

Julitta Gajewska^{1*}, Mieczysław K. Błaszczuk¹

¹Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 159; 02-776 Warszawa

Wpłynęło w marcu 2010 r.

1. Wstęp. 2. Mikroorganizmy probiotyczne i ich cechy. 3. Cechy fizjologiczno-biochemiczne LAB. 4. pH wewnątrzkomórkowe LAB. 5. Potencjał oksydoredukcyjny bakterii mlekowych. 6. Fermentacje węglowodanów i produkcja kwasu mlekowego. 7. Wielkości genomów LAB. 8. Metabolizm azotowy LAB. 9. Metabolizm innych związków. 10. Polisacharydy produkowane przez LAB. 11. Podsumowanie

Probiotic lactic acid bacteria (LAB)

Abstract: The authors present physiological and biochemical properties of lactic acid bacteria (LAB). It is surprising that despite LAB multiple auxotrophy (they lack certain metabolic pathways and grow on full media only), they are not pathogens but probiotic microorganisms producing bacteriocins. A list of probiotic bacteria is not long and including mainly lactic acid bacteria. Their metabolic properties (hydrocarbonate fermentation, transformation of protein substrates, exopolysaccharide production) are exploited in food production and preservation.

1. Introduction. 2. Probiotic microorganisms and their abilities. 3 Short physiological and biochemic characteristics of LAB. 4. Intracellular pH of lactic acid bacteria. 5. Redox potential of LAB. 6. Carbohydrates fermentation and lactic acid production. 7. Genomes sizes of LAB. 8. Nitrogen metabolism. 9. Metabolism of other compounds. 10. Polysaccharides produced by LAB. 10. Summary

Słowa kluczowe: bakterie mlekowe, fizjologia i biochemia bakterii mlekowych, probiotyk

Key words: Lactic Acid Bacteria (LAB), physiology and biochemistry of LAB, probiotics

1. Wstęp

Bakterie mlekowe (LAB) są Gram-dodatnimi nie-sporującymi ziarenkowcami, pałeczkami lub laseczkami, zawierającymi w DNA chromosomalnym nie więcej niż 53% molowych par G+C. Nie wykorzystują tlenu jako akceptora elektronów (beztlenowce) oraz nie posiadają katalazy, zamiast niej syntetyzują dysmutazę nadtlenkową, usuwającą reaktywne formy tlenu. Prowadzą fermentację glukozy tylko do kwasu mlekowego (homofermentacja z wydajnością $\geq 85\%$) lub do kwasu mlekowego, etanolu (octanu) i CO₂ (heterofermentacja z wydajnością 50% produkcji kwasu mlekowego). Wszystkie bakterie mlekowe są beztlenowcami, niektóre z nich tolerują niewielkie stężenia tlenu w środowisku. Aktualnie tylko nieliczne zaliczane są do probiotycznych (*pro bios*), które razem z prebiotykami, znalazły zastosowanie w żywieniu i leczeniu ludzi [6, 21, 30, 40] oraz zwierząt hodowlanych, np. trzody chlewnej, są także używane jako substytuty antybiotykowych stymulatorów wzrostu [16, 20, 22, 23, 38, 56–58].

W ostatnim wydaniu Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – *The Firmicutes* (wyd. II, 2009) [5], bakterie mlekowe zebrane są w rzędzie *Lactobacillales*, w następujących rodzinach i rodzajach:

1) *Lactobacillaceae*: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*;

- 2) *Aerococcaceae*: *Aerococcus*, *Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Ignavigranum*;
3) *Carnobacteriaceae*: *Carnobacterium*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopostipes*, *Desemzia*, *Dolosigranum*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilactibacillus*, *Trichococcus*;
4) *Enterococcaceae*: *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*;
5) *Leuconostocaceae*: *Leuconostoc*, *Oecococcus*, *Weisella*;
6) *Streptococcaceae*: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactovum*;
oraz w rzędzie *Bacillales*
7) *Sporolactobacillaceae*: *Sporolactobacillus*.

Rodzaj *Lactobacillus*. Tanno c k [66] tak charakteryzuje *Lactobacillus*: „należą do bakterii mlekowych, które z olbrzymim potencjałem metabolicznym produkują kwas mlekowy jako końcowy produkt metabolizmu węglowodanów. Prowadzą fermentację węglowodanów, są aerotolerantami lub beztlenowcami, acidofilami lub tolerującymi środowiska kwaśne. Do wzrostu wymagają podłoża bogatego w węglowodany, aminokwasy, peptydy, kwasy tłuszczowe, estry, składniki kwasów nukleinowych i witaminy. Występują w środowisku zawierającym substancje pokarmowe, szczególnie węglowodany, w dużych ilościach, a więc w takich, jak nabłonek ludzki i zwierzęcy (jama gębowa, przewód pokarmowy, pochwa), na powierzchni roślin,

* Autor korespondencyjny: Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159; 02-776 Warszawa; tel. 22 59 32635; e-mail: gajewska3@wp.pl

w odchodach, ściekach oraz fermentowanej i psującej się żywności. *Lactobacillus* pojawiają się w przewodzie pokarmowym ludzi zaraz po urodzeniu.” U zdrowego dorosłego człowieka *Lactobacillus* występują w jamie ustnej w ilości 10^3 – 10^7 jednostek tworzących kolonie jtk/ml, jelicie krętym w ilości 10^3 – 10^7 jtk/ml, w okrężnicy w ilości 10^4 – 10^8 jtk/ml oraz dominują wśród wspólnoty bakterii pochwy. Są wykorzystywane w produkcji fermentowanej żywności: warzyw, mięsa, a w szczególności fermentowanych produktów mlecznych. Zainteresowanie bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* rośnie, głównie z powodów biotechnologicznych, czego wyrazem są poszukiwania nowych gatunków. I tak w 1984 roku znano 44 gatunki *Lactobacilli*, 88 w 2003 a 135 gatunków 2007, zaś w następnym roku znaleziono i opisano kolejnych 10 gatunków. *Lactobacillus* jest rodzajem wysoko heterogennym (G+C w DNA od 33 do 55%). Do tej pory zsekwencjonowano genomy następujących gatunków: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. sakei*, *L. salivarius* i *L. plantarum* [4].

Taksonomia i miejsce filogenetyczne gatunków rodzaju *Lactobacillus* nie korespondują z właściwościami metabolicznymi. 145 gatunków bakterii mlekowych [13], należących do *Lactobacilli* wedle typu fermentacji można podzielić na trzy grupy: (1) obligatoryjnie homofermentatywne, (2) fakultatywnie heterofermentatywne oraz (3) obligatoryjnie heterofermentatywne. Obligatoryjnie homofermentatywne *Lactobacilli* są zdolne do fermentacji glukozy do kwasu mlekowego szlakiem EMP (Embden-Meyerhof-Parnas), podczas gdy pentozy oraz glukonian nie są fermentowane z powodu braku fosfoketolazy (rozkłada rybulozo-5P na triozy-3P i acetylo-P). Degradację heksoz do kwasu mlekowego szlakiem EMP prowadzą następujące gatunki: *L. acidophilus*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. animalis*, *L. avarius*, *L. catenaformis*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. equi*, *L. farciminis*, *L. gallinarum*, *L. helveticus*, *L. iners*, *L. johnsonii*, *L. kalixensis*, *L. kefiranofaciens*, *L. mali*, *L. manihotivorans*, *L. mindensis*, *L. nagelli*, *L. pantheris*, *L. ruminis*, *L. saerimneri*, *L. salivarius*, *L. satsumensis*,

L. sharpeae, *L. suntoryeus*, *L. ultunensis*, *L. versmoldensis*, *L. vitulinus*.

Fakultatywnie heterofermentatywne *Lactobacilli* degradują heksozy do kwasu mlekowego oraz degradują pentozy i często glukonian, gdyż posiadają zarówno aldolazę fruktozo-1,6-difosforanową [rozszczepia fruktozo-1,6-bifosforan na dwie cząsteczki: aldehyd 3-fosfoglicerynowy (C_3) i fosfodihydroksyaceton (C_3)], jak i fosfoketolazę. Należą tu: *L. acetotolerans*, *L. acidipiscis*, *L. agilis*, *L. algidus*, *L. alimentarius*, *L. arizonensis*, *L. bifermentans*, *L. casei*, *L. coleohominis*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. cypricasei*, *L. fornicalis*, *L. fuchuensis*, *L. graminis*, *L. hamsteri*, *L. homohiochii*, *L. intestinalis*, *L. jensenii*, *L. kimchii*, *L. kitasatonis*, *L. murinus*, *L. paracasei*, *L. paralimentarius*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. perolens*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. spicheri*, *L. zeae* [13].

Trzecia grupa *Lactobacilli* obligatoryjnie heterofermentatywna – zawiera drobnoustroje degradujące heksozy i pentozy w szlaku fosfoglukonowym z wydzielaniem CO_2 . Należą tu następujące gatunki: *L. antri*, *L. buchneri*, *L. collinoides*, *L. diolivorans*, *L. durianis*, *L. ferintoshensis*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. frumenti*, *L. gastricus*, *L. hilgardii*, *L. ingluviei*, *L. kefiri*, *L. kunkkei*, *L. lindneri*, *L. malefermentans*, *L. mucosae*, *L. oris*, *L. panis*, *L. parabuchneri*, *L. paracolinoides*, *L. parakefiri*, *L. pontis*, *L. psittaci*, *L. reuteri*, *L. rosii*, *L. sanfranciscensis*, *L. suebicus*, *L. vaccinostercus*, *L. vaginalis* [13].

2. Mikroorganizmy probiotyczne i ich cechy

Wśród wielu mikroorganizmów produkujących kwas mlekowy w procesie fermentacji cukrów, jedynie nieliczne są uważane za gatunki probiotyczne (tabela I).

Termin probiotyk został po raz pierwszy użyty przez Lilly i Stilwell w 1965 roku do opisanie substancji wydzielanej przez jeden organizm, która stymuluje wzrost i rozwój innego. Rodzaje, gatunki i szczepy bakterii uznanych za bezpieczne (GRAS) dla zwierząt i człowieka określone zostały przez: FDA oraz raporty i zarzą-

Tabela I

Mikroorganizmy uważane za probiotyczne dla ludzi i/lub zwierząt (Z: Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365–373; za zgodą American Society for Nutrition)

Grupa mikroorganizmów	Gatunki mikroorganizmów
Gatunki <i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylovorans</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gassei</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> ¹ , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i>
Gatunki <i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> ² , <i>B. longum</i>
Inne bakterie mlekowe	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹ , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> ³ , <i>Sporolactobacillus inulinus</i> ¹ , <i>Streptococcus thermophilus</i> ³
Bakterie i grzyby niemlekowe	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> ^{1,2} , <i>Escherichia coli</i> szczep nissle, <i>Propionibacterium freundenreichii</i> ^{1,2} , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ² , <i>Saccharomyces boulardii</i> ²

Legenda: 1 – gatunki zwierzęce; 2 – gatunki farmaceutyczne; 3 – słabo znany jako probiotyczny

dzenia Unii Europejskiej. O dopuszczeniu do stosowania preparatów probiotycznych w Polsce decyduje Komisja Oceny Pasz przy Ministerstwie Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej RP. W 2008 r. odbyła się II Europejska Konferencja EUPROBIO dotycząca probiotyków i ich zastosowania (www.euprobio.com), w czasie której dokonano przeglądu aktualnego zastosowania probiotyków w medycynie ludzkiej, udoskonalenia metod otoczkowania preparatów oraz mechanizmów ich działania.

Cechy probiotyków. W 2004 roku Libudzis z [40] zaproponowała następujące kryteria selekcji i wymagania jakie powinny być stawiane bakteriom probiotycznym, podkreślając takie aspekty, jak bezpieczeństwo stosowania (7 punktów), cechy funkcjonalne (7 punktów) oraz cechy technologiczne (7 punktów), prezentowane poniżej.

Bezpieczeństwo stosowania: (1) pochodzenie od człowieka (jeśli preparat przeznaczony jest do stosowania dla ludzi); (2) izolowany z przewodu pokarmowego zdrowych osobników; (3) dokładna identyfikacja diagnostyczna; (4) historia bezpiecznego stosowania; (5) brak informacji o powiązaniu a chorobami infekcyjnymi serca lub przewodu pokarmowego; (6) brak zdolności rozszczepiania soli kwasów żółciowych; (7) brak genów oporności na antybiotyki, zlokalizowanych na elementach niestabilnych.

Cechy funkcjonalne: (1) przeżywalność w przewodzie pokarmowym, oporność na kwasowość soku żołądkowego sole żółci; (2) aktywność antagonistyczna w stosunku do patogenów jelitowych, normalizacja składu mikroflory jelitowej; (3) adherencja i zdolność kolonizacji określonych miejsc w przewodzie pokarmowym; (4) konkurencyjność w stosunku do mikroflory zasiedlającej ekosystem jelitowy, w tym blisko spokrewnionych gatunków; (5) oporność na bakteriocyny, kwasy i inne związki antagonistyczne produkowane przez mikroflorę jelitową; (6) zależny od szczepu efekt poprawy zdrowia człowieka; (7) immunomodulacja.

Cechy technologiczne: (1) łatwość produkcji dużej ilości biomasy; (2) oporność na procedury utrwalania starterów (zamrażanie, liofilizacja, przechowywanie), (3) żywotność i stabilność cech bakterii w czasie przygotowania i dystrybucji produktów probiotycznych; (4) wysoka przeżywalność przechowalnicza w gotowym produkcie; (5) brak pogorszenia cech organoleptycznych gotowych produktów; (6) oporność na bakteriofagi; (7) stabilność genetyczna. Więcej informacji o zastosowaniu bakterii probiotycznych jako probiotyków można znaleźć w pracach [39, 55, 67].

Żaden z postulatów podawanych przez różnych autorów nie podejmuje sprawy potencjału oksydoredukcyjnego (*Eh*), który wydaje się jednym z najistotniejszych czynników środowiskowych i determinujących występowanie i rozwój danego gatunku LAB w środowisku. W środowisku naturalnym, bakterie rozmieszczone są

wedle gradientu potencjału redoks oraz wedle gradientu chemicznego substancji odżywczych. Wysokie dodatnie wartości *Eh* wskazują na warunki tlenowe o niskiej aktywności elektronów, oraz tendencję do utleniania, ujemne wartości *Eh* wskazują na warunki zredukowane o wysokiej aktywności elektronów. *Eh* odpowiada proporcjom substancji utlenianych do zredukowanych w środowisku. Wartość E_7 jest rozumiana jako *Eh* przy wartości pH 7,0 wynoszące 0,2 V (lub 200 mV), a ta wartość jest linią dzielącą warunki utlenione od zredukowanych. Wartość $E_7 > 0,2$ V wskazuje na utlenienie, wartość $E_7 < 0,2$ V wskazuje na redukowanie. Niektóre jony występują w formie utlenionej lub zredukowanej w zależności od wartości potencjału redoks, np. rozpuszczalne w wodzie sole Fe^{+2} dominują przy $< 0,2$ V a sole Fe^{+3} dominuje przy $> 0,2$ V i są nierozpuszczalne. Potencjał oksydoredukcyjny jest ściśle związany z obecnością lub brakiem tlenu cząsteczkowego. Środowisko jest w równowadze z tlenem atmosferycznym przy potencjale redoks wynoszącym +0,8 V. Wiele środowisk naturalnych pozbawionych jest tlenu lub zawierają tlen w znacznie mniejszych ilościach. W środowiskach tych nie tylko licznie występują mikroorganizmy szybko-rosnące, lecz także takie, które mogą być bardzo wrażliwe na tlen cząsteczkowy. Istnienie obok siebie środowiska beztlenowego i tlenowego nie jest możliwe, występuje pomiędzy nimi interfaza, w której rozwijają się mikroorganizmy zwane mikroaerofilami, które rosną przy znacznie niższym stężeniu tlenu. Ta sytuacja sprawia, że istnieje stosunkowo liczna grupa bakterii fakultatywnie beztlenowych, która rośnie w warunkach beztlenowych, fermentując węglowodany lub różne grupy bakterii, które wykorzystują nieorganiczne akceptory elektronów typu azotany, siarczany, węglany i $Fe(III)$ lub korzystają z innych mechanizmów oddychania. Tego typu zjawisko ma miejsce np. w silnie zeutrofizowanych ekosystemach wodnych. Niektóre mikroorganizmy tlenowe posiadają wysoce efektywny system wyszukiwania tlenu i często są zdolne do współzawodniczenia z mikroaerofilnymi bakteriami w warunkach obniżonego stężenia tlenu.

3. Cechy fizjologiczno-biochemiczne LAB

Bakterie mlekowe pozyskują energię z fermentacji cukrów. Nie są zdolne do hydrolizy polisacharydów typu celuloza. Z powodu ograniczeń zdolności biosyntezy różnych związków (silna auksotrofia) występują w środowiskach, które są bogate w aminokwasy, witaminy, puryny i pirymidyny, słowem rosną na podłożach pełnych, które zaspakajają ich zapotrzebowanie. Niektóre z nich są organizmami wolnożyjącymi, inne żyją w asocjacjach ze zwierzętami kręgowymi, a także mogą występować u ludzi i zwierząt jako potencjalne patogeny (*Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*). Występują

powszechnie w mleku i jego produktach oraz w materiale roślinnym. Wchodzą także w skład mikroflory ludzkiej jamy ustnej, przewodu pokarmowego oraz pochwy, pełniąc wielokrotnie pozytywną rolę. Powszechnie, nie tylko u roślinożerców, występują w przewodzie pokarmowym ryb, płazów, gadów, ptaków i ssaków. Izoluje się je z hodowli namnażających uprzednio zaszczepionych próbkami pobranymi z gleb lub osadów dennych, co wskazuje, że w glebach i wodzie nie pełnią ważnej roli ekologicznej [12]. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że w glebach i wodzie brak jest dostatecznie dużo substratów białkowych, które zaspokajały potrzeby aminokwasowe tej wielokrotnie auksotroficznej grupy bakterii. Pierwszy gatunek należący do szczepów heterofermentujących bakterii mlekowych *Lactobacillus acidophilus* był izolowany w 1900 roku z odchodów zwierzęcych a nie z gleby czy wody [47].

4. pH wewnątrzkomórkowe LAB

Bakterie mlekowe posiadają zdolność regulacji wewnątrzkomórkowego pH i ta cecha jest dla nich bardzo istotna, pozwala na życie w stosunkowo niskim pH środowiska. Bakterie niezdolne do utrzymania pH zbliżonego do neutralnego wewnątrz komórek, w czasie wzrostu przy niskim pH tracą zdolność do życia i aktywności metabolicznej. Generalnie bakterie mlekowe rosną do momentu: (1) wyczerpania się węglowodanów, aminokwasów oraz innych substancji koniecznych do życia; (2) nagromadzenia się substancji toksycznych lub hamujących wzrost, tego typu jak nadtlenek wodoru; (3) stężenia jonów wodoru, poniżej którego bakterie mlekowe nie są w stanie tolerować. I tak np. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* oraz *Streptococcus thermophilus* rosną w mleku, dopóki pH środowiska nie obniży się do wartości 4,5 i to niezależnie od nielimitowanego stężenia substancji odżywczych. Również *Lactobacillus helveticus* oraz *L. debrueckii* subsp. *bulgaricus* wykazują najwyższą szybkość wzrostu przy pH 5,5–5,8. Niektóre gatunki *Lactobacillus* są neutrofilami i rosną w zakresie pH 6,3–6,9. Są one nazywane szczepami starterowymi w procesie kwaszenia mleka. Innym przykładem jest *Streptococcus thermophilus*, który rośnie najlepiej przy pH 6,5–7,5. Generalnie bakterie mlekowe rosną oraz pozostają żywe przy pH w zakresie od 4,5 do 7,0 [28, 33]. Wiele przebadanych enzymów degradujących białka oraz fermentujących węglowodany wykazuje maksymalną aktywność przy odczynie w zakresie neutralnym. Przy pH hamującym wzrost bakterii mlekowych, obecny w mleku kwas powoduje niszczenie błon cytoplazmatycznych, co objawia się wyciekaniem jonów magnezu i potasu z komórek do środowiska zewnętrznego. Np. wyciekanie magnezu z komórek *Lactobacillus casei* odbywa się przy pH < 3,0. Jednakże przy pH suboptymalnym w czasie

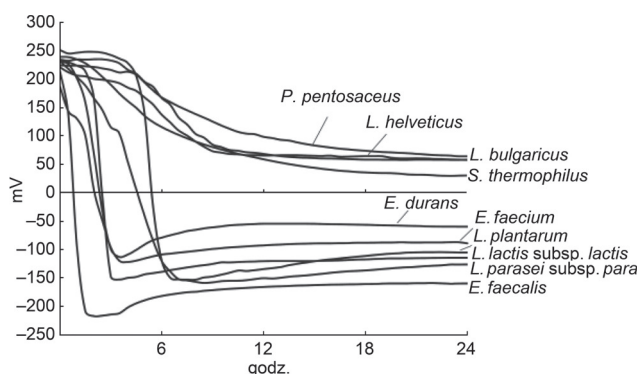
wzrostu i fermentacji, pH cytoplazmatyczne komórek pozostaje bardziej alkaliczne niż środowiska, w którym żyją. Dzieje się tak, ponieważ bakterie mlekowe szybko wydzielają kwas mlekowy z komórek za pośrednictwem transporterów, nadto błony biologiczne są względnie nieprzepuszczalne dla protonów oraz cząsteczek kwasu mlekowego. W ten sposób tworzy się gradient pH (Δ pH) pomiędzy cytoplazmą a środowiskiem ich życia. I tak *Streptococcus thermophilus* utrzymuje pH wewnątrzkomórkowe do momentu, kiedy pH środowiska nie jest niższe niż 5,2. Jeśli pH w podłożu hodowlanym spada dalej, komórki *Streptococcus thermophilus* nie są w stanie utrzymać pH cytoplazmatyczne na poziomie wartości neutralnych i obumierają. Zmiany pH komórkowego z wartości 7,5 do 6,6 powodują 50% redukcji szybkości wzrostu *Enterococcus faecalis* [33].

LAB mogą tolerować obniżenie pH w komórkach tylko o jedną jednostkę (Δ pH ~ 1,0), zwłaszcza zaś te, których optimum pH mieści się w zakresie neutralnego (np. 7,5). Flora mlekowa należąca do rodzaju *Lactococcus* i *Streptococcus* utrzymuje neutralne pH wewnątrz komórek, również wtedy, kiedy spada pH w fermentowanym mleku. Takie procesy jak transport aminokwasów i peptydów do komórek oraz proteolizy, są zależne od pH cytoplazmatycznego komórek LAB oraz pH środowiska [33].

Poza pH wiele czynników ma wpływ na wzrost i produkcję biomasy bakterii mlekowych, w tym głównie temperatura, skład chemiczny podłoża hodowlanego oraz obecność tlenu. Najszybciej procesy fermentacji i produkcji biomasy zachodzą w temperaturze od 26 do 42°C, większość hodowli tych bakterii prowadzi się w temperaturze 35–37°C. W warunkach laboratoryjnych hodowle LAB prowadzone są w podłożach zawierających trypton, ekstrakt drożdżowy i laktozę. Szczepy niewykorzystujące laktozy są hodowane w podłożach zawierających glukozę. Bakterie mlekowe w większości tolerują niewielkie stężenia tlenu, są więc mikroaerofilami. Niektóre szczepy jak *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* i *Leuconostoc mesenteroides* w obecności niewielkiej ilości tlenu produkują zwiększone ilości kwasu mlekowego. W hodowlach laboratoryjnych tworzą od 2 do 6,5 g biomasy/l przy specyficznej szybkości wzrostu wynoszącej od 0,180 do 0,256, co sprawia, że w czasie 48 godzin hodowle osiągną gęstość komórek wynoszącą 10^9 – 10^{10} jtk/ml [78].

5. Potencjał oksydoredukcyjny bakterii fermentacji mlekowej

Jednym z czynników determinującym występowanie i wzrost określonych gatunków bakterii w danym środowisku jest potencjał oksydoredukcyjny (E_h), definiowany jako mierzalna wartość zdolności chemicznego lub



Rys. 1. Zmiany potencjału oksydoredukcyjnego w czasie wzrostu różnych szczepów bakterii mlekowych w sterylizowanym odtłuszczonym mleku [7]

(Z: Brasca M., Morandi S., Lodi R., Tamburini A. 2007. Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1516–1524; dzięki uprzejmości i za zgodą Wydawnictwa Wiley-Blackwell)

biochemicznego systemu do utleniania (oddawania elektronów) lub redukcji (przyjmowania elektronów). Stan utleniania i redukcji wskazują na dodatnie lub ujemne wartości mV. W różnych hodowlach mikroorganizmów wartości E_h zmieniają się od około +300 mV (tlenowce) do mniej niż –400 mV (beztlenowce) (Rys. 1).

Niski potencjał sprawia, że w danym środowisku rozwijają się tylko bakterie beztlenowe. I tak np. E_h świeżego mleka wynosi +150 mV, E_h sera Cheddar wynosi –140 mV, a Camembert aż –350 mV [7]. W tych warunkach w serach nie występują bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus* i *Micrococcus*. Jeden z dziesięciu badanych gatunków LAB *Enterococcus faecalis* jest zdolny do obniżenia potencjału oksydoredukcyjnego, osiągając $E_{h\min} = -221 \pm 13,4$ mV w czasie $1,1 \pm 0,3$ godziny ($\Delta_{\max} = 326 \pm 93,1$ mV) [7]. W przewodzie pokarmowym, w dalszych jego odcinkach, istnieją

warunki sprzyjające rozwojowi bakterii beztlenowych i fakultatywnych beztlenowców. Warto tutaj dodać, że potencjał oksydoredukcyjny w jelicie grubym świń jest niski i wynosi -214 ± 55 mV [32]. To wskazuje na fakt, że tylko część z mikroorganizmów probiotycznych, lub tylko *E. faecalis*, jest zdolny do wzrostu i rozwoju przy tak niskich wartościach potencjału oksydoredukcyjnego. *E. faecalis* ze względu na warunki panujące w przewodach pokarmowych wydaje się być najbardziej stosownym gatunkiem probiotycznym (wymaga niskiego potencjału redoks), z drugiej strony istnieją doniesienia o jego oportunistycznej aktywności w przewodzie pokarmowym [54], powoduje także zakażenia dróg moczowych, bakteremię oraz zapalenie wsierdza. Inny gatunek *Enterococcus faecium*, który również rozwija się przy niskim potencjale redoks a jest rekomendowany jako probiotyk także jest powodem schorzeń [17, 54]. *E. faecalis* i *E. faecium* są zdolne do tworzenia biofilmów na różnych powierzchniach biotycznych i abiotycznych, w tym również urządzeniach medycznych, rozprzestrzeniając się [48].

W tabeli II podano średnie wartości parametrów kinetycznych szybkości zmiany potencjału redoks w hodowlach dziesięciu gatunków LAB w odtłuszczonym sterylnym mleku. Niektóre z tych szczepów jak widać mogą rosnąć tylko w warunkach, gdzie istnieje dodatni potencjał redoks. Wydaje się, że ta informacja dyskryminuje je jako gatunki probiotyczne. Są to: *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus* a nawet *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Wszystkie z dziesięciu badanych szczepów, w tym *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, rosną tylko przy potencjale redoks nie niższym niż +23 mV, ale niektóre przy +87 mV [7], co wydaje się dyskryminować je jako szczepy probiotyczne.

Tabela II

Średnie wartości parametrów kinetycznych szybkości obniżania potencjału redoks w czasie w hodowlach LAB w odtłuszczonym sterylizowanym mleku (Z: Brasca M., Morandi S., Lodi R., Tamburini A. 2007. Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1516–1524; dzięki uprzejmości i za zgodą Wydawnictwa Wiley-Blackwell)

Gatunek	$E_{h\min}$ (mV)	t_{\min} (h)	Δ_{\max}	t^* (h)
<i>Enterococcus faecalis</i>	$-221,1 \pm 13,4$	$2,7 \pm 0,6$	$326,8 \pm 9,0$	$1,1 \pm 0,3$
<i>Enterococcus faecium</i>	$-137,7 \pm 31,3$	$3,7 \pm 1,7$	$141,1 \pm 37,6$	$2,4 \pm 0,5$
<i>Enterococcus durans</i>	$-120,5 \pm 29,0$	$3,4 \pm 0,6$	$154,3 \pm 53,3$	$2,2 \pm 0,6$
<i>Streptococcus thermophilus</i>	$7,9 \pm 12,3$	$22,2 \pm 3,2$	$26,5 \pm 14,7$	$3,6 \pm 0,9$
<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	$-162,3 \pm 32,9$	$3,8 \pm 0,8$	$246,6 \pm 79,2$	$2,2 \pm 0,9$
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	$59,0 \pm 23,5$	$20,3 \pm 4,7$	$24,3 \pm 8,9$	$5,8 \pm 2,2$
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	$54,2 \pm 20,4$	$15,7 \pm 6,1$	$41,7 \pm 13,1$	$6,0 \pm 1,7$
<i>Lactobacillus plantarum</i>	$-153,8 \pm 18,2$	$7,6 \pm 0,6$	$229,5 \pm 88,6$	$5,4 \pm 0,4$
<i>Lactobacillus helveticus</i>	$54,4 \pm 23,8$	$13,6 \pm 5,5$	$30,8 \pm 10,5$	$6,4 \pm 1,6$
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	$-169,1 \pm 13,8$	$7,5 \pm 2,7$	$174,2 \pm 56,2$	$4,2 \pm 1,3$

Legenda: Δ_{\max} – maksymalna różnica między oznaczeniami; t^* – czas przy którym występuje najniższa wartość potencjału redoks; $E_{h\min}$ – minimalna wartość E_h po 24 h; t_{\min} – czas korespondujący z $E_{h\min}$.

6. Wielkości genomów LAB

Dotychczas zsekwencjonowano niewiele ponad dwadzieścia genomów LAB oraz piętnaście gatunków *Bifidobacteria*, produkujących kwas mlekowy. Sekwencje te opublikowano pod adresem: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial_taxtree.html. Szczegółowy wykaz prac dotyczących zsekwencjonowanych genomów wybranych gatunków bakterii mlekowych probiotycznych można znaleźć pod ww adresem.

LAB w swoich chromosomach wielkości 1.269.484 pz do 3.308.274 pz (odpowiednio dla *Lactobacillus iners* DSM 13335 i *L. plantarum* WSFS1), kodują głównie białka strukturalne i funkcjonalne, najmniej auksotroficzny gatunek *L. plantarum* koduje tylko 3.007 białek. Niewielka liczba genów u bakterii mlekowych w porównaniu z prototroficznym szczepem K12 *Escherichia coli* (4290 białek) wskazuje na ich utratę w czasie rozwoju ewolucyjnego [42]. Dobroczynny i probiotyczny zdaniem wielu autorów *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* zawiera tylko 1.856.951 pz w swoim chromosomie oraz syntetyzuje nieco ponad półtora tysiąca białek strukturalnych i funkcjonalnych. U bakterii mlekowych około 10–12% sekwencji chromosomowych to pseudogeny (od 17 do 206). Z analizy sekwencji genów wynika, że genomy LAB zawierają kilka szlaków uniwersalnych, włączając proces glikolizy. Różne genetyczne zdarzenia, jak mutacje, duplikacja genów, horyzontalny transfer genów, itd. nadają pewne swoiste cechy gatunkom LAB. W 2003 roku zsekwencjonowano genom *L. plantarum* WCFS1 jako pierwszy wśród rodzaju *Lactobacillus* [47]. Zawiera on najdłuższy analizowany do tej pory genom, który składa się z kolistego chromosomu (3.3 Mpz) oraz trzech plazmidów (1,9 i 2,3 i 36 kpz). Genom zawiera 3.052 geny kodujące białka, w tym pięć operonów *rrn* oraz sekwencje sześćdziesięciu dwóch tRNA. Genom koduje szlaki wielu aminokwasów, z wyjątkiem val, leu i ileu oraz nie zawiera sekwencji pozakomórkowej proteazy – odpowiednika PrtP występującej u *Lactococcus lactis*. Genom *L. plantarum* koduje wszystkie enzymy dwóch szlaków przemian glukozy – glikolizy oraz fosfoketolazy oraz przemian kwasu pirogronowego, co związane jest z pojawianiem się różnych produktów końcowych fermentacji. Nadto posiada duże ilości genów kodujących systemy regulacyjne, transportowe (włączając 25 kompletnych PEP-PTS systemów transportu cukru) oraz białka kilku rodzajów stresu. Geny te pozwalają gatunkowi *L. plantarum* na zasiedlanie różnych środowisk i zajmowania określonych nisz ekologicznych. Genom zawiera informacje o ponad 200 różnych pozakomórkowych białkach, pozwalających na budowę otoczki oraz ochronę przed fagocytozą. Stosunkowo duży odcinek genomu w okolicach odcinka początku replikacji DNA zawiera geny odpowiedzialne za transport, degradację itd. *Lactobacillus sakei* 23K,

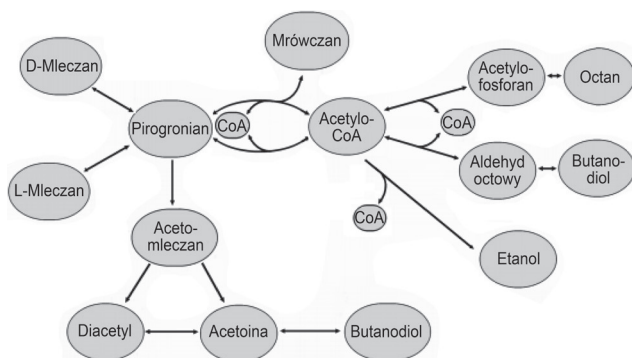
którego genom ma 1,8 Mpz, nie jest zdolny do syntezy aminokwasów, z wyjątkiem kwasu asparaginowego i glutaminowego, ale posiada geny odpowiedzialne za syntezę substancji antybakteryjnych, oporności na wysokie stężenia soli kuchennej oraz zmiany potencjału redoks [47]. Probiotyczny *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118, obok chromosomu, posiada megaplazmid pMP118, który koduje hydrolazę soli żółciowych oraz produkcję bakteriocyny Abp118 *in vivo*, skierowanej m.in. przeciwko *Listeria monocytogenes* [47].

7. Fermentacja węglowodanów i produkcja kwasu mlekowego

LAB są wykorzystywane w utrwalaniu żywności. Nadają one nie tylko wygląd i smak wielu produktom fermentacji, ale także hamują wzrost bakterii, które żywność tę psuje. Rosną w zakresie temperatur od 10 do 45°C, przy zasoleniu 6,5% NaCl, i pH w zakresie 4–9,6. Pewne z nich w procesie fermentacji wydzielają CO₂, inne (homofermentacyjne) w procesie fermentacji produkują albo obydwa izomery L i D – kwasu mlekowego lub tylko izomer L. W czasie fermentacji węglowodanów syntetyzują ATP w procesie fosforylacji substratowej. ATP jest następnie wykorzystywane do biosyntezy komórkowych. Pierwsza grupa bakterii mlekowych prowadzi fermentację glukozy tylko do kwasu mlekowego (homofermentacja) wykorzystując szlak degradacji glukozy EM (Embden-Meyerhof) i zawiera *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, gatunki należące do rodzaju *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* oraz *Vagococcus*. Homofermentatywne bakterie mlekowe katabolizują jeden mol glukozy do dwóch moli kwasu pirogronowego, który przy zrównoważonym potencjale redoks utlenia NADH, redukując się do kwasu mlekowego. Druga grupa zawierająca gatunki należące do rodzaju *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Weissella* oraz *L. fermentum*, *L. brevis* i *L. kefir* to bakterie mlekowe heterofermentatywne, które katabolizują glukozę szlakiem PP (pentozowo-fosforanowym). Z jednego mola glukozy, poddanej uprzednio dekarboksylacji powstają: jeden mol gliceryloaldehydu fosforanowego, z którego powstaje mol kwasu mlekowego oraz jeden mol fosforanu acetylu, który jest redukowany do etanolu (Rys. 2).

W sumie z mola glukozy powstają: mol kwasu mlekowego, mol etanolu i mol dwutlenku węgla. Gatunki posiadające obydwie dehydrogenazy mleczanowe, produkują mieszaninę racemiczną izomerów kwasu mlekowego, posiadające tylko jedną z dehydrogenaz produkują tylko jeden z izomerów.

Lactobacillus casei KH-1 rośnie optymalnie w podłożu MRS o pH 5,7, zawierającym ekstrakt drożdżowy, namok kukurydziany i glukozę odpowiednio w stężeniu



Rys. 2. Przemiany kwasu pirogronowego u bakterii mlekowych [3] (Z: Baj i Markiewicz (red.). Biologia molekularna bakterii. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2006, za zgodą wydawnictwa PWN)

niach 1,276%, 3,505% i 2,390%, przy μ_{\max} wynoszącym $0,994 \text{ h}^{-1}$. Jednakże optymalna produkcja kwasu mlekowego ($\sim 0,7 \text{ g/l h}^{-1}$) ma miejsce przy stężeniu tych surowców odpowiednio: 0,697%, 1,708% i 2,215% i μ_{\max} wynoszącym $0,491 \text{ h}^{-1}$ [28]. Wydajność produkcji kwasu mlekowego dla wybranych szczepów bakterii mlekowych przedstawia Tabela III.

Cytrynian jest substratem obecnym w wielu naturalnych substratach jak mleko, owoce, warzywa i jest metabolizowany przez niektóre gatunki LAB. Heterofermentatywne bakterie mlekowe jak *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* oraz *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremonis* są zdolne do metabolizmu cytrynianu w warunkach beztlenowych w obecności fermentowanego cukru np. glukozy czy laktozy [15]. W tych właśnie warunkach powstaje specyficzny produkt silnie zapachowy, jakim jest diacetyl. Kwas cytrynowy pobrany przez permeazę cytrynianową jest najpierw hydrolizowany do octanu, pirogronianu i CO_2 . Losy obecnego w komórce pirogronianu mogą być następujące: (1) pirogronian może być przekształcony do acetyloCoA i dalej do octanu i/lub aldehydu octowego/etanolu; (2) jest konwertowany do mrówczanu przy udziale liazy pirogronian:mrówczan; (3) jest przekształcony do acetomleczanu, który jest konwertowany do acetoiny i diacetylu ($\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$) oraz 2,3-butanediolu. Produkcja diacetylu oraz produktu pośredniego – acetoiny – zachodzi przy pH $\sim 5,5$. (4) redukowany do mleczanu, przy udziale dehydrogenazy mleczanowej. Inne szczepy tego typu jak

Tabela III

Produkcja kwasu mlekowego przez wybrane szczepy bakterii mlekowych na podłożach z różnymi substratami

Szczep LAB	Substrat	Kwas mlekowy g/l	Wydajność g/l \times godz ⁻¹	Piśmiennictwo
<i>Lactobacillus amylovorans</i> ATCC 33620	kukurydza	10,1	0,8	[72]
	kassava	4,8	0,2	[72]
	ziemniaki	4,2	0,1	[76]
<i>Lactobacillus amylophilus</i> GV6	jęczmień	27,3	0,3	[67]
<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	serwatka	46,0	4,0	[9]
	jęczmień	162,0	3,4	[41]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> NCIBMB 8130	melasa	90,0	3,8	[37]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> NRRL B-445	drewno	108,0	0,9	[49]
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> ATCC 25600	celuloza	24,0	0,5	[76]
	pulpa	23,1	0,5	[76]
<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435	pszenica	106,0	1,0	[31]
<i>Lactobacillus paracasei</i> No. 8	żyto	84,5	2,4	[60]
	sorgo	81,5	2,7	[60]
	sorgo	106,0	3,5	[59]
<i>Lactobacillus helveticus</i> R211	jęczmień	66,0	1,4	[61]
<i>Lactobacillus</i> sp.RKY-2	ryż	129,0	2,9	[77]
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	melasa	95,7	4,0	[72]
	pszenica	102,0	4,8	[52]
	kukurydza	63,5	0,5	[52]
	drewno	93,0	1,7	[71]
<i>Bifidobacterium longum</i>	kozie mleko	–	1,62	[29]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	kozie mleko	–	2,4	[29]
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATTC 21028	laktoza	41,0	1,0	[19]
<i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041	ścieki winiarskie	21,8	0,8	[8]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> mutant Uc-3	celobioza	90	2,2	[1]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	ścieki papiernicze	73	2,9	[45, 74]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	jęczmień	20,8	0,3	[25]

Streptococcus thermophilus oraz *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nie metabolizuje cytrynianu. Zdolność ta jest wykorzystywana w fermentacji żywności, nadając jej charakterystyczny zapach (np. serom). Wyprodukowany diacetyl nadaje charakterystyczny zapach świeżym serom, sfermentowanemu mleku, śmietanie oraz masłu. Losy kwasu cytrynowego mogą być jeszcze inne. W środowisku, w którym znajduje się maltoza i kwas cytrynowy, niektóre gatunki bakterii mlekowych (np. *L. sanfranciscensis*) produkują kwas mlekowy i octowy, ale po wyczerpaniu cytrynianu, głównym produktem fermentacji maltozy jest kwas mlekowy i etanol. Jak wynika z obserwacji maltoza jest źródłem węgla i energii, zaś kwas cytrynowy jest akceptorem elektronów [64].

8. Metabolizm azotowy LAB

LAB mają ograniczone możliwości syntezy aminokwasów, jeśli do ich syntezy wykorzystują nieorganiczne formy azotu. Bakterie mlekowe do wzrostu wymagają egzogennych aminokwasów i peptydów, które są uwalniane w procesie proteolizy białek obecnych w surowym materiale. Niektóre z bakterii do wzrostu wymagają od 6 do 13–18 aminokwasów w podłożu hodowlanym. *Lactobacillus johnsonii*, *L. sakei* i *L. delbrueckii*, są auksotroficzne w stosunku do 18 aminokwasów a *L. acidophilus* do 14 aminokwasów [49]. *L. plantarum* jest auksotroficzny tylko w stosunku do 3 aminokwasów: leucyny, izoleucyny i waliny. Przy braku dostatecznej ilości aminokwasów w środowisku bakterie mlekowe posiadają sprawny system proteolityczny, pozwalający na hydrolizę peptydów oraz białek celem uzyskania odpowiednich aminokwasów. Degradują nie tylko kazeinę w mleku, ale także albuminy, globuliny, gliadyny (np. w zacierach pszenicznych). I tak u *L. acidophilus* istnieje prawdopodobnie aż 20 różnych peptydaz oraz dwa kompletne systemy transportu oligopeptydów a nie tylko aminokwasów, dzięki którym zaspakajane są potrzeby związane głównie ze ich wzrostem i produkcją biomasy [2].

Proteolityczna aktywność bakterii mlekowych jest wykorzystywana przy produkcji żywności, które degradując białka nadaje smak, zapach i teksturę wyprodukowanej żywności np. sery typu Cheddar.

Auksotroficzność bakterii mlekowych dotyczy nie tylko aminokwasów, ale także witamin i zasad purynowych i pirymidynowych. I tak *Lactobacillus plantarum* do wzrostu wymaga 18 różnych związków organicznych z tej grupy, zaś *L. casei*, *L. helveticus* i *L. acidophilus* wymagają odpowiednio 20, 29 i 31 różnych związków organicznych koniecznych dla zaspokojenia ich podstawowych potrzeb [50].

W przemianach aminokwasów uczestniczą liczne enzymy, które katalizują reakcje transaminacji, deaminacji, dekarboksylacji oraz rozszczepienie łańcucha

aminokwasów [36]. Transaminacja jest kluczowym etapem konwersji aminokwasów do związków aromatycznych przy udziale bakterii mlekowych. Tego typu reakcje obserwowane są w hodowlach mezofilnych gatunków takich jak np.: *L. paracasei*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* oraz w hodowlach gatunków termofilnych jak: *L. helveticus*, *L. delbrueckii* (subsp. *lactis* oraz subsp. *bulgaricus*). W transaminacji leucyny, fenylalaniny a także innych aminokwasów przy udziale *L. sakei* oraz *L. plantarum* bierze udział α -ketoglutaran jako akceptor grupy aminowej. Rozgałęzione aminokwasy mogą ulegać transaminacji do ketokwasów, które dalej są konwertowane do aldehydów i kwasów karboksylowych [63]. W procesie degradacji aminokwasów związanej z dekarboksylacją bakterie mlekowe w białkowych produktach żywnościowych tworzą aminy pierwszorzędowe, pełniące rolę obronną tych bakterii [43, 44]. Ich nadmiar, w szczególności wysoki poziom putrescyny i agmatyny, mogą stwarzać problemy toksykologiczne. Putrescyna i agmatyna wzmacniają działanie histaminy, która w nadmiernych ilościach jest toksyczna dla ludzi. Istnieją doniesienia o zwiększonej ilości tych dwóch amin (putrescyna i agmatyna), które powstają w czasie degradacji argininy i ornityny przez *Lactobacillus hilgardii* w sokach owocowych oraz dojrzewającym winie. Nadto aminy takie jak putrescyna (w winie) oraz kadaweryna (w piwie) są prekursorami karcynogennych nitrozoamin. W sokach owocowych obok wymienionych wyżej amin w znacznych ilościach mogą występować histamina, tyramina i fenyletyloamina. Aktywność dekarboksylazy histaminowej oraz syntezę histaminy stwierdza się u *Pediococcus pentosaceus*, *Oenococcus oeni* oraz *Lactobacillus hilgardii*.

9. Metabolizm innych związków

LAB są zdolne do degradacji tłuszczów zawartych w produktach mlecznych, zamieniając je do metyloketonów, laktonów, tioestrów, keto- i hydroksykwasów, które nadają produktom mlecznym ostateczny zapach. Bakterie mlekowe posiadają odpowiedni zestaw enzymów esterolitycznych i lipolitycznych, dzięki którym hydrolizują estry kwasów tłuszczowych do kwasów tłuszczowych. Powstałe nienasycone kwasy tłuszczowe mogą ulegać autooksydacji lub oksydacji przy udziale lipo-oksigenazy bakterii mlekowych. Aktywność enzymów estero- i lipolitycznych jest obserwowana w zakresie temperatury od zera do 65°C, powyżej której są trwale inaktywowane.

10. Polisacharydy produkowane przez LAB

LAB produkują pozakomórkowe polisacharydy, które są albo bezpośrednio związane z powierzchnią komórek jako otoczki lub wydzielane z komórek do środowiska

Tabela IV

LAB produkujące egzopolisacharydy oraz ich skład chemiczny

Gatunek/podgatunek	Cukry budujące LPS	Ciężar molekularny	Piśmiennictwo
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	glukoza, galaktoza, ramnoza	5×10^5	[10]
<i>L. bulgaricus</i> HP1	glukoza, galaktoza	–	[18]
<i>L. helveticus</i>	glukoza, galaktoza, ramnoza, N-acetyloglukozoamina	$1,6 \times 10^6$	[74]
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	glukoza, galaktoza, ramnoza	–	[11]
<i>S. thermophilus</i>	glukoza, galaktoza, N-acetyloglukozoamina	1×10^6	[14]
<i>S. thermophilus</i> T10	glukoza, galaktoza, mannoza	–	[18]
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	galaktoza	–	[26]
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	glukoza, galaktoza, N-acetyloglukozoamina	1×10^6	[46]
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	glukoza, galaktoza, ramnoza, N-acetyloglukozoamina	1×10^4	[43]

w postaci śluzu. Są to egzopolisacharydy (EPS) [70]. Pełnią one w ich naturalnym środowisku ważną rolę: zabezpieczają przed odwodnieniem komórek, fagocytozą, atakiem fagów, antybiotykami i substancjami toksycznymi, zżeraniem przez pierwotniaki, stresem osmotycznym. Nie jest pewne czy EPS służy jako rezerwa pokarmowa dla bakterii, ponieważ nie są w stanie ich katabolizować [46]. Przykładami bakteryjnych egzopolisacharydów są także dekstran, ksantan, gellan, pullulan, alginian. Wiele mikroorganizmów wykorzystywanych w produkcji żywności produkuje EPS, w szczególności dotyczy bakterii mlekowych, *Propionibacteria* i *Bifidobacteria*. Wiele produkujących EPS bakterii mlekowych zostało wyizolowane z produktów mleczarskich takich jak jogurty, fermentowane mleko, ziaren kefiru, serów dojrzewających, fermentowanego mięsa i warzyw.

EPS bakterii mlekowych można podzielić na dwie grupy [70]: (1) homopolisacharydy, które można zaliczyć do czterech kategorii: (a) K-D-glukany np. produkowany przez *Leuconostoc mesenteroides* dekstran, zbudowany z cząsteczek glukozy, połączonych ze sobą wiązaniem K-1,6-glikozydowym, z odgałęzieniami K-1,3 lub K-1,6; (b) L-D-glukany zbudowane z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami L-1,3, z rozgałęzieniami L-1,2, produkowane przez *Pediococcus* i *Streptococcus*; (c) fruktany zbudowane z cząsteczek D-fruktozy połączonych ze sobą wiązaniami typu L-2,6 np. lewan produkowany przez *Streptococcus salivarius*; (d) inne jak np. poligalaktany. (2) heteropolisacharydy produkowane przez szczepy bakterii mlekowych odpowiednio mezofilnych i termofilnych: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *L. sake*, *L. rhamnosus* oraz *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* i *Streptococcus thermophilus* [11]. Pewne z tych polisacharydów przyczyniają się do zdrowia ludzi albo jako niestrawialna frakcja przeciwguzowa, przeciwwrzodowa (np. żołądka), albo immunomodulacyjna albo obniżająca poziom cholesterolu we krwi. Ilości wyprodukowanych egzopolisacharydów w warunkach laboratoryjnych w zależności od szczepu

i wielu innych czynników wahają się od kilkudziesięciu do jednego grama/l. W tabeli IV wymieniono bakterie mlekowe produkujące egzopolisacharydy oraz produkty uwalniane w procesie ich hydrolizy.

11. Podsumowanie

Pewne zdolności LAB takie jak fermentacja laktozy, metabolizm cytrynianu, aktywność proteinazowa, produkcja niektórych bakteriocyn, produkcja polimerów węglowodanowych, oporność na bakteriofagi, oporność na metale ciężkie, są kodowane plazmidowo i są opisane w pracach [24, 34–36, 51, 53, 62, 69].

Istnieje stosunkowo dużo informacji naukowych dotyczących niewielkiej grupy prokariota – LAB. Pomimo swojej wyjątkowo wielokrotnej auksotroficzności (chromosomy od ~1,3 do 3,2 Mbp), to dzięki wielkiemu potencjałowi metabolicznemu są dobrodziejstwem dla ludzi i zwierząt, ich kolejne aplikacje biotechnologiczne zadziwiają. Zrozumienie tej grupy bakterii odbywa się także poprzez roszczyfrowywanie zapisów genomowych (sekwencjonowanie kolejnych gatunków). LAB działają głównie poprzez wydzielane do środowiska ich życia produkty metaboliczne pierwotne i wtórne. Warto dodać, że tak ważne biotechnologicznie, nie są istotne ekologicznie w środowiskach dominujących na globie ziemskim – w wodach i na lądach, choć ostatnio mówi się o „morskich bakteriach mlekowych”.

Piśmiennictwo

1. Adsul M., Khire J., Bastawde K., Gokhale D.: Production of lactic acid from cellobiose and cellobiose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5055–5057 (2007)
2. Altermann E., Russell W.M., Azcarate-Peril M.A., Barrangou R., Buck B.L., McAuliffe O., Souther N., Dobson A., Duong T., Callanan M., Lick S., Hamrick A., Cano R., Klaenhammer T.R.: Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3906–3912 (2005)

3. Baj i Markiewicz (red.). *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2006
4. Bemardeau M., Vernoux J.P., Dubemet S.H., Gueguen M.: Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 278–285 (2008)
5. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Wyd. II. tom III – The Firmicutes. Red. Vos P., Garrity G., Jonem D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B., Wyd. Springer 2009
6. Bielecka M.: Żywność probiotyczna. *Pediatrica Współczesna. Gastroenterologia. Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, **4**, 27–32 (2002)
7. Brasca M., Morandi S., Lodi R., Tamburini A.: Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 1516–1524 (2007)
8. Bustos G., Moldes A.B., Cruz J.M., Domínguez J.M.: Production of fermentable media from vine-trimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. *J. Sci. Food Agri.* **84**, 2105–2112 (2004)
9. Büyükkilci A.O., Harsa S.: Batch production of L(+)-lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 1036–1040 (2004)
10. Casalta E., Montel M.K.: Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 271–273 (2008)
11. Cerning J., Renard C.M.G.C., Thibault J.F., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M., Topisirovic L.: Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG 11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3914–3919 (1994)
12. Chen Y.S., Yanagida F., Shinohara T.: Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letts. Appl. Microbiol.* **40**, 195–200 (2005)
13. Claesson M.J., van Sinderen D., O'Toole P.W.: *Lactobacillus* phylogenomics – towards a reclassification of the genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2945–2954 (2008)
14. Doco T., Fournet B., Carcano D., Ramos P., Loones A.: Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydr. Res.* **198**, 313–321 (1990)
15. Drider D., Bekal S., Prévost H.: Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. *Gen. Mol. Res.* **3**, 273–281 (2004)
16. Fabijańska M., Siedlecki J., Rekosz-Burlaga H., Górka E., Jankowski W., Gajewska J.: Wyniki odchowu prosiąt na mieszankach bezantybiotykowych stymulatorów wzrostu zastępowanych probiotykami i syntetycznym zeolitem. *Nauka Produkcji. Zootechnika* (Wyd. Akademii Rolniczej w Grodnie) **2**, 231–237 (2001)
17. Fisher K., Phillips C.: The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol.* **155**, 1749–1757 (2009)
18. Frengova G.I., Simova E.D., Beshkova D.M., Simov Z.I.: Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Z. Naturforsch.* **57c**, 805–810 (2002)
19. Fu W., Mathews A.P.: Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Bioch. Eng. J.* **3**, 163–170 (1999)
20. Gajewska J., Fabijańska M., Rekosz-Burlaga H., Siedlecki J., Jankowski W., Górka E.: Charakterystyka tlenowej i beztlenowej mikroflory przewodu pokarmowego prosiąt żywionych mieszankami paszowymi z dodatkiem probiotyków i syntetycznego zeolitu. *Ann. Warsaw Agric. Univ., zeszyt specjalny*, 230–235 (2001)
21. Gajewska J., Laks M.: Characteristics of faecal *Bifidobacterium* sp. bacteria isolated from patient with colitis ulcerosa diagnosis. Second Eur. Conf. Probiotics and their Applications – EUPROBIO 2008, Cracow, 15–17 October 2008.
22. Gajewska J., Masznicz M., Rekiel A., Batorska M., Pawlicka E., Więcek J.: Skład mikroflory kału prosiąt i tuczników otrzymujących dodatek preparatu probiotycznego i/lub kwasu benzoowego. *Rocz. Nauk. PTZ*, **4**, 33–41 (2008)
23. Gajewska J., Twardowska A., Woszczyk M., Rekiel A., Batorska M.: Wpływ różnych dodatków paszowych w programach żywienia na skład mikroflory kałowej rosnących świń. *Ekol. Tech.* **16**, 33–37 (2008)
24. Gautier M., Chopin M.C.: Plasmid-determined restriction/modification system and abortive infection in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 923–927 (1987)
25. Ghaseini M., Najafpour G., Rahimnejad M., Beigi P.A., Sedighi M., Hashemiyeh B.: Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *Afric. J. Biotechnol.* **8**, 81–84 (2009)
26. Gruter M., Leelang B.R., Kuiper J., Kamerling J.P., Vliegenhart F.G.: Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. *Carbohydr. Res.* **231**, 73–291 (1992)
27. Gupta V., Garg R.: Probiotics. *Ind. J. Med. Microbiol.* **27**, 202–209 (2009)
28. Ha M.Y., Kim S.W., Lee Y.W., Kim M.J., Kim S.J.: Kinetics analysis of growth and lactic acid production on pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/corn steep liquor/glucose medium. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 134–140 (2003)
29. Hadadji M., Bensoltane A.: Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk. *Afric. J. Biotechnol.* **5**, 505–509 (2006)
30. Heczko P.B., Strus M., Kochan P.: Projektowanie probiotyków do zastosowań medycznych. *Post. Mikrobiol.* **47**, 431–434 (2008)
31. Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B.: L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **20**, 301–307 (1997)
32. Hornich M., Chrastova V.: The redox potential of the large intestine in swine in relation to swine dysentery. *Vet. Med.* **26**, 593–598 (1981)
33. Hutkins R.W., Nannen N.L.: pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **76**, 2354–2365 (1992)
34. Kaletka C., Entian K.D.: Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* **171**, 1597–1601 (1989)
35. Klaenhamer T.R.: Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39–85 (1993)
36. Kok J.: Genetic of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 15–42 (1990)
37. Kotzanmanidis C., Roukas T., Skaracis G.: Optimization of lactic acid production from beet molasses *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World J. Microbiol. Biotech.* **18**, 442–444 (2002)
38. Kowalski C., Łebkowska B., Pomorska M.: Probiotyki – potencjalna alternatywa dla terapii antybiotykowej. *Magazyn Weterynaryjny – (Supl. Świnie)*, **6**, 60–66 (2006)
39. Lee D.K., Jang S., Baek E.H., Kim M.J., Lee K.S., Shin H.S., Chung M.J., Kim J.E., Lee K.O., Ha N.J.: Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. *Lipids Health Dis.* **8**, 21–28 (2009)
40. Libudzisz Z.: Mikroflora jelitowa a probiotyki. *Zakażenia*, **6**, 49–51 (2004)
41. Linko Y.Y., Javanainen P.: Simultaneous liquefaction, saccharification, and lactic acid fermentation on barley starch. *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 118–123 (1996)
42. Makarova K., Mills D., i wsp.: Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 15611–15616 (2006); (praca jest dziełem 49 autorów)

43. Manca de Nadra M.C., Arena M., Saguir F.M.: Nutritional requirements and amino acids utilization by lactic acid bacteria from wine – A short review. *Food, Agri. Environ.* **1**, 76–79 (2003)
44. Manca de Nadra M.C.: Nitrogen metabolism in lactic acid bacteria from fruits: a review. *Com. Cur. Res. Edu. Top. Trends Appl. Microbiol.* 500–510 (2007)
45. Marques S., Santos J.A., Gírio F.M., Roseiro C.: Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioch. Eng. J.* **41**, 210–216 (2008)
46. Marshall V.M., Cowie E.N., Moreton R.S.: Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* LC330. *J. Dairy Res.* **62**, 621–628 (1995)
47. Mayo B., van Sinderen D., Ventura M.: Genome analysis of food grade lactic acid-producing bacteria: from basics to applications. *Curr. Genom.* **9**, 169–183 (2008)
48. Mohamed J.A., Huang D.B.: Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1581–1588 (2007)
49. Moldes A.B., Alonso J.L., Parajó J.C.: Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 279–284 (2001)
50. Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakurai T., Yura S.: Multiple nutritional requirements of *Lactobacilli*: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.* **148**, 64–71 (1981)
51. Nakajima H., Sirota T., Toba T., Ito T., Adach S.: Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydr. Res.* **224**, 245–253 (1992)
52. Oh H., Wee Y.J., Yun J.S., Han S.H., Jung S., Ryu H.W.: Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Biores. Technol.* **96**, 1492–1498 (2005)
53. Parada J.L., Caron C.R., Medeiros A.B.P., Soccol C.R.: Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification properties and use as biopreservatives. *Bras. Arch. Biol. Technol.* **50**, 521–542 (2007)
54. Piekarska K.: Enterokokki – czynniki wirulencji i chorobotwórczość. *Post. Mikrobiol.* **45**, 195–207 (2006)
55. Reid G.: The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3763–3766 (1999)
56. Rekiel A., Więcek J., Bielecki W., Gajewska J., Cichowicz M., Kulisiewicz J., Batorska M., Roszkowski T., Beyga K.: Effect of addition of feed antibiotic flavomycin or prebiotic BIO-MOS on production results of fatteners, blood biochemical parameters, morphometric indices of intestine and composition of microflora. *Arch. Tierz. Dummerstorf.* **50**, 172–180 (2007)
57. Rekiel A., Gajewska J., Pawlicka E., Masznicz M., Tokarska G.: Charakterystyka enterokokków kałowych izolowanych od prosiąt otrzymujących preparaty Lactiferum lub Biogen. *Med. Wet.* **64**, 1141–1145 (2008)
58. Rekiel A., Gajewska J.: Zmiany mikroflory jelitowej tuczników pod wpływem wybranych czynników żywieniowych. *Med. Wet.* **62**, 925–930 (2006)
59. Richter K., A. Träger A.: L(+)-lactic acid from sweet sorghum by submerged and solid state fermentations. *Acta Biotech.* **14**, 367–378 (1994)
60. Richter K., Berthold C.: Biotechnological conversion of sugar and starch crops into lactic acid. *J. Agri. Eng. Res.* **71**, 181–191 (1998)
61. Schepers A.W., Thibault J., Lacroix C.: *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part II: Kinetic modeling and model validation. *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 187–194 (2002)
62. Semjonovs P., Jasko J., Auzina L., Zikmanis P.: The use of exopolysaccharide-producing culture of lactic acid bacteria to improve the functional value of fermented food. *J. Food Technol.* **6**, 101–109 (2008)
63. Smit G., Verheul A., van Kranenburg R., Ayad E., Siczen R., Engels I.: Cheese flavour development by enzymatic conversion of peptides and amino acids. *Food Res. Int.* **33**, 153–160 (2000)
64. Stolz P., Boker G., Hammes W.P., Vogel R.F.: Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. I. *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Z. Lebensmittel-Untersuch. Forschung.* **201**, 402–410 (1995)
65. Suskovic J., Kos B., Goreta J., Matosic S.: Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Tech. Biotechnol.* **39**, 227–235 (2001)
66. Tannock G.W.: A special fondness for *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3189–3194 (2004)
67. Trachoo N., Boudreaux C.: Therapeutic properties of probiotic bacteria. *J. Biol. Sci.* **6**, 202–208 (2006)
68. Vishnu C., Seenayya G., Reddy G.: Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 429–433 (2002)
69. Vos W.M., Boerigter L., van Rooyen R.J., Reiche B., Hengstenberg W.: Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **265**, 22554–22560 (1990)
70. Vuyst L., Degeest B.: Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 15–177 (1999)
71. Wee Y.J., Kim J.N., Yun J.S., Ryu H.W.: Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 568–573 (2004)
72. Wee Y.J., Yun J.S., Park D.H., Ryu H.W.: Biotechnological production of L (+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Biotech. Lett.* **26**, 71–74 (2004)
73. Xiaodong W., Xuan G., Rakshit S.K.: Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates. *Biotech. Lett.* **19**, 841–843 (1997)
74. Yamamoto Y., Murosaki S., Yamauchi R., Kato K., Sone Y.: Structural study on an exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* TY1-2. *Carbohydr. Res.* **261**, 67–78 (1994)
75. Yáñez R., Alonso J.L., Parajó J.C.: D-lactic acid production from waste cardboard. *J. Chem. Techn. Biotechnol.* **80**, 76–84 (2005)
76. Yáñez R., Moldes A.B., Alonso J.L., Parajó J.C.: Production of D (–)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1161–1164 (2003)
77. Yun R., Wee A.B., Kim J.N., Ryu H.W.: Fermentative production of DL-lactic acid from amylase-treated rice and wheat brans hydrolyzate by a novel lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* **26**, 1613–1616 (2004)
78. Zannini E., Santarelli S., Osmani A., Della'Aquila L., Clementi F.: Effects of parameters process on the production of lactic acid bacteria in batch fermentation. *Ann. Microbiol.* **55**, 273–278 (2005)