

Produkty metabolismu bakterií mléčného kvašení s antimikrobiální aktivitou

MARIE KAZATELOVÁ

SOUHRN. Bakterie mléčného kvašení produkují široké spektrum antimikrobiálně působících látek, antagonisticky působících primárních a sekundárním metabolitů. Specifický antimikrobiální mechanismus bakterií mléčného kvašení zahrnuje produkci organických kyselin, peroxidu vodíku, oxidu uhličitého a také produkci bakteriocinů. Všechny tyto látky působí inhibičně ve většině případů jako komplex skládající se ze synergického působení jednotlivých komponent.

KLÍČOVÁ SLOVA: bakteriociny; bakterie mléčného kvašení; antimikrobiální metabolity; klasifikace bakteriocinů

Přestože rozvoj v oblasti biotechnologií a potravinářských technologií využívá moderních metod a postupů, stále jsou řešeny problémy vztahující se k zabezpečení hygienické nezávadnosti a kvality potravin. Ochanné kultury a jiné antagonisticky působící látky jsou zaváděny jako aditiva s potenciálem biologické konzervace, pro zvýšení mikrobiologické ochrany potravin.

Tradičně jsou používány bakterie mléčného kvašení, které zároveň hrají hlavní a nezbytnou roli ve fermentačních procesech. Celá škála příslušníků skupiny bakterií mléčného kvašení je využívána v mlékárenství, ke konzervaci masa, zeleniny a pekařských výrobků. Právě bakterie mléčného kvašení lze použít jako náhradu mnohých prostředků chemické konzervace v současnosti používaných v potravinářském průmyslu. Specifický antimikrobiálně působící mechanismus bakterií mléčného kvašení zahrnuje především produkci organických kyselin, peroxidu vodíku, oxidu uhličitého a bakteriocinů. Nejznámější producenty těchto antimikrobiálně působících látek najdeme mezi mléčnými streptokoky, laktobacily a laktokoky. Mezi bakte-

Mgr. Marie KAZATELOVÁ, Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, Vysoké učení technické, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Česká republika.
E-mail: kazatelova.marie@email.cz

riociny je nejlépe prozkoumaný nisin produkovaný *Lactococcus lactis*, který je s úspěchem využíván v potravinářství více než 45 let. Protektivní účinky ostatních antimikrobiálně působících látek produkovaných bakteriemi mléčného kvašení jsou také využívány v konzervárenství, přesto a hlavně kvůli zvyšujícím se nárokům zákazníka na kvalitní, netoxické a senzorický vyhovující produkty se však mnohé vědecké týmy zabývají možnostmi využití a zavedení biologické ochrany potravin. Jednou z možností, která se nabízí, je právě využití přirozených produktů metabolismu mikroorganismů, kterými organické kyseliny, peroxid vodíku a bakteriociny jsou.

1. Organické kyseliny, diacetyl, etanol a acetaldehyd

Mezi organické kyseliny s největším antimikrobiálním efektem patří kyselina mléčná, octová a propionová, které jsou tvořeny bakteriemi mléčného kvašení během fermentačních procesů.

Kyseliny obecně vytvářejí nevhodné podmínky pro růst mnoha patogenů a kontaminačních bakterií. Jejich mechanismem účinku je snižování pH prostředí, ovlivnění protonového gradientu cytoplazmatické membrány, okyselení cytoplasmy a zásah do transportu přes cytoplazmatickou membránu. Kyselé prostředí nejen omezuje bakteriální růst, ale také podporuje působení ostatních antimikrobiálních komponentů [1-4].

Kyseliny mají velmi široké spektrum účinku a potlačují růst grampozitivních i gramnegativních bakterií, kvasinek a také plísní.

Kyselina octová má silnější antimikrobiální efekt než kyselina mléčná. Kyselina propionová inhibuje plísně a bakterie [3].

Diacetyl je koncovým produktem metabolismu pyruvátu. Mnoho bakterií mléčného kvašení, včetně leukonostoků, laktokoků, pediokoků a laktobacilů, mohou produkovat diacetyl, ačkoliv produkce je potlačena fermentací hexos. Gramnegativní bakterie, kvasinky a plísně jsou citlivější k účinkům diacetylu než grampozitivní bakterie. Antimikrobiální účinky diacetylu jsou přisuzovány jeho schopnosti podpořit začleňování argininu do stavebních proteinů u gramnegativních bakterií, čímž je ovlivněna jejich tvorba a následné využití. Vysoké koncentrace diacetylu (0,4 mg.ml⁻¹) jsou považovány za antimikrobiální pro většinu mikroorganismů [1, 4].

Diacetyl je považován za významného přispívatele k antimikrobiální aktivitě bakterií mléčného kvašení.

Etanol je koncovým produktem heterofermentativního kvašení bakterií mléčného kvašení. Množství, ve kterém je produkován, je však ve většině případů velmi malé a proto je jeho antimikrobiální příspěvek minimální.

Acetaldehyd, podobně jako etanol, je jedním z možných koncových metabolitů v heterofermentativních fermentacích bakterií mléčného kvašení a je většinou redukován na etanol [5].

2. Peroxid vodíku

Vedle organických kyselin je peroxid vodíku dalším produktem metabolismu, jehož tvorba je spojena s metabolismem laktátu a je produkován při aerobní kultivaci. V přítomnosti kyslíku bakterie mléčného kvašení produkují peroxid vodíku elektronovým transportem pomocí flavinových enzymů. Ze vzniklého peroxidu vznikají agresivní radikály s destruktivní aktivitou pro bakteriální buňku. Výsledný efekt peroxidu vodíku je přisuzován silnému oxidačnímu působení na bakteriální buňky, na zničení nukleových kyselin a buněčných proteinů. Peroxid vodíku může také reagovat s volnými buněčnými komponenty a vytvářet tak další antimikrobiálně aktivní látky [4-7]. Má například schopnost aktivovat laktoperoxidázový systém v čerstvém mléce a ostatní antimikrobiálně aktivní složky.

Peroxid vodíku *in vivo* prokazatelně přispívá k antagonistické aktivitě, i když zatím není zcela objasněno zda je, či není rozkládán enzymovým systémem flavoproteinů či peroxidáz.

3. Oxid uhličitý

Oxid uhličitý je hlavním produktem štěpení hexóz u heterofermentativních mléčných bakterií, utváří anaerobní prostředí a je toxický pro některé aerobní mikroorganismy tím, že znemožňuje schopnost buněčné membrány redukovat a vyrovnávat vnitřní a vnější pH [1, 4]. V nízkých koncentracích může být některými bakteriálními druhy tolerován nebo mít dokonce stimulační efekt [7].

4. Reuterin

Dalším příkladem sekundárního metabolitu, který vykazuje antimikrobiální aktivitu a je produkován příslušníkem bakterií mléčného kvašení, je reuterin. Jeho producentem je *Lactobacillus reutrei*. Je to antimikrobiálně působící látka složená z monomerů, hydratovaných monomerů a cyklických forem hydroxypropionaldehydu, která má široké spektrum účinku na gram-

negativní i grampozitivní mikroorganismy. Reuterin je produkován během anaerobního růstu na směsi glukózy a glycerolu anebo glyceraldehydu. Mechanismus účinku spočívá v inhibici reduktáz proteosyntézy [8].

5. Bakteriociny

Je známo, že celá řada příslušníků bakterií mléčného kvašení produkuje látky proteinové povahy s antimikrobiální aktivitou, které jsou souhrnně nazývány bakteriociny. Bakteriociny jsou přirozeně produkováné malé peptidy s baktericidní aktivitou obvykle na úzké spektrum příbuzných bakterií. Antimikrobiální aktivita bakteriocinů je ovlivněna jejich množstvím, typem a počtem mikroorganismů, podmínkami kultivace a aplikace, pH a teplotou.

Obecným mechanismem jejich účinku je depolarizace buněčné membrány a inhibice syntézy buněčné stěny. Některé mají pouze úzké inhibiční spektrum, jiné jsou širokospektrální jako například nisin [9].

Již několik desetiletí jsou tyto látky centrem pozornosti mnoha výzkumných týmů, a výsledkem jsou objevy a charakterizace mnoha typů bakteriocinů bakterií mléčného kvašení. Produkční kmeny jsou užívány jako přísady ke startovacím kulturám během fermentací za účelem zvýšení bezpečnosti a hygienické kvality potravinářských produktů.

Klasifikace bakteriocinů bakterií mléčného kvašení

Bakteriociny bakterií mléčného kvašení byly rozděleny Kleanhamerem v roce 1993 a poté v roce 1996 přerozděleny Nesem do tří hlavních tříd, které jsou dále děleny na podtřídy A a B. Většina bakteriocinů, které jsou používány jako aditiva v potravinářském průmyslu, patří do druhé skupiny, kromě nisinu [4].

Třída I

Bakteriociny této třídy jsou obecně malé proteiny (19–50 aminokyselin) produkováné bakteriemi. Obsahují velké množství neobvykle se vyskytujících posttranslačně upravených aminokyselin - lantionin (Lan) a β -metyllantionin (MeLan) a jsou proto označovány jako lantibiotika. Nisin patří do lantibiotické rodiny a má statut GRAS (Generally Recognised As Safe) i status FDA (U. S Food and Drug Administration), což povoluje jeho použití jako aditivum v potravinářském průmyslu bez předchozího schvalování. Nisin je produkován *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* a má široké spektrum účinku na grampozitivní bakterie a tepelně rezistentní spóry.

Lantibiotika byla původně dělena do dvou skupin IA a IB [10].

Lantibiotika typu A představují dlouhé flexibilní molekuly s kladným nábojem, které způsobují depolarizaci membrány podobně jako nisin.

Lantibiotika typu B jsou globulární struktury, které zasahují do buněčných enzymatických reakcí (například mersacidin). Navíc některá lantibiotika vyžadují dva oddělené peptidy jako součást své struktury pro zahájení antimikrobiální aktivity. Příkladem je lakticin 3174 [1].

Třída II

Do této třídy jsou zařazeny malé, tepelně stálé peptidy (36–57 aminokyseliny), které jsou členěny do dvou skupin.

Ve třídě IIA jsou zařazeny peptidy aktivní na listerie. Jejich syntéza je řízena vedoucím peptidem, který se odloučí proteolyticky, obvykle po zdvojení glycinu. Příkladem je pediocin PA-1 (jeho producentem je *Pediococcus acidilactici*) [11] a sakacin A (*Lactobacillus sake*) [12], enterocin A (*Enterococcus faecalis* s. *liquefaciens*) [13].

Třidu IIB tvoří bakteriociny vyžadující pro plnou aktivitu dvě součásti (podobně jako u některých lantibiotik), jsou tvořené dvěma různými peptidovými oddíly. Takovým dvousložkovým nemodifikovaným bakteriocinem je například laktacin F (*Lactobacillus acidophilus*) [14] a laktokocin G (*Lactococcus lactis*) [15]. Primární struktura jednotlivých peptidů je odlišná.

Třída III

Do této třídy jsou zařazeny velké, tepelně nestálé, ještě ne příliš charakterizované bakteriociny. Skupina zahrnuje helveticin J (*Lactobacillus helveticus*) [16] a enterolysin jehož producentem je *Enterococcus faecium* [17].

Závěrem lze konstatovat, že antimikrobiální aktivita příslušníků skupiny bakterií mléčného kvašení je většinou v podstatě zajišťována komplexním působením výše uvedených látek, které jsou produkovány jako sekundární metabolity během fermentačních procesů [18-21].

Také mnoho potravinářských produktů, zvláště fermentačně zpracovaných, obsahuje velké množství kmenů produkujících bakteriociny a organické kyseliny, co může být považováno za způsob přirozené ochrany potravinářského produktu. Na základě vlastností bakteriocinů je možné je využít nejen v různých odvětvích potravinářského průmyslu, ale i v průmyslu kosmetickém, farmaceutickém, v medicíně a v zemědělství [22-25]. Jejich aplikace v budoucnosti je předmětem výzkumné činnosti a mnoho nových bakteriocinů teprve čeká na svoje odhalení.

Literature

1. DE VUYST, L. - VANDAMME, E. J.: Bacteriocins of lactic acid bacteria. London : Blackie Academic & Professional, 1994. 536 s.
2. DAVIDSON, P. M. - BRANEN, A. L.: Organic acids. New York : Marcel Dekker, 1993. 306 s.
3. BLOM, H. - MORTVEDT, C.: Antimicrobial substances produced by food-associated microorganisms. Biochemical Society Transactions, 19, 1991, s. 694-698.
4. NAIDU, A.: Natural food Antimicrobial system. Boca Raton, Florida : CRC Press LLC, 2000. 803 s.
5. CONDON, S.: Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiology Reviews, 46, 1987, s. 269-280.
6. MORRIS, J. G.: Oxygene and the obligate anaerobe. Journal of Applied Bacteriology, 40, 1976, s. 229-244.
7. LINDGREN, S. E. - DOBROGOSZ, W. J.: Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. FEMS Microbiology Reviews, 87, 1990, s. 149-163.
8. DOBROGOSZ, W. J. - CASAS, I. A. - PAGANO, G. A. - TALARICO, T. L.: *Lactobacillus reuteri* and enteric microbiota. In: GRUFF, R. - MIDVEDT, T - NORIN, E.: The regulatory and protective role of the normal microflora. New York : Stockton Press, 1989, s. 283-292.
9. ABEE, T. - KROCKEL, L. - HILL, C.: Bacteriocins: mode of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. International Journal of Food Microbiology, 28, 1995, s.169-185.
10. JUNG, G.: Lantibiotics: a survey. In: JUNG, G. - SHAL, H. G.: Nisin and novel antibiotics. Linden : ESCOM Science Publishers, 1991. s. 1-34.
11. HENDERSON, J. T. - CHOPKO, A. L. - WASSENAAR, P. D.: Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactic* PAC-1.0. Archives of Biochemistry and Biophysics, 295, 1992, s. 5-12.
12. HOLCK, A. - AXELSSON, L. - BIRKELAND, S. E. - AUKRUST, T. - BLOM, H.: Purification and amino acids sequence of sakacin A, bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb 706. Journal of General Microbiology, 138, 1992, s. 2715-2720.
13. SLIVA, A. - CARVALHO, A. S. - TEIXEIRA, P. - GIBBS, P. A.: Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. Letters in Applied Microbiology, 34, 2002, s. 77-81.
14. MURIANA, P. M. - KLEANHAMMER, T. R.: Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Applied and Environmental Microbiology, 57, 1991, s. 114-121.
15. NISSEN-MEYER, J. - HOLO, H. - HAVERSTEIN, L. S. - NES, I. F.: A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. Journal of Bacteriology, 174, 1992, s. 5686-5692.
16. JORGER, M. C. - KLEANHAMER, T. R.: Characterization and purification of helveticin J and evidence for chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. Journal of Bacteriology, 167, 1986, s. 439-446.
17. NILSON, T.: Novel enterococcal bacteriocins, optimisation of production, purification, biochemical and genetic characterisation. [PhD thesis.] Oslo : Agricultural University of Norway, 1999. 168 s.
18. CAPLICE, E. - FITZGERALD, G. F.: Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology, 50, 1999, s. 131-149.
19. CLEVELAND, J. - MONTVILLE, T. J. - NES, I. F. - CHIKINDAS, M. L.: Bacteriocins: safe natural for food preservation. International Journal of Food Microbiology, 71, 2001, s. 1-20.
20. ROSSA, P. R. - MORGANA, S. - HILL, C.: Preservation and fermentation: past, present and

- future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 2002, s. 3-16.
21. HOLCK, A. L. - AXELSSON, L.: Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. *FEMS Microbiology Letters*, 115, 1994, s. 143-150.
 22. DAVIDSON, P. M.: Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M. P - Beuchat, L. R. - Montville, T. J. (Ed.): *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington D.C. : ASM Press, 1997, s. 520-556.
 23. RILEY, M. A. - WERTZ, J. E.: Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56, 2002, s. 117-137.
 24. MCAULIFFE, O. - ROSS, R. P. - HILL, C.: Lantibiotics: structure, biosynthesis, and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 2001, s. 285-308.
 25. FOOKS, J. L. - GIBSON, G. R.: In vitro investigation of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 39, 2001, s. 67-75.

Do redakcie došlo 5.12.2002.

Antimicrobial metabolites of lactic acid bacteria

KAZATELOVÁ, M.: *Bull. potrav. Výsk.*, 42, 2003, p. 67-73.

SUMMARY. Lactic acid bacteria produce a wide variety of antimicrobial compounds, antagonistic primary and secondary metabolites. The specific antimicrobial mechanism of lactic acid bacteria includes the production of organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl and the production of bacteriocins. All these compounds produce the inhibitory effect in most cases as a complex composed of the synergistic effects of the individual components.

KEYWORDS: bacteriocins; lactic acid bacteria; antimicrobial metabolites; bacteriocins classification