

Produkce bakteriocinů bakteriemi mléčného kvašení

MARIE KAZATELOVÁ

SOUHRN. Laktobacily a bifidobakterie produkují antimikrobiální látky, jednou z nich jsou také bakteriociny. Jedná se o velké proteinové komplexy, které mají schopnost se vázat na receptory citlivých buněk a následně tyto poškozením buněčné stěny usmrtit. Produkci bakteriocinů je možné indukovat vhodnými fyzikálními nebo chemickými prostředky (např. UV záření) a vhodnými kultivačními podmínkami zvýšit (optimální pH kultivačního média, teplota atd.). Každý bakteriocin má charakteristické inhibiční spektrum účinku proti rodově stejným i odlišným bakteriím.

KLÍČOVÁ SLOVA: Bifidobacterium; Lactobacillus; bakteriociny; inhibiční spektrum

1. Bakteriociny bakterií mléčného kvašení

Produkce antimikrobiálně aktivních peptidů je obecnou vlastností některých živých organismů a mezi bakteriemi je hojně zastoupena. Také bakterie mléčného kvašení (laktobacily a bifidobakterie) řadíme mezi producenty těchto látek. Antibakteriálně působícími látkami rozumíme v případě bakterií mléčného kvašení především peroxid vodíku, produkováný pouze laktobacilárními kmeny, organické kyseliny a bakteriociny, které produkují i bifidobakterie [1]. Tyto látky ve většině případů nepůsobí samostatně, ale jejich baktericidní efekt je výsledkem jejich kombinace.

Odborné poznatky v oblasti laktobacilů jsou velmi propracované a je prokázáno jak produkce řady laktobacilárních bakteriocinů, tak antagonistické vztahy a aktivity peroxidu vodíku, kyselin mléčné a citronové proti bakteriím stejného rodu, ale i proti bakteriím rodově odlišným, včetně patogenů [2].

Mgr. Marie KAZATELOVÁ, Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Česká republika.

2. Definice bakteriocinů

Bakteriociny jsou obecně produkovány grampozitivními i gramnegativními bakteriemi. Jedná se o specifické heterogenní antibakteriální látky proteinové povahy, produkované během růstu některých bakteriálních kultur. Účinnou složkou bakteriocinů je protein s daným inhibičním spektrem, které je omezeno převážně na kmeny vlastního druhu nebo druhy blíže příbuzné. Citlivost bakterií je dána přítomností specifických receptorů (v povrchových vrstvách) pro molekuly příslušného bakteriocinu na povrchu buněk citlivých kmenů. Bakteriociny jsou biologicky podobné klasickým antibiotikům a představují určitou funkční analogii k bakteriofágům. Neobsahují však nukleovou kyselinu a nejsou tedy schopny autoreprodukce [3,4]. I přes rozdílnou definici bakteriocinů různými autory se všichni shodují na jejich proteinové povaze a baktericidním působení, především vůči druhům blíže příbuzným produkčnímu kmenu. Dobře známými producenty bakteriocinů jsou např. *Escherichia coli* (kolicinů) a další druhy bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* [4].

3. Výskyt bakteriocinů

V posledních letech byl popsán velký počet nových bakteriocinů u mléčných bakterií (laktobacilů) [2,5,6]. Některé produkční kmeny syntetizují jen jeden bakteriocin, ale u mnoha mléčných bakterií byla prokázána produkce více bakteriocinů.

Produkce byla prokázána u všech těchto „mléčných bakterií“ rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* [2]. Z rodu *Lactobacillus* jsou to nejčastěji *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. fermenti* [7,8], *L. plantarum*, *L. sake* a *L. curvatus* [7]. Polybakteriocinogenní laktobacily jsou např. *L. acidophilus*, *L. sake* [9], a *L. plantarum* [10]. Stejný bakteriocin může být také produkován bakteriemi rozdílných rodů.

4. Chemické složení bakteriocinů

Všechny doposud popsané bakteriociny jsou charakterizovány obsahem proteinových komponent, které jsou nepostradatelné pro jejich biologickou aktivitu. Některé z nich jsou jednoduché proteiny, jiné jsou komplexem různých molekul - lipidu, sacharidu, fosforu vázaných na proteiny [9]. Bakterio-

ciny se běžně vyskytují ve formě velkých makromolekulárních komplexů. Nejčastěji to bývá asociace proteinů s lipidem a sacharidem [11]. Jsou inaktivovány proteolytickými enzymy (např. trypsinem nebo pepsinem), ale přitom jsou stabilní vůči působení lysozymu [6]. Nativní bakteriociny jsou makromolekulární látky (agregáty různých makromolekul), ale po purifikaci dochází k značnému snížení molekulové hmotnosti. Chemické složení všech bakteriocinů a jejich specifická chemická povaha nejsou ještě známy.

5. Mechanismus účinku

Mechanismus účinku bakteriocinů není ještě dostatečně vysvětlen. Uvažuje se o dvou krocích:

- a) Iniclace - nastává vazbou molekuly bakteriocinu na specifické receptory senzitivní buňky. Tato fáze je reverzibilní a navázaný bakteriocin může být inaktivován vhodnou proteázou nebo může být také přerušena např. běžnými laboratorními postupy (třepáním, provzdušňováním). Receptory jsou přítomny jak u citlivých, tak u produkčních bakteriálních kmenů, ale produkční kmeny jsou chráněny geneticky kódovanými imunitními faktory. Bakteriální kmeny postrádající receptory pro daný bakteriocin jsou rezistentní vůči jeho účinku [3,4]. Za těchto podmínek a v této fázi je buňka dále schopna života.
- b) Specifická biochemická reakce - tato fáze je ireverzibilní a probíhá jen u senzitivních bakteriálních kmenů. Primárním cílem bakteriocinů je buněčná membrána, na kterou se naváží a narušují její funkce. Hlavním biochemickým centrem účinku bakteriocinů je buněčná stěna. Spojení molekuly bakteriocinu s receptory je specifickým případem interakce protein–protein, na níž se podílejí jak iontové vazby, tak van der Waalsovy síly typu vodíkových můstků [4]. Usmrcení citlivých buněk je způsobeno poruchou transportu látek na úrovni membrány, což má za následek drastický pokles nezbytných metabolitů nebo iontů.

6. Indukce tvorby bakteriocinů

Produkci kolicinů u enterobakterií lze indukovat UV světlem. Ozáření vyvolává několikanásobné zvýšení množství těchto bakteriocinů v kultivačním médiu. Indukce laktocinů (laktobacilárních bakteriocinů) UV světlem nebyla zatím úspěšně prokázána. Existuje však řada faktorů, které mohou indukovat produkci laktocinů. Produkce bakterocinu u *L. plantarum* C11 může

být indukována plantaricinem A - bakteriocinu podobným peptidem, který je produkován samotným kmenem. Po přidání chemicky syntetizovaného nebo bakteriemi produkováného plantaricinu A do kultury neprodukcí kmenů *L. plantarum* byla produkce zaznamenána již po 150 minutách. Plantaricin A je schopen indukce vlastní syntézy a to za 15 minut po přidání do média [8,10]. Příklad autoindukce produkce bakteriocinu, kdy produkční kmen sám produkuje indukční faktor, byl pozorován u *L. sake* LTH673, přičemž šlo také o peptid. Indukce produkce laktacinu B u *L. acidophilus* N2 byla prokázána smíšenou kultivací tohoto kmene s citlivým indikátorovým kmenem *L. delbrueckii*. Analýza prokázala, že indikátorový kmen produkuje 28-kDa protein podobný laktacinu B, který zvyšuje produkci bakteriocinu [2].

7. Ovlivnění produkce bakteriocinů

Popsané bakteriociny jsou z velké části extracelulární látky produkované do prostředí během růstu produkčních kmenů. Byl však prokázán intracelulární původ kaseicinu u *L. casei* B80. Bakteriociny jsou většinou produkovány během exponenciální fáze růstu a mají vlastnosti primárních metabolitů. U některých bakteriálních kmenů však probíhá produkce bakteriocinů také během stacionární fáze. Produkce bakteriocinů je závislá na několika faktorech vnějšího prostředí zahrnujících složení a pH kultivačního média, fázi růstu producenta a teplotu.

Na některé bakteriociny negativně působí zvyšování kyselosti prostředí během pozdější fáze růstu. Stejně také počáteční hodnota pH má vliv na produkci a stabilitu bakteriocinů. Počáteční pH kultivačního média je vhodné v rozmezí 5,0–7,0. Složení kultivačního média se zdá být velmi důležité pro produkci bakteriocinů a optimalizace kultivačních podmínek může vést k několikanásobnému zvýšení produkováného množství bakteriocinů. Produkce různých bakteriocinů rovněž probíhá v různých rozmezích teplot. Optimální produkce většiny bakteriocinů je v rozmezí 25–37 °C. Většina popsáných bakteriocinů je také teplotně stabilní. Některé jsou však naopak vlivem vyšší teploty rychle inaktivovány. Teplotní stabilita je závislá na stupni purifikace příslušného bakteriocinu.

8. Inhibiční spektrum

Z hlediska inhibičního spektra lze rozlišit dva typy bakteriocinů:

- a) bakteriociny inhibující relativně široké spektrum grampozitivních organismů,

- b) bakteriociny vykazující antibakteriální aktivitu omezenou na druhy těsně se vztahující k produkčním kmenům.

Většina laktobacilárních bakteriocinů je charakteristická úzkým spektrem baktericidního účinku zahrnujícím jen druhy blízce příbuzné (mléčné bakterie) rodu *Lactobacillus* [4,13]. Některé však mají i poměrně široké spektrum a působí na řadu grampozitivních i gramnegativních bakterií. Širokospektré laktociny, bavaricin MN a laktocin 706, jsou aktivní vůči *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, dále salivaricin B působící na *Brochothrix thermosphacta*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*. Velká část laktocinů je aktivní vůči některým druhům listerií - hlavně *Listeria monocytogenes* [5]. Příčiny velké citlivosti listerií na laktociny nejsou známy. Taxonomické postavení rodu *Listeria* není úplně vyjasněno, ale předpokládá se, že tento rod je blízce příbuzný rodu *Lactobacillus* [6]. Také bakteriocin produkovaný *B. bifidum* NCFB 1454 (bifidocin) má charakteristické spektrum účinku, také však omezené jen na druhy příbuzné [13,14].

9. Využití bakteriocinů bakterií mléčného kvašení

Praktické využití nalézají už několik let bakteriociny jako např. nisin, především v tradičních mlékárenských technologiích. V průmyslovém měřítku mohou být využívány buď ve formě přídatku komerčního preparátu obsahující příslušný bakteriocin nebo ve formě bakteriocinogenních kmenů bakterií mléčného kvašení [3,15-17].

Literatura

1. MAXA, V. - RADA, V.: Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. Praha : Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1996. 42 s.
2. YAZID A. M. - ALI A. M. - SHUHAIMI, M. - KALAVAANI, V.: Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. Letters in Applied Microbiology, 31, 2000, č. 1, s. 57-62.
3. ŠMARD, J.: Lysogeny and bacteriocinogeny. Brno : Lékařská fakulta, Universita J. E. Purkyně, 1965. 148 s.
4. ŠMARD, J.: The effects of colicins. Brno : Lékařská fakulta, Universita J. E. Purkyně, 1978. 215 s.
5. DEMBÉLÉ, T - OBDRŽÁLEK, V. - VOTAVA, M.: Inhibition of Bacterial Pathogenes by Lactobacilli. Zentralblatt für Bakteriologie, 288, 1998, s. 395-401.
6. KLAENHAMMER, T. R.: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemie, 70, 1988, s.337-349.

7. DE KLERK, H. C. - SMITH, J. A.: Properties of *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. Journal of General Microbiology, 48, 1967, s. 309-315.
8. EIJNSINK, V. G. - BRURBERG, M. B. - MIDDELHOVEN, P. H. - NES, O. P.: Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by secreted peptide. Journal of Bacteriology, 178, 1996, s. 2232-2237.
9. SCHILLINGER, U. - LÜCKE, F. K.: Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology, 55, 1989, s. 1901-1906.
10. DIEP, D. B. - HAVARSTEIN, L. S. - NES, I. F.: A bakteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. Molecular Microbiology, 18, 1995, s. 631-639.
11. REEVES, P.: The Bacteriocins. Berlin : Springer-Verlag, 1972. 184 s.
12. BAREFOOT, S. F. - CHEN, Y. R. - HUGES, T. A. - BODINE, A. B. - SHEARER, M. Y. - HUGHES, M. D.: Identification and purification of protein that induces production of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin. Applied and Environmental Microbiology, 60, 1994, s. 3522-3528.
13. YILDIRIM, Z. - JOHNSON, M. G.: Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. Journal of Food Protection, 61, 1998, č. 1, s. 47-51.
14. RADA, V.: Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods and antimicrobial susceptibility testing. Biotechnology Techniques, 11, 1997, č. 12, s. 909-912.
15. OKEREKE, A. - MONTVILLE, T. J.: Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. Journal of Food Protection, 54, 1991, s. 349-353.
16. LIEVIN, V. - PEIFFER, I. - HUDAULT, S. - KOCHAT, F.: Bifidobacterium strains from resident human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. Gut, 47, 2000, č. 5, s. 646-652.
17. PLOCKOVÁ, M.: Význam bakteriocinů v mlékárenském průmyslu. In: Sborník z konference potravinářské mikrobiologie. Třešť : Česká společnost mikrobiologická, 1997, s. 93-96.

Do redakcie došlo 4.6.2001.

Production of bacteriocins by lactic acid bacteria

KAZATELOVÁ, M.: Bull. potrav. Výsk., 40, 2001, p. 269-274.

SUMMARY. Lactic acid bacteria are producers of antimicrobial substances, bacteriocins being one of them. These are large protein complexes that are able to bind to sensitive cell receptors and, subsequently, to kill the cell by damaging the cell wall. Production of bacteriocins can be induced by appropriate physical or chemical factors (e. g. UV-radiation) and increased by suitable growth conditions (optimal culture pH, temperature etc.). Each of bacteriocins has his characteristic inhibition spectrum against bacteria from the same or different genus.

KEYWORDS: Bifidobacterium; Lactobacillus; bacteriocins; inhibition spectrum