MG1363. Wykazali oni, że 15-minutowe traktowanie mikroorganizmów temperaturą 42°C doprowadziło do 100-krotnego wzrostu transkrypcji dnaK-specyficznego RNA, 5-krotnego wzrostu *hrcA*- oraz *grpE* specyficznych mRNA występującccych po 10 minutach od zastosowania czynnika stresowego oraz 10-krotnego wzrostu transkrypcji *groEL* następującej po 15 minutach.

Kolejnym zidentyfikowanym genem odpowiedzialnym za białka chaperonowe jest *clip*, kodujący proteazę ClpP odpowiadającą za degradację źle złożonych białek. Wśród genów szoku cieplnego w komórkach bakterii fermentacji mlekowej wymienić należy również *hsp86 i asp23* (44).

W komórkach bakterii mlekowych, takich jak *L. lactis* (45), *L. mesenteroides* (46), *Oenococcus oeni* (47) i *Lactobacillus bulgaricus* (48), indukcja odpowiedzi na szok cieplny regulowana jest przez szereg mechanizmów, z których część wykazuje podobieństwo do mechanizmów regulacji u bakterii *Bacillus subtilis*. Do pierwszej grupy zaliczamy geny posiadające sekwencję regulacyjną umiejscowioną za genami szoku cieplnego. Jest to odwrócone powtórzenie sekwencji CIRCE (ang. *Controlling Inverted of Chaperone Expression*) (49). Należą do niej geny *dnaJ, hrcA-grpE-dnaK* oraz *groESL* (50). Do drugiej grupy należy ortolog genu FfsH, który został znaleziony w komórkach *L. lactis* (44).

Geny zaliczane do grupy trzeciej podlegają kontroli CtsR. W skład białek indukowanych pod wpływem szoku cieplnego, podlegających regulacji kasety CtsR/CtsR

u bakterii mlekowych należy HtrA należący do grupy seryn proteazowych mogących pełnić funkcję zarówno białek chaperonowych jak i proteaz. Ortologi HtrA zostały zidentyfikowane w komórkach *L. lactis*. W badaniach prowadzonych nad bakteriami posiadającymi mutacje genu *htrA* wykazano zmniejszoną odporność na podwyższoną temperaturę (51).

5. Odpowiedź na stres zimna w bakteriach kwasu mlekowego

Podczas prowadzenia procesów przemysłowych, bakterie LAB narażone są na działanie bardzo niskich temperatur, odbiegających od temperatur optymalnych dla ich wzrostu. Komórki bakterii mlekowych mogą szybko przystosować się do spadku temperatur. Potwierdzają to badania prowadzone nad komórkami *Lactococcus lactis* (52), *Streptococcus thermophilus* (53), *L. acidophilus* (54), *L. bulgaricus* (55), *L. plantarum* (56), które podczas spadku temperatury poniżej 20°C zwolniły tempo wzrostu, jednak wciąż ulegały podziałom komórkowym. Dalsze obniżenie temperatury spowodowało zatrzymanie wzrostu komórek *S. thermophilus* (53) oraz *L. acidophilus* (54).

Gwałtowny spadek temperatury może powodować szereg zmian w fizjologii drobnoustrojów oraz w ekspresji genów. Najważniejsze z nich to: spadek płynności błon oraz spadek stabilności drugorzędowych struktur RNA i DNA, które zmniejszają wydajność translacji, transkrypcji oraz replikacji DNA w komórkach.

W celu przeciwdziałania powstaniu wymienionych efektów komórki bakteryjne rozwinęły przejściowy system adaptacyjny, podczas którego syntetyzują one liczne białka indukowane zimnem (CIPs), które utrzymują płynność błon poprzez wzrost stężenia krótszych i/lub nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz lipidów. Ponadto zachowują strukturę cząsteczki DNA oraz podtrzymują niezbędne do uruchomienia głównych mechanizmów adaptacyjnych transkrypcje i translacje (57).

Wykorzystując narzędzia elektroforezy dwukierunkowej (2-DE) wykazano, że w komórkach *L. lactis* (55), *S. thermophilus* (53) szok zimna bezpośrednio wpływał na syntezę odpowiednio 22, oraz 24 białek CIP. W identyfikacji kilku z nich w bakteriach *L. lactis* wskazano, że biorą one udział także w innych procesach wewnątrzkomórkowych, takich jak: metabolizmie cukru (Hpr, CcpA, i β-PGM; β-fosfo-gluko-mutazy), budowie chromosomów (HU-podobne białka HslA), przekazywaniu sygnałów (L1rC, regulator odpowiedzi) oraz adaptacji na stres (OsmC) (58,59).

Główny mechanizm adaptacyjny na szok zimna polega na indukcji i wzmożonej syntezie białek szoku zimna (Csp ang. *Cold Shock Proteins*), nieprzerwaną syntezą niektórych białek związanych z translacją (mimo ogólnego zablokowania syntezy białka) oraz represją HSP.

Białka należące do rodziny Csp oraz odpowiadające im geny zostały również zidentyfikowane w bakteriach fermentacji mlekowej, takich jak *L. lactis*, *S. thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus casei* i *L. plantarum* (56,58-60).

W licznie przeprowadzanych analizach genetycznych i biochemicznych wykazano obecność dwóch genów *csp* w komórkach *Lactococcus lactis* sp. *lactis* IL1403 (61) oraz siedmiu białek CSRS (CspA to CspG) w bakteriach *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* MG1363 (59), z których pięć (CspA do CspF) jest aktywowanych podczas szoku zimna. Zidentyfikowano również pięć genów białek, CspA, CspB, CspC, CspD oraz CspE, nazwanych odpowiednio *cspA, cspB, cspC, cspD* i *cspE* (53).

Oprócz genów *csp*, których aktywacja zachodzi przy niskiej temperaturze, w komórkach *L. lactis* oraz *L. plantarum* zidentyfikowano geny *csp*, których transkrypcja nie jest uzależniona od szoku zimna. Są to *cspE* w komórkach *L. lactis* oraz *cspP i cspC* występujące w bakteriach *Lactobacillus plantarum*. Wspólną cechą tych genów jest fakt posiadania przez nie, w porównaniu do swoich zimnozależnych odpowiedników, dłuższego końca 5'-UTR (62).

Zarówno w komórkach *L. lactis*, jak i w bakteriach *L. plantarum, L. bulgaricus* i *S. thermophilus* indukowanie genów *csp* lub białek im opowiadających odbywa się tylko do granicznych wartości niskich temperatur, poniżej których odpowiedź komórkowa jest znacznie zwolniona. Wyznaczanie temperatur granicznych pozwala zoptymalizować system adaptacji na szok zimna.

Nabywanie tolerancji na niskie temperatury odbywające się po wstępnej adaptacji komórek zostało udowodnione w badaniach prowadzonych nad *L. lactis* (63) *L. acidophilus* (54), *L. bulgaricus* (55), *S. thermophilus* (53). Jednakże tylko nieliczni autorzy starali się znaleźć i wytłumaczyć powiązania pomiędzy odpowiedzią na szok zimna a kriotolerancją.

W badaniach prowadzonych nad komórkami *L. lactis*, wystawionymi na działanie temperatury 10°C przez 4 godziny, odkryto bezpośredni związek między wzrostem przeżywalności bakterii a stopniem ekspresji genów *csp* (64). Ponadto wykazano, że delecja *cspA, cspB* i *cspA, cspB, cspE* nie wpływa na przeżywalność bakterii w optymalnych warunkach wzrostu, jednakże w przypadku szczepów z uszkodzonymi *cspA, cspB, cspE*, adaptacja do zimnych temperatur przebiega znacznie wolniej (65). W kolejnych doświadczeniach wykazujących powiązania między kriotolerancją a szokiem zimna wykazano, że nadprodukcja białek CspB, CspD and CspE powoduje kilkukrotny wzrost przeżywalności zamrożonych drobnoustrojów, w porównaniu do szczepów dzikich (59,64).

Na uwagę zasługuje fakt, że system odpowiedzi na szok zimna ma działanie antagonistyczne do zjawiska termotolerancji. Zostało to potwierdzone w badaniach na modelu *Leuconostoc mesenteroides* wykonanych przez Salotrę i in. (46) oraz Walkera i in. (66) w stosunku do *Lactobacillus johnsonii*. Podczas szoku zimna zaobserwowano wzrost stężenia homologów DNAk i GroEL oraz związek pomiędzy wywołaniem odpowiedzi komórkowej na szok cieplny a ochroną krzyżową na zamarzanie.

6. Odporność na stres oksydacyjny

Bakterie kwasu mlekowego należą do organizmów względnie beztlenowych. Nie wymagają one obecności tlenu podczas podziałów komórkowych, wzrostu czy metabolizmu. Jednakże w niesprzyjających warunkach komórki te mogą wykorzystywać tlen jako końcowy akceptor elektronów.

W doświadczeniach prowadzonych nad komórkami bakterii *Lactobacillus lactis* IL1403 wykazano, że proces oddychania w obecności hemu może przedłużyć życie komórek *L. lactis*. Ponadto stwierdzono, że w środowisku z ograniczoną ilością glukozy zawartość tlenu w pożywce wpływa pozytywnie na wzrost komórek bakterii mlekowych (67).

Wielu autorów donosi jednak o szkodliwym działaniu tlenu na komórki fermentacji mlekowej. Podczas redukcji tlenu w łańcuchu oddechowym powstają szkodliwe dla komórki rodniki hydroksylowe, nadtlenek wodoru oraz rodniki ponadtlenkowe. Reaktywne formy tlenu (RFT) atakują białka, lipidy, czy kwasy nukleinowe bezpośrednio przyczyniając się do śmierci komórki (61,68). Bakterie fermentacji mlekowej wykształciły szereg mechanizmów obronnych przeciwko RFT.

Jedną z metod ochrony komórki przed niekorzystnym działaniem tlenu jest eliminacja wolnych cząsteczek tlenu. Guerzoni i in. (69) wykazali, że skład kwasów tłuszczowych w obrębie błony komórkowej bakterii *Lactobacillus helveticus* wywołuje różne reakcje komórki na stres oksydacyjny. Różnice te wynikają ze wzmożonego pochłaniania tlenu przez system desaturazy kwasów tłuszczowych, którego główną funkcją jest naprawa uszkodzeń w komórce bakteryjnej.

Komórki *L. lactis* odpowiadają na stres tlenowy zwiększeniem syntezy enzymów przeciwutleniających, do których należy dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, ang. *Superoxide Dismutase*), która degraduje ponadtlenek do H_2O_2. Genem kodującym ten enzym jest *sodA*, którego transkrypcja odbywa się w obecności tlenu (70). Enzymami degradującymi nadtlenki są również katalazy (zależne od obecności hemu), lub pseudokatalazy nie występujące w komórkach bakterii *Lactobacillus delbrueckii* (71, 72). Przykładowym genem kodującym katalazę w komórkach *Lactobacillus sakei* jest gen *katA*, którego ekspresja jest uzależniona od występowania reaktywnych form tlenu, w szczególności H_2O_2 (73). Jednym z najlepiej poznanych enzymów katalitycznych, nie wymagających do swojego działania związków hemu, jest pseudokatalaza zawierająca mangan, występująca w bakteriach *L. plantarum* ATCC14431 (74).

W komórkach *L. lactis* i *L. delbrueckii* potwierdzono również występowanie manganozależnej dysmutazy ponadtlenkowej (Mn-SOD), oksydazy NADH oraz peroksydazy NADH eliminujących wolne rodniki tlenowe i/lub nadtlenek wodoru (75). Paradoksalnie w procesie reakcji katalizowanej przez oksydazę NADH w komórkach *L. delbrueckii* powstają toksyczne cząsteczki H_2O_2, zaś bakterie z tego rodzaju nie posiadają katalazy mogącej je unieszkodliwiać (71).

Przykładem działania mechanizmów obronnych przed uszkodzeniami spowodowanymi związkami tlenu w komórkach *L. lactis* jest zmniejszenie wrażliwości na tlen

potencjalnych celów reaktywnych form tlenu. Inaktywacja białek FlpA i FlpB (ang. *FNR-like proteins*) odpowiadających za asymilację Zn(II) w szczepach zmutowanych powodowała zmniejszenie ilości ZnII w komórce oraz wzrost wrażliwości na H_2O_2. Na podstawie tych wyników sugeruje się, że komórki *L. lactis* wykorzystują ZnII w mechanizmach ochronnych w stresie oksydacyjnym, prawdopodobnie przez ochranianie grup tiolowych oraz białek. Związki cynku biorą czynny udział w aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej cynkozależnej (CuZnSOD), jednakże w literaturze brak jest doniesień o występowaniu tego enzymu antyoksydacyjnego w komórkach bakterii mlekowych (76).

Do głównych czynników biochemicznych biorących udział w likwidacji stresu oksydacyjnego w komórkach bakterii mlekowych zaliczyć należy działanie tiolowego trójpeptydu (L-γ-glutamylo-L-cysteinylo-glicyna)–glutationu, którego aktywność wynika z obecności reszty cysteinowej. Niektórzy autorzy sugerują, że mikroorganizmy mlekowe nie potrafią samodzielnie syntetyzować glutationu, tylko pobierają go w drodze transportu ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Wysokie stężenie tego związku zanotowano w licznych szczepach komórek *L. lactis*, zaś w komórkach *S. thermophilus* odkryto gen *gor* kodujący reduktazę glutationową, której aktywność wzrasta pod wpływem tlenu (77).

Innym mechanizmem adaptacyjnym pojawiającym się w obecności nadtlenku wodoru lub po szoku cieplnym jest wzrost aktywności genów *trxB* kodujących reduktazę tioredoksyny w komórkach *L. bulgaricus*, czy *trxA* kodujących tioredoksynę w komórkach *Oenacoccus oeni* (78,79).

W organizmach bakterii *L. fermentum* system asymilacji L-cysteiny jest bezpośrednio związany z odpowiedzią komórkową na stres oksydacyjny. Polega on na rozpadzie cysteiny do wolnych składników sulfhydryl tiocysteionowych, z których większość jest następnie usuwana z wnętrza komórki, pełniąc funkcję ochronną przed utleniającym działaniem tlenu (80). W badaniach z użyciem deficytowych mutantów genu BspA odpowiedzialnego za białka powierzchniowe biorące udział w procesach transportu produktów rozpadu cysteiny wykazano, że brak tych białek znacznie zmniejsza tolerancję komórek na stres osmotyczny (81).

System naprawy uszkodzeń spowodowanych stresem oksydacyjnym lub każdym innym stresem jest ostatnim mechanizmem obronnym zabezpieczającym komórki bakterii mlekowych przed szkodliwym działaniem środowiska. System SOS (określany jako kaseta SOS, ang. *SOS box*) składa się z nie połączonych ze sobą genów ulegających ekspresji podczas uszkodzeń w łańcuchu DNA. Zmiany w cząsteczce DNA powodują aktywację białka RecA, funkcjonującego w sposób nieenzymatyczny jako koproteaza, co pozwala na uruchomienie genów SOS (2). Duwett i in. (82) udowodnili występowanie genów dla białka RecA (*recA*) w komórkach *L. lactis*. Wykazali oni, że mutanty z uszkodzonym genem *recA* stawały się bardziej wrażliwe na działanie reaktywnych form tlenu. Według autorów produkt wyłączonego genu minimalizuje szkodliwość działania stresu tlenowego poprzez naprawy łańcucha DNA lub pośrednio wpływa na funkcje regulatorowe innych genów zaangażowanych w naprawę uszkodzeń w łańcuchu.

Rallu i in. (83) wyizolowali kilka kwasoodpornych mutantów komórek bakterii *L. lactis*, które wykazywały zwiększoną odporność na stres oksydacyjny, w szczególności na działanie nadtlenku wodoru. Jeden z mutantów charakteryzował się zablokowaną transkrypcją genu *pstS* kodującego transporter fosforanowy ABC. Autorzy sugerują, że zmniejszenie stężenia wewnątrzkomórkowego fosforanu stanowi sygnał uruchamiający odpowiedź komórkową na czynnik stresowy.

W opisanych mechanizmach obronnych przed uszkodzeniami spowodowanymi związkami tlenu w komórkach bakterii mlekowych, polegające na indukcji transkrypcji, bądź nasilenia aktywności enzymatycznej, wciąż nie wyjaśnia się wielu układów regulatorowych.

7. Podsumowanie

U podstaw działania mechanizmów odpornościowych i obronnych leży zasada wzbudzania poszczególnych reakcji niewielką dawką czynnika, za który dany mechanizm jest odpowiedzialny. Przykładowo, wzrost temperatury o kilka stopni jest sygnałem do podjęcia przez komórkę działań mających na celu przeciwdziałanie skutkom dalszego wzrostu temperatury.

Rozważając teorię wspólnej natury mechanizmów odpowiedzialnych za adaptację komórki do różnorodnych zmian zachodzących w otoczeniu można spodziewać się, że ekspozycja komórki na warunki podwyższonego ciśnienia osmotycznego może przygotować ją również do przetrwania w warunkach podwyższonej temperatury i odwrotnie. Na podstawie wyników prowadzonych na świecie badań dowodzi się, że mechanizm ten ma o wiele szerszy wymiar praktyczny, a tego typu zabieg adaptacyjny może pozwolić na zabezpieczenie komórki przed szerokim spektrum warunków stresowych. Poznanie mechanizmów obronnych oraz przystosowawczych do zaistniałych stresów może zminimalizować negatywne skutki działania czynników stresowych, ułatwiając tym samym hodowlę bakterii mlekowych. Ponadto znajomość genów ulegających aktywacji pod wpływem określonego bodźca stresowego może pozwolić na modyfikacje genetyczne bakterii, dzięki czemu będzie można np. regulować wzrost drobnoustrojów. Co więcej, wiedza dotycząca odpowiedzi komórkowej na poziomie genomu pozwoli usprawnić selekcję szczepów pod względem cech wrażliwości lub odporności na dany stres. W związku z tym coraz częściej mówi się o stosowaniu zabiegów adaptacji stresowej stającej się nowym, atrakcyjnym narzędziem w rękach biotechnologów i technologów żywności.

Literatura

1. Libudzisz Z., (2006), *Mikroorganizmy w żywności i żywieniu*, red. Gawęcki J., Libudzisz Z., Wyd. AR im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań, 93-102.
2. Singleton P., (2000), *Bakterie w biologii, biotechnologii i medycynie*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
3. Sanz Y., (2007), International Dairy J., 17, 1284-1289.

4. Hartke A., Bouché S., Giard J., C., Benachour A., Boutibonnes P., Auffray Y., (1996), Curr. Microbiol., 33, 194-199.
5. Kim W. S., Perl L., Park J. H., Tandianus J. E., Dunn N. W., (2001), Curr. Microbiol., 43, 346-350.
6. Svensater G., Sjogreen B., Hamilton I. R., (2000), Microbiology, 146, 107-117.
7. Champomier-Verges M. C., Maguin E., Mistou M. Y., Anglade P., Chich J. F., (2002), J. Chromatogr., 12, 123-135.
8. Frees D., Varmanen P., Ingmer H., (2001), Mol. Microbiol., 41, 93-103.
9. Breeuwer P., Drocourt J-L., Rombouts F. M., Abee T., (1996), Appl. Environ. Microbiol., 62, 178-183.
10. Cook G. M., Russel J. B., (1994), Curr. Microbiol., 28, 165-168.
11. Takahashi N., Xiao J. Z., Miyaji K., Yaeshiima T., Hiramatsu A., Iwatsuki K., i in. (2004), Journal of Dairy Research, 71, 340-345.
12. Rallu F., Gruss A., Ehrlich S. D., Maguin E., (2000), Mol. Microbiol., 35, 517-528.
13. Stock D., Leslie A. G., Walker J. E., (1999), Science, 286, 1700-1705.
14. Koebmann B. J., Nilsson D., Kuipers O. P., Jensen P. R., (2000), J. Bacteriol., 182, 4738-4743.
15. Martin-Galiano A. J., Ferrandiz M. J., de la Campa A. G., (2001), Mol. Microbiol., 41, 1327-1338.
16. Champomier-Verges M. C., Chaillou S., Cornet M., Zagorec M., (2001), *Lactobacillus* Res. Microbiol., 152, 839-848.
17. Quivey R. G., Kuhnert W. L., Hahn K., (2001), Crit. Rev. Oral Biol. Med., 12, 301-314.
18. Kashket E. R., (1984), FEMS Microbiol. Rev., 46, 233-244.
19. Zuniga M., Perez G., Gonzalez-Candelas F., (2002), Molecular Phylogenetics and Evolution, 25, 429-444.
20. Arena M. E., Manca de Nadra M. C., Munoz R., (2002), Gene, 301, 61-66.
21. Delmas F., Pierre F., Coucheney F., Divies C., Guzzo J., (2001), J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 3, 601-610.
22. Kremer B. H., van der Kraan M., Crowley P. J., Hamilton I. R., Brady L. J., Bleiweis A. S., (2001), J. Bacteriol., 183, 2543-2552.
23. Hartke A., Bouché S., Giard J. C., Benachour A., Boutibonnes P., Auffray Y., (1996), Curr. Microbiol., 33, 194-199.
24. Hartke A., Bouche S., Laplace J-M., Benachour A., Boutibonnes P., Auffray Y., (1995), Arch. Microbiol., 163, 329-336.
25. Poolman B., Nijssen R. M., Konings W. N., (1987a), J. Bacteriol., 169, 5373-5378.
26. Rallu F., Gruss A., Ehrlich S. D., Maguin E., (2000), Mol. Microbiol., 35, 517-528.
27. Wood J. M., Bremer E., Csonka L. N., Kramer R., Poolman B., van der Heide T., Smith L. T., (2001), Comp. Biochem. Physiol., 130, 437-460.
28. Glaasker E., Tjan F. S., Ter Steeg P. F., Konings W. N., Poolman B., (1998b), J. Bacteriol., 180, 4718-4723.
29. de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D., Maguin E., (2002), Antonie van Leeuwenhoek, 82, 187-216.
30. Panoff J. M., Thammavongs B., Gueguen M., (2000), Cryobiology, 40, 264-269.
31. Hutkins R. W., Ellefson W. L., Kashket E. R., (1987), Appl. Environ. Microbiol., 53, 2275-2281.
32. Obis D., Guillot A, Gripon J. C., Renault P., Bolotin A., Mistou M. Y., (1999), J. Bacteriol., 181, 6238-6246.
33. van der Heide T., Poolman B., (2000), J. Bacteriol., 182, 203-206.
34. Glaasker E., Heuberger E. H., Konings W. N., Poolman B., (1998a), J. Bacteriol., 180, 5540-5546.
35. Kilstrup M., Jacobsen S., Hammer K., Vogensen F. K., (1997), Appl. Environ. Microbiol., 63, 1826-1837.
36. Roméo Y., Gotierrez C., Mistou M. Y., (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 23, 1229-1254.
37. van der Heide T., Stuart M. C., Poolman B., (2001), EMBO J., 20, 7022-7032.
38. Foucaud-Sceunemann C., Poquet I., (2002), EMBO J., 24, 8655-8670.
39. Uguen P., Hamelin J., le Pennec J. P., Blanco C., (1999), Appl. Environ. Microbiol., 65, 291-293.
40. Gobbetti M., de Angelis A., Corsetti A., di Cagno R., (2005), Trends in Food Science and Technology, 16, 57-69.

41. Stryer L., (2000), *Biochemia*, Wyd. Nauk., PWN, Warszawa.
42. Kunicki-Goldfinger W., (2006), *Życie bakterii*, Wyd. Nauk., PWN, Warszawa.
43. de Angelis M., di Cagno R., Huet C., Crecchio C., Fox P. F., Gobbetti N., (2004), Appl. Environ. Microbiol., 70, 1336-1346.
44. Arnau I., Srensen K. I., Appel K. F., Vogensen F. K., Hammer K., (1996), Microbiology, 142, 1685-1691.
45. Auffray Y., Gansel X., Thammavongs B., Boutibonnes P., (1992), Curr. Microbiol., 24, 281-284.
46. Salotra P., Singh D. K., Seal K. P., Krishna N., Jaffe H., Bhatnagar R., (1995), FEMS Microbiol. Lett., 131, 57-62.
47. Guzzo J., Delmas F., Pierre F., Jobin M. P., Samyn B., van Beeumen J., Cavin J. F., Divies C., (1997), Lett. Appl. Microbiol., 24, 393-396.
48. Gouesbet G., Jan G., Boyaval P., (2002), Appl. Environ. Microbiol., 68, 1055-1063.
49. Zuber U., Schumann W., (1994), J. Bacteriol., 176, 1359-1363.
50. Martirani L., Raniello R., Naclerio G., Ricca E., de Felice M., (2001), FEMS Microbiol. Lett., 198, 177-182.
51. Poquet I., Saint V., Seznec E., Simoes N., Bolotin A., Gruss A., (2000), Mol. Microbiol., 35, 1042-1051.
52. Kim W. S., Dunn N. W., (1997), Curr. Microbiol., 35, 59-63.
53. Wouters J. A., Rombouts F. M., de Vos W. M., Kuipers O. P., Abee T., (1999b), Appl. Environ. Microbiol., 65, 4436-4442.
54. Baati L., Fabre-Gea C., Auriol D., Blanc P. J., (2000), Int. J. Food Microbiol., 59, 241-247.
55. Panoff J. M., Thammavongs B., Gueguen M., (2000), Cryobiology, 40, 264-269.
56. Mayo B., Derzelle S., Fernandez M., Leonard C., Ferain T., Hols P., Suarez J. E., Delcour J., (1997), J. Bacteriol., 179, 3039-3042.
57. Phadtare S., Yamanata K., Inouye M., (2000), *Bacterial Stress Response*, (33-45), ASM Press, Washington, DC.
58. Wouters J. A., Kamphuis H. H., Hugenholtz J., Kuipers O. P., de Vos W. M., Abee T., (2000a), Appl. Environ. Microbiol., 66, 3686-3691.
59. Wouters J. A., Mailhes M., Rombouts F. M., de Vos W. M., Kuipers O. P., Abee T., (2000b), Appl. Environ. Microbiol., 66, 3756-3763.
60. Chapot-Chartier M. P., Schouler C., Lepeuple A. S., Gripon J. C., Chopin M. C., (1997), J. Bacteriol., 179, 5589-5593.
61. Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissen-Bach J., Ehrlich S. D., Sorokin A., (2001), Genome Res., 11, 1-23.
62. Derzelle S., Hallet B., Francis K. P., Ferain T., Delcour J., Hols P., (2000), J. Bacteriol., 182, 5105-5113.
63. Broadbent J. R., Lin C., (1999), Cryobiology, 39, 88-102.
64. Wouters J. A., Jeynov B., Rombouts F. M., de Vos W. M., Kuipers O. P., Abee T., (1999a), Microbiology, 145, 3185-3194.
65. Wouters J. A., Frenkiel H., de Vos W. M., Kuipers O. P., Abee T., (2001), Appl. Environ. Microbiol., 67, 5171-5178.
66. Walker D. C., Girgis H. S., Klaenhammer T. R., (1999), Appl. Environ. Microbiol., 65, 3033-3041.
67. Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., Le Loir Y., Violet F., Loubiere P., Gruss A., (2001), J. Bacteriol., 183, 4509-4516.
68. Bolotin A., Mauger S., Malarme K., Ehrlich S. D., Sorokin A., (1999), Antonie van Leeuwenhoek, 76, 27-76.
69. Guerzoni M. E., Lanciotti R., Cocconcelli P. S., (2001), Microbiology, 147, 2255-2264.
70. Sanders J. W., Leenhouts K. J., Haandrikman A. J., Venema G., Kok J., (1995), J. Bacteriol., 177, 5254-5260.
71. Marty-Teysset C., de la Torre F., Garel J., (2000), Appl. Environ. Microbiol., 66, 262-267.
72. Rezaiki L., Casselin B., Yamamoto Y., Vido K., West E., Gaudu P., Gruss A., (2004), Molecular Microbiology, 53,1331-1342.

73. Hertel C., Schmidt G., Fischer M., Oellers K., Hammes W. P., (1998), Appl. Environ. Microbiol., 64, 1359-1365.
74. Igarashi T., Kono Y., Tanaka K., (1996), J. Biol. Chem., 271, 29521-29524.
75. Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J. J., le Loir Y., Oliveira S. C., Langella P., Azevedo V., (2003), Genet. Mol. Res., 2, 348-359.
76. Scott C., Rawsthorne H., Upadhyay M., Shearman C. A., Gasson M. J., Guest J. R., Green J., (2000), FEMS Microbiol. Lett., 192, 85-89.
77. Fu R., Bongers R., Swam I., Chen J., Molenaar D., Kleerebezem M., Hugenholtz J., Li Y., (2006), Metabolic Engineering, 8, 662-671.
78. Pebay M., Holl A. C., Simonet J. M., Decaris B., (1995), Res. Microbiol., 146, 371-383.
79. Jobin M. P., Garmyn D., Divies C., Guzzo J., (1999), Microbiology, 145, 1245-1251.
80. Turner M. S., Woodberry T., Hafner L. M., Giffard P. M., (1999), J. Bacteriol., 181, 2192-2198.
81. Hung J., Cooper D., Turner M. S., Walsh T., Giffard P. M., (2003), FEMS Microbiology Letters, 227, 93-99.
82. Duwat P., Ehrlich S. D., Gruss A., (1995), Mol. Microbiol., 17, 1121-1131.
83. Rallu F., Gruss A., Ehrlich S. D., Maguin E., (2000), Mol. Microbiol., 35, 517-528.