

# Produkcja bakteriocyn przez bakterie mlekowe

Anna Sip  
Katedra Biotechnologii  
i Mikrobiologii Żywności  
Akademia Rolnicza  
Poznań

## 1. Wprowadzenie

Odkrycie penicyliny przez Fleminga w 1928 r. spowodowało gwałtowny wzrost zainteresowania substancjami antymikrobiologicznymi syntetyzowanymi przez drobnoustroje. W późniejszych badaniach wykazano, że wiele drobnoustrojów produkuje substancje wpływające antagonistycznie na wzrost i rozwój. Substancje te oddziałują na organizmy konkurencyjne, osłabiając je lub niszcząc. Im szersze jest spektrum ich aktywności, tym większe są szanse wytwarzających je drobnoustrojów na przeżycie i zdominowanie zasiedlanego środowiska (1).

Jednymi z ciekawszych metabolitów komórkowych o silnej aktywności antibakteryjnej są bakteriocyny. Są to substancje białkowe o masie cząsteczkowej od kilku do kilkudziesięciu kDa, produkowane przez wiele grup bakterii (tab. 1).

Większość bakteriocyn posiada wąskie spektrum aktywności i działa jedynie na bakterie blisko spokrewnione z wytwarzającymi je organizmami (3). Jednakże, niektóre bakteriocyny są zdolne do oddziaływania na bakterie nie spokrewnionych ze swymi producentami (4).

Zdolność produkcji bakteriocyn jest zwykle cechą szczepową. W obrębie danego gatunku, bakteriocyny mogą być wytwarzane od 1 do 100% szczepów bakterii (1). Przykładowo, zdolność do syntezy bakteriocyn posiada: 75% szczepów *Listeria monocytogenes* (5), 63% szczepów *Lactobacillus acidophilus* (6), 40% szczepów *Escherichia coli* (2), 13% szczepów *Staphylococcus aureus* (7) oraz 4% szczepów *Haemophilis influenzae* (8). Przeciętnie co 13 szczep bakteriacyjny zgromadzony w American Type Culture Collection wykazuje właściwości bakteriocynogenne (9).

TABELA 1  
 RODZAJE BAKTERII ZDOLNYCH DO PRODUKCJI BAKTERIOCYN (1,2)

Bakterie gramodatnie	Bakterie gramujemne
<i>Bacillus</i>	<i>Actinobacillus</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Acetobacter</i>
<i>Carnobacterium</i>	<i>Bacterioides</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Brucella</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Caulobacter</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Citrobacter</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Erwinia</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Listeria</i>	<i>Haemophilus</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Halobacterium</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Niesseria</i>
<i>Propionibacterium Sarcina</i>	<i>Pasteurella</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Proteus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Salmonella</i>
	<i>Serratia</i>
	<i>Shigella</i>
	<i>Yersinia</i>
	<i>Vibrio</i>

Bakteriocyny mogą być wytwarzane na podłożach stałych lub płynnych. Większość bakterii produkuje bakteriocyny na obu typach podłoża (10). Konsystencja środowiska hodowlanego wywiera jednak silny wpływ na efektywność biosyntezy wielu bakteriocyn. Niektóre szczepy bakterii *Lactococcus salivarius* (11), *Lactobacillus plantarum* (2) oraz *Salmonella typhi* (12) produkują bakteriocyny jedynie na podłożach stałych.

Synteza kolicyn oraz kilku innych bakteriocyn bakterii gramujemnych, np. klebocyny, pyrocyny, vibrocyny oraz bakteriocyn *Pseudomonas solanacearum*, indukowana jest przez promieniowanie UV i/lub mitomicynę C (2). Pod wpływem działania promieniowania UV lub mitomicyny C uruchamiana jest również synteza niektórych bakteriocyn bakterii gramodatnich, np. propionicyny PLG-1 (13), laktocyny LP27 (14) oraz kilku bakteriocyn bakterii *Lactobacillus fermentum* (15). Indukujący wpływ na syntezę bakteriocyny wytwarzanej przez bakterie *Bacillus megaterium* 80 ma mitomicyna C (2,10). Za pomocą promieniowania UV możliwe jest także oddziaływanie na poziom produkcji bakteriocyn. Syntezę wielu bakteriocyn indukuje także chloramfenikol, fiolet krystaliczny lub oranż akrydynowy (12).



Produkcja większości bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej i propionowej jest procesem konstytutywnym (2,16). Wydajność biosyntezy niektórych bakteriocyn produkowanych w sposób konstytutywny, np. kazeicyny 80 (17), można zwiększyć 5-7-krotnie poprzez wzbogacenie pożywki hodowlanej w pepton oraz poddanie syntetyzujących je bakterii działaniu mitomycyny C (0,5-1  $\mu\text{g/ml}$ ).

Obecność drobnoustrojów wrażliwych na działanie danej bakteriocyny w środowisku hodowlanym jej producentów może być czynnikiem pobudzającym do efektywniejszej biosyntezy bakteriocyny (18,19). Syntezę laktocyny B przyspiesza o 4-6 godzin wprowadzenie do środowiska hodowlanego komórek wrażliwych na jej działanie (bakterii *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797) oraz regulacja pH. Hughes i Barefoot (20) stwierdzili, że bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797 wpływają w korzystny sposób na produkcję tej bakteriocyny jedynie, wtedy gdy koncentracja ich komórek w kulturze mieszanej z bakteriami *Lactobacillus acidophilus* N2 mieści się w przedziale od  $4 \times 10^6$  do  $1 \times 10^7$  jtk/ml, a pH pożywki utrzymywane jest na poziomie 6,0. Populacja bakterii *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797 o gęstości wyższej niż  $1 \times 10^7$  jtk/ml ogranicza wydajność biosyntezy laktocyny B, gdyż zdominowuje kulturę produkującą ten związek. Obecność bakterii gramdodatnich nie wrażliwych na działanie laktocyny B, wpływa w zbliżony sposób na efektywność jej produkcji. Wyniki badań przeprowadzonych przez Hughesa i Barefoota (20) sugerują, że stymulujący wpływ na produkcję laktocyny B mają substancje o charakterze białkowym, zlokalizowane na powierzchni komórek bakterii gramdodatnich.

Bakteriocyny są metabolitami zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowymi. Większość bakteriocyn jest uwalniana do środowiska hodowlanego podczas wzrostu producentów. Niektóre bakteriocyny są silnie związane z ich powierzchnią (2). Stopień adsorpcji wielu bakteriocyn do powierzchni wytwarzających je bakterii zależy od stężenia jonów wodorowych. W środowisku o odczynie zbliżonym do obojętnego bakteriocyny są związane najsilniej z wytwarzającymi je organizmami. Wraz ze wzrostem stężenia jonów wodorowych w środowisku maleje stopień ich adsorpcji do komórek producentów (tab. 2).

TABELA 2

WPLYW pH NA STOPIEŃ ADSORPCJI WYBRANYCH BAKTERIOCYN DO POWIERZCHNI SWYCH PRODUCENTÓW

Bakteriocyna	Producent	pH		Literatura
		max. adsorpcji	min. adsorpcji	
pediocyna AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i> LB 42-923	6,0 - 6,5	1,5 - 2,0	(21)
nizyna	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	6,0	$\leq 3,0$	(21)
sakacyna A	<i>Lactobacillus sake</i> Lb 706	5,5	2,0	(21)
leukonocyna Lcm1	<i>Lactobacillus carnosum</i> Lm1	$\geq 5,5$	$\leq 3,0$	(21)
pediocyna PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> UL5	5,5	2,0	(22)
karnocyna CP5	<i>Carnobacterium piscicola</i> CP5	5,0 - 5,5	2,0	(23)
termofilina 81	<i>Lactococcus thermophilus</i> 81	6,0	2,0	(24)



Yang i in. (21) wykazali, że ponad 90% nizyny, pediocyny AcH i leukocynocyny Lcm1 oraz 44% sakacyny A można oderwać z powierzchni komórek inaktywowanych termicznie (70°C, 25 min) po 2 godzinach inkubacji w 100 mM roztworze NaCl o pH 2 – 3 w temperaturze 4°C. W analogicznych warunkach z powierzchni bakterii *Pediococcus acidilactici* UL5 desorpcji ulega jedynie 3% pediocyny PA-1. Daba i in. (22) stwierdzili, że przedłużenie czasu inkubacji biomasy bakterii *P. acidilactici* UL5 z 2 do 24 godzin pozwala na zwiększenie ilości bakteriocyny oderwanej z ich powierzchni do 10%. Oznacza to, że poprzez umiejętne manipulowanie warunkami środowiska zewnętrznego istnieje możliwość oddziaływania na przebieg procesów adsorpcji i desorpcji wielu bakteriocyn do/z powierzchni wytwarzających je bakterii.

Skład środowiska hodowlanego wpływa na stosunek ilości bakteriocyn wydzielanych przez bakterie na zewnątrz swych komórek (do pożywek hodowlanych) do ilości bakteriocyn związanych z ich powierzchnią. Przykładowo, 14,4% bakteriocyny wytwarzanej przez bakterie *P. acidilactici* UL5 jest wydzielanej do płynu hodowlanego podczas hodowli prowadzonych na pożywce MRS wzbogaconej w 0,1% Tweenu 80, natomiast 18,6% gdy do hodowli stosuje się pożywkę MRS pozbawioną Tweenu 80. Adsorpcja nizyny do komórek bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* hodowanych w sposób ciągły zależy od koncentracji laktozy w pożywce. Petitdemenge i in. (25) stwierdzili, że bakteriocyna ta nie adsorbuje się do ich powierzchni, gdy stężenie laktozy w pożywce wynosi 3 g l<sup>-3</sup>. Wraz ze wzrostem stężenia laktozy w środowisku hodowlanym maleje ilość nizyny uwalnianej z komórek bakterii *L. lactis* subsp. *lactis*. Przy koncentracji laktozy 30 g/l ok. 76% nizyny występuje w formie związanej z ich powierzchnią. Niektóre bakteriocyny nie są uwalniane z powierzchni wytwarzających je bakterii podczas hodowli (26). Skład pożywki hodowlanej determinuje również efektywność ekstrakcji bakteriocyn. Bakteriocyna zaadsorbowana do powierzchni bakterii *P. acidilactici* UL5 jest z niej ekstrahowana z najwyższą wydajnością, gdy podłożem hodowlanym jest pożywka MRS z dodatkiem 0,1% Tweenu 80 (21,22).

Skład środowiska hodowlanego wpływa także na wrażliwość bakterii na działanie bakteriocyn. Obecność sacharozy w pożywce chroni bakterie *Lactococcus salivarius* przed działaniem bakteriocyny produkowanej przez *Lactococcus mutans* (27,28). Bakteriocyny o kationowym charakterze często wiążą się z grupami hydroksylowymi cząsteczek agaru. Hoover i Harlander (16) stwierdzili, że bakteriocyny związane z cząsteczkami agaru posiadają gorsze właściwości dyfuzyjne, stąd też słabiej hamują wzrost bakterii posiadających receptory zdolne do ich przyłączenia. Bakterie wrażliwe na antagonistyczne działanie kolicyny V, I oraz B są bardziej odporne na ich działanie w środowisku zawierającym żelazo. Konisky (29) stwierdził, że jony żelaza blokują receptory wiążące kolicyny poprzez co ograniczają możliwość ich działania. Jony innych metali również modyfikują wrażliwość bakterii na antymikrobiologiczną aktywność bakteriocyn. Kationy Na, K, Ca oraz Mg inhibują adsorpcję wielu bakteriocyn do komórek posiadających wiążące je receptory. Rekhif i in. (30) wykazali, że od 50 do 100 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> oraz 100 mmol/l KCl i NaCl redukuje o 50% adsorpcję plantarycyny SA6 do komórek bakterii



*Lactobacillus plantarum* DSM 20174. Ograniczenie zdolności plantarycyny SA6 do wiązania się z komórkami wrażliwymi na jej działanie zwiększa przeżywalność atakowanych przez nią bakterii. Na efektywność adsorpcji bakteriocyn do komórek bakterii pozbawionych odporności na nie wpływa także pH pożywek hodowlanych. Prawie 100% bakteriocyn adsorbuje się do nich w środowisku o pH od 4 do 7, natomiast jedynie 50% poniżej pH 3. W warunkach alkalicznych zdolność bakteriocyn do wiązania się z komórkami wrażliwymi na ich działanie jest najniższa. Przykładowo, przy koncentracji jonów OH odpowiadającej pH 9, zaledwie 25% plantarycyny SA6 ulega adsorpcji do komórek bakterii *Lactobacillus plantarum* DSM 20174 (30).

Wiele bakteriocyn, z uwagi na swój hydrofobowy charakter, wykazuje tendencję do zbijania się w agregaty oraz łączenia się z innymi cząsteczkami obecnymi w płynach hodowlanych. Masa cząsteczkowa zagregowanych makroczaścetek jest wielokrotnie wyższa od masy pojedynczych cząsteczek bakteriocyn (tab. 3).

TABELA 3  
BAKTERIOCYN TWORZĄCE AGREGATY I KOMPLEKSY Z INNYMI CZĄSTECZKAMI

Bakteriocyna	Producent	Masa cząsteczkowa [kDa]		Literatura
		surowego preparatu	czystej molekuly	
laktacyna S	<i>Lactobacillus sake</i> L45	100	3,7	(31)
laktacyna B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> N2	100	6,2	(32)
laktacyna F	<i>Lactobacillus acidilactici</i> 11088	180	2,5	(33)
helwetycyna J	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	300	37	(34)
laktocyna 27	<i>Lactobacillus helveticus</i> LP27	>200	12,4	(14)
pediocyna SJ-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> SJ-1	80 - 150	ok. 4	(35)
propionicyna PLG-1	<i>Propionibacterium thoenii</i> P127	150	10	(36)

Mortvedt i in. (31) stwierdzili, że laktacyna S występuje w płynach hodowlanych w formie di- i trimerów. Bakteriocyna ta łączy się także z innymi obecnymi w nich makroczaścetkami, tworząc kompleksy o masie ok. 100 kDa. Tendencję do tworzenia makroczaścetkowych kompleksów z lipidowymi oraz węglowodanowymi komponentami pożywek hodowlanych wykazuje także laktacyna B (32) oraz helwetycyna J (34). Muriana i Klaenhammer (33) wykryli, że laktacyna F występuje w supernatantach płynów hodowlanych bakterii *Lactobacillus acidophilus* 11088 w formie kompleksów z lipidami i sialoglikoproteinami. Zdolność do tworzenia agregatów wykazuje także pediocyna SJ-1. Bakteriocyna ta jest izolowana z płynów hodowlanych w postaci monomerów o masie cząsteczkowej 3,8 kDa oraz agregatów o masie dochodzącej do 150 kDa (35). Silnej agregacji ulega także propionicyna PLG-1 (36) oraz laktocyna 27



(14,37). Zdolność bakteriocyn do tworzenia makrocząsteczkowych agregatów utrudnia ich separację z płynów hodowlanych z zastosowaniem technik ultrafiltracyjnych. W badaniach przeprowadzonych przez Murianę i Klaenhammera (33) wykazano, że agregaty laktacyny F można rozbić za pomocą związków powierzchniowo czynnych o charakterze niejonowym, anionowym lub dipolarnym. Obróbka surowych preparatów laktacyny F niektórymi detergentami zwiększa ponadto ich antymikrobiologiczną aktywność (tab. 4). Przykładowo, pod wpływem działania Nonidetu P-40 lub SDS agregaty laktacyny F ulegają dezagregacji do związków o 4-krotnie wyższej od nich aktywności. Poprzez zastosowanie SDS możliwe jest również rozbięcie makrocząsteczkowych kompleksów do laktocyny 27 (14) oraz helwetycyny J (34). Aktywność tych bakteriocyn po obróbce SDS nie zmienia się. Zdolność do rozbijania agregatów bakteriocyn posiada również mocznik. Barefoot i Klaenhammer (32) stwierdzili, że skutecznie rozbija on makrocząsteczki laktacyny B. Związek ten, w następstwie dezagregującego działania, zwiększa aktywność tej bakteriocyny o 200 razy. Makrocząsteczkowe agregaty bakteriocyn można rozbijać również w sposób fizyczny, poddając ultrafiltracji natywne ich preparaty. W wyniku ultrafiltracji cząsteczki laktacyny F obecne w supernatancie płynu hodowlanego bakterii *Lactobacillus acidophilus* 11088 ulegną dezagregacji. Podczas tego procesu zostają jednocześnie odblokowane i uwolnione dodatkowe jednostki aktywności tej bakteriocyny. Muriana i Klaenhammer (33) stwierdzili, że produkty ultrafiltracji laktacyny F posiadają 14-krotnie wyższą aktywność od płynów, z których są otrzymywane.

TABELA 4  
WPLYW ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH NA AKTYWNOŚĆ LAKTACYN F (33)

Detergenty	Aktywność laktacyny F (AU/ml)	
	po obróbce detergentem	brak detergenta
kontrola (bez detergentów)	3,200	0
niejonowe		
• Triton X-100	3,200	0
• Brij 35	6,400	0
• Tween 20	6,400	0
• Tween 80	6,400	0
• Lubrol PX	6,400	0
• Nonidet P-40	12,800	0
anionowe		
• kwas deoksycholowy	6,400	0
• kwas glikocholowy	6,400	0
• SDS	12,800	100
dipolarne		
• CHAPS	3,200	0



## 2. Czynniki determinujące efektywność produkcji bakteriocyn

Optymalne warunki dla produkcji każdej bakteriocyny są bardzo specyficzne, a wydajność biosyntezy bakteriocyn zależy od składu i konsystencji pożywki hodowlanej, temperatury i pH podłoża, koncentracji kwasu mlekowego w podłożu, fazy wzrostu bakteriocynogennych bakterii, czasu hodowli (inkubacji), koncentracji biomasy, szybkości wzrostu producentów bakteriocyn oraz metody hodowli.

Warunki optymalne dla produkcji wybranych bakteriocyn syntetyzowanych przez bakterie hodowane metodą okresową przedstawiono w tabeli 5.

### 2.1. Skład i konsystencja pożywki hodowlanej

Większość bakterii fermentacji mlekowej efektywnie syntetyzuje bakteriocyny na złożonych pożywkach, bogatych w składniki odżywcze i sole mineralne, takich jak pożywka MRS, Ellikera (ELB), M17 i APT (54). Niektóre bakteriocyny są produkowane z wysoką wydajnością również na prostych podłożach. Strasser de Saad i in. (55) stwierdzili, że bakterie *Pediococcus pentosaceus* N5p efektywnie syntetyzują pediocynę N5p na pożywce zawierającej w swym składzie: sok pomidorowy, trypton, ekstrakt drożdżowy oraz Tween 80. Do jej produkcji jest także wykorzystywany sok winogronowy rozcieńczony wodą w stosunku 1:8, wzbogacony ekstraktem drożdżowym (10 g/l). Poziom produkcji pediocyny N5p na takiej pożywce jest o 30% wyższy od osiąganego na bulionie z soku pomidorowego (38). Bakterie *Propionibacterium thoenii* P127 hodowane na pożywce BM:CSL, będącej mieszaniną melasy i namoku kukurydzianego (3:1), także efektywnie produkują bakteriocynę (propionicynę PLG-1). Glatz i in. (39) wykazali, że wydajność jej biosyntezy na tym podłożu jest 5-krotnie wyższa od otrzymywanej na klasycznej pożywce Rogosa. Pediocyna AcH może być również efektywnie syntetyzowana na prostej pożywce TGE, której komponentami są takie składniki jak trypton, glukoza i ekstrakt drożdżowy. Ray i in. (42) stwierdzili, że bakterie *Pediococcus acidilactici* H hodowane na niej produkują o 15% więcej pediocyny AcH niż na złożonej pożywce MRS. Pożywka TGE, po zbuforowaniu i wzbogaceniu w niacynę, kwas pantotenowy oraz biotynę, gwarantuje efektywną produkcję nizyny, leukonocyny Lcm1 oraz sakacyny A (41). Bakterie zdolne są również do syntezy bakteriocyn w produktach żywnościowych. Wydajność biosyntezy bakteriocyn w żywności jest jednak znacznie niższa od otrzymywanej na pożywkach laboratoryjnych. W związku z tym żaden artykuł konsumpcyjny nie znalazł zastosowania jako surowiec do ich produkcji (10,19,56,57).

Skład środowiska hodowlanego wywiera silny wpływ na wydajność biosyntezy bakteriocyn. Z licznych prac wynika, że zawartość węglowodanów, związków azotowych, soli mineralnych oraz Tweenu 80 w pożywkach stosowanych do hodowli bakteriocynogennych bakterii determinuje efektywność produkcji tej grupy związków.



TABELA 5  
OPTIMALNE WARUNKI DO PRODUKCJI NIEKTORYCH BAKTERIOCYN W HODOWLACH OKRESOWYCH

Bakteriocyna	Optimum produkcji				Literatura
	pożywka	temperatura [°C]	pH	faza wzrostu producenta	
1	2	3	4	5	6
pediocyna N5p	na bazie soku winogronowego	30	7,5 pocz.	koniec fazy logarytmicznej	(55)
propionicyna PLG-1	melasa + wytłoki kukurydziane (3:1)	32	7,0 const	brak danych	(39)
nizyna	NLB	32	7,0 const	koniec fazy stacjonarnej	(36)
	Elликera (50 g laktozy)	30	5,5 const	koniec fazy logarytmicznej	(25)
	CM	30	6,8 const	koniec fazy logarytmicznej	(40)
	TGE	30	6,8 pocz., 5,8 końc.	koniec fazy logarytmicznej	(41)
pediocyna AcH	TGE	37	6,5 – 6,8 pocz. 3,6 – 3,7 końc.	początek fazy stacjonarnej	(42)
sakacyna A	TGE	30	6,8 pocz., 4,5 końc.	początek fazy stacjonarnej	(41)
leukonocyna Lcm1	TGE	25	5,0 const	początek fazy stacjonarnej	(41)
plantarycyna BN	BHI + agar	15	7,9 pocz.	koniec fazy logarytmicznej	(43)
	APT	30	bez kontroli	koniec fazy logarytmicznej	(43)
bawarycyna MN	BHI + agar	30	6,5 pocz.	koniec fazy logarytmicznej	(43)
	APT + 3 g ekstraktu wołowego	30	6,0 const	koniec fazy logarytmicznej	(44)
pediocyna A	BHI + agar	30	6,15 – 7,9 pocz.	koniec fazy logarytmicznej	(43)
	BBL-dekstranoza + 1% glukoza	30	bez kontroli	koniec fazy logarytmicznej	(43)
leuonocyna S	ATP	30	6,0 pocz.	koniec fazy logarytmicznej	(9)
	APT	30	7,0 const	początek fazy stacjonarnej	(45)
enterocyna DPC1146	M17	37	5,5 const	początek fazy stacjonarnej	(46)
enterocyna 900	zmodyfikowana pożywka MRS	30	6,0 – 9,0 const	koniec fazy logarytmicznej	(47)
pediocyna LV 61	D-MRS	25	8,0 – 9,0 pocz. lub 6,5 const	początek fazy stacjonarnej	(48)
brewicyna 286	MRS	20	6,2 pocz.	koniec fazy logarytmicznej	(49)
laktacyna F	MRS	37	7,0 const	koniec fazy logarytmicznej	(33,50)



1	2	3	4	5	6
karnocyna	MRS	25	6,5 pocz.	początek fazy stacjonarnej	(51)
laktacyna B	MRS	20	6,0 const	koniec fazy logarytmicznej	(6)
helwetycyna V-1829	MRS	37	5,5 const	koniec fazy logarytmicznej	(52)
helwetycyna J	MRS	37	5,5 const	koniec fazy logarytmicznej	(34)
leucokocyna TA18a	MRS	25 - 30	6,0 - 6,5 const	koniec fazy logarytmicznej	(53)
leucokocyna TA54a	MRS	25	6,0 - 6,5 const	koniec fazy logarytmicznej	(53)
leucokocyna TA27c	MRS	30	6,0 - 6,5 const	koniec fazy logarytmicznej	(53)
leucokocyna LA7a	MRS	30	6,0 - 6,5 const	koniec fazy logarytmicznej	(53)
leucokocyna 44C71b	MRS	30	6,0 - 6,5 const	koniec fazy logarytmicznej	(53)
saliwacyna 140	MRS + agar + 1% CaCl <sub>2</sub>	37	7,5 - 8,5 pocz.	brak danych	(11)



Poziom produkcji większości bakteriocyn zależy od stężenia węglowodanów w środowisku hodowlanym. Obecność glukozy w pożywkach stosowanych do produkcji wielu bakteriocyn jest niezbędna. Wraz ze wzrostem koncentracji glukozy w bulionach hodowlanych rośnie poziom produkcji tych bakteriocyn. Ray i in. (42) stwierdzili, że konsekwencją zwiększenia koncentracji glukozy w pożywce TGE z 10 do 20 g/l jest wyższa produkcja pediocyny AcH. Podwojenie stężenia glukozy w buforowanej pożywce TGE powoduje zwiększenie wydajności biosyntezy nizyny, leukococyny Lcm1 oraz sakacyny A (41). Zbyt wysoka koncentracja glukozy w podłożach wpływa jednak w negatywny sposób na zdolność bakterii do wzrostu i produkcji bakteriocyn. Parente i in. (46) stwierdzili, że koncentracja glukozy wyższa niż 20 g/l hamuje wzrost bakterii *Enterococcus faecium* DPC 1146 oraz obniża ilość wytwarzanej przez nie bakteriocyny (enterocyny 1146). Stężenie glukozy wpływa także na wzrost bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* oraz na ich nizynotwórcze właściwości. Poziom produkcji nizyny jest najwyższy na pożywce zawierającej 10 – 20 g/l tego węglowodanu (58). Niektóre bakterie są zdolne do wzrostu i produkcji bakteriocyn na pożywkach pozbawionych glukozy. Głównym źródłem węgla w wielu pożywkach stosowanych do hodowli bakteriocynogennych bakterii jest sacharoza. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że od jej koncentracji zależy poziom produkcji wielu bakteriocyn. De Vuyst i Vandamme (40) stwierdzili, że zwiększenie koncentracji sacharozy w pożywce CM z 10 do 20 g/l zwiększa poziom produkcji nizyny o 20% oraz gęstość populacji syntetyzujących ją bakterii o 150%. Koncentracja sacharozy wyższa niż 40 g/l redukuje tempo wzrostu bakterii *L. lactis* subsp. *lactis* oraz ogranicza aktywność nizyny. Wyższe początkowe stężenie sacharozy w pożywce przyspiesza produkcję nizyny pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu jej producentów oraz zwiększa jej stabilność podczas fazy stacjonarnej. Biorąc pod uwagę to, że geny struktury nizyny oraz fermentacji sacharozy są zlokalizowane w jednym plazmidzie można przypuszczać, że procesy ich ekspresji są powiązane ze sobą w sposób genetyczny (40). W skład wielu pożywek przeznaczonych do produkcji bakteriocyn wchodzi również laktoza. Jej koncentracja, podobnie jak zawartość innych węglowodanów, wpływa na wydajność produkcji bakteriocyn. Aktywność nizyny podczas hodowli ciągłych przy  $D = 0,25/h$  rośnie wraz ze wzrostem początkowej koncentracji laktozy w pożywce Ellikera. Szybkość produkcji nizyny osiąga wartość maksymalną przy stężeniu laktozy 30 – 35 g/l i stopniowo maleje powyżej tej wartości. Zawartość laktozy wyższa niż 40 g/l silnie ogranicza wzrost bakterii *L. lactis* subsp. *lactis* oraz ich zdolność do syntezy nizyny (25).

Istotną rolę w biosyntezie bakteriocyn odgrywa skład aminokwasowy pożywek hodowlanych. Poziom produkcji nizyny zależy od zawartości seryny, proliny, cysteiny oraz cystyny w środowisku hodowlanym (59). Petitdemange i in. (25) stwierdzili, że dodatek treoniny, seryny i cysteiny do pożywki Ellikera redukuje produkcję tej bakteriocyny o połowę oraz obniża koncentrację biomasy wytwarzających ją bakterii z 1,52 do 1,22 g s.m./l. Równoczesne wprowadzenie do pożywki prekursorów lantioniny i  $\beta$ -metylolantioniny, tj. cysteiny i cystyny, poprawia wydajność produkcji nizyny o 11%. Zawartość



aminokwasów w podłożach determinuje również efektywność produkcji innych bakteriocyn, na przykład bakteriocyn syntetyzowanych przez rodzaj *Clostridium* (60).

Obecność peptonu w pożywkach stosowanych do produkcji wielu bakteriocyn jest niezbędna. Przykładowo, bakterie *Carnobacterium piscicola* LV61 (48), *Carnobacterium divergens* V41 (61) oraz *Pediococcus acidilactici* H (41) nie rosną na pożywkach pozbawionych tego składnika. Obecność peptonu wpływa także na zdolność bakterii do biosyntezy bakteriocyn. Niektóre bakterie nie wykazują właściwości bakteriocynogennych na pożywkach, w których brakuje peptonu (47,48). Dodatek dializowanego peptonu do pożywek może wyraźnie poprawić wydajność biosyntezy bakteriocyn. Rammelsberg i in. (17) dostrzegli, że składnik ten zwiększa ponad dwukrotnie efektywność produkcji kazeicyny 80.

Stężenie ekstraktu drożdżowego w podłożu wpływa na wydajność biosyntezy licznych bakteriocyn. Poziom produkcji enterocyny 1146 jest wyższy w środowisku o wyższej koncentracji tego składnika (54). Pucci i in. (62) stwierdzili, że zwiększenie zawartości ekstraktu drożdżowego w pożywce MRS z 5 do 7% poprawia wydajność produkcji pediocyny PA1. Dodatek ekstraktu drożdżowego w ilości 3 g/l do pożywki APT w korzystny sposób wpływa również na produkcję bawarycyny MN (44). Poprzez wzbogacenie pożywki serwatkowej, MRS oraz Ellikera w ekstrakt drożdżowy możliwe jest także zwiększenie poziomu produkcji mesenterocyny 5 (63). Ekstrakt drożdżowy poprawia także zdolność bakterii *Staphylococcus* sp. (12) oraz bakterii należących do gatunku *Streptococcus mutans* (27) do produkcji bakteriocyn.

Innym ważnym czynnikiem determinującym efektywność produkcji bakteriocyn jest zawartość soli mineralnych w pożywkach hodowlanych. Przykładowo, dodatek siarczanu Mg do pożywki Ellikera poprawia wydajność biosyntezy nizyny w hodowlach ciągłych (25). Obecność soli magnezowych w pożywce TGE warunkuje wysoką wydajność produkcji pediocyny AcH (41). Sole Mg w korzystny sposób wpływają również na produkcję bakteriocyny wytwarzanej przez bakterie *Bacillus megaterium* (64). Niektóre sole mineralne posiadają właściwości buforujące i podczas hodowli okresowych bez regulacji pH chronią środowisko hodowlane przed gwałtownym zakwaszeniem. Poprzez zdolność do oddziaływania na odczyn podłoży stosowanych do hodowli bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej, związki te wpływają na ilość wytwarzanych przez nie bakteriocyn. Yang i Ray (41) stwierdzili, że wprowadzenie do bulionu TGE octanu sodu, cytrynianu sodu i fosforanu potasu zwiększa wydajność biosyntezy nizyny, sakacyny A oraz leukonocyny Lcm1. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że składniki te utrzymują odczyn pożywki TGE na poziomie zbliżonym do optymalnego dla produkcji wspomnianych bakteriocyn (pH 4,5-5,8). Dodatek octanu, cytrynianu lub fosforanu do pożywki TGE wpływa także na efektywność produkcji pediocyny AcH. Poziom produkcji tej bakteriocyny na pożywce TGE wzbogaconej w składniki buforujące jest wyraźnie niższy od otrzymywanego na pożywce nie zbuforowanej (41) Yang i in. (21) dostrzegli, że buforujące właściwości octanu uniemożliwiają obniżenie odczynu pożywki TGE do poziomu, przy którym



proces aktywacji pediocyny AcH przebiega najefektywniej (pH 3,6-3,7). Kozłova i in. (65) oraz de Vuyst i in. (66) stwierdzili, że obecność fosforanów wpływa także na poziom produkcji nizyny. Podczas hodowli okresowych bez regulacji pH bakteriocyna ta jest produkowana w większych ilościach na podłożach o wyższej koncentracji  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Efektywność produkcji nizyny syntetyzowanej podczas hodowli okresowych z kontrolowanym pH nie zależy natomiast od stężenia fosforanów. Sugeruje to, że korzystny wpływ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na produkcję nizyny jest następstwem jego buforującego działania. Zawartość octanów, cytrynianów i fosforanów w podłożach stosowanych do hodowli bakteriocynogennych bakterii immobilizowanych w kulkach alginianowych jest niewskazana. Wan i in. (49) stwierdzili, że składniki te uszkadzają strukturę żeli alginianowych i powodują wypływ z nich bakterii. Dodatek  $\text{CaCl}_2$  do pożywki MRS pozbawionej soli kwasu octowego, cytrynowego i fosforowego poprawia fizyczną stabilność kulek alginianowych. Wpływ węglanu wapnia na poziom produkcji bakteriocyn syntetyzowanych przez bakterie immobilizowane w kulkach alginianowych nie został jak dotąd określony.

Obecność Tweenu 80 w pożywkach hodowlanych warunkuje wysoką wydajność biosyntezy wielu bakteriocyn. Hout i in. (67) stwierdzili, że efektywność produkcji bakteriocyny syntetyzowanej przez bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* rośnie wraz ze wzrostem jego koncentracji w podłożu. Poziom produkcji tej bakteriocyny na pożywkach zawierających 1% Tweenu 80 jest czterokrotnie wyższy od osiąganego na podłożach pozbawionych tego składnika. Tween 80 w korzystny sposób wpływa także na biosyntezę karnocyny LA44a. Van Laack i in. (51) stwierdzili, że wydajność jej produkcji jest wyraźnie niższa na pożywce MRS pozbawionej Tweenu 80. Usunięcie Tweenu 80 z pożywek hodowlanych ogranicza również efektywność produkcji mesenterocyny 5 (22) oraz enterocyny 900 (47). Tween 80 najprawdopodobniej w następstwie modyfikowania przepuszczalności błon komórkowych bakterii stymuluje sekrecję wytwarzanych przez nie bakteriocyn (68). Obecność Tweenu 80 w pożywkach stosowanych do produkcji niektórych bakteriocyn jest niezbędna. Przykładowo bakterie *Lactobacillus curvatus* FS47 produkują kurwatycynę FS47 jedynie w środowisku zawierającym Tween 80. Związek ten może także wpływać na aktywność bakteriocyn. Meyer-Harting i in. (12) stwierdzili, że zwiększa on dziesięciokrotnie aktywność laktokokcyny G. Jego obecność w supernatantach płynów hodowlanych bakterii *Lactobacillus acidophilus* 11088 poprawia właściwości antymikrobiologiczne zawartej w nich laktacyny F (33). Związek ten prawdopodobnie stabilizuje również aktywność bakteriocyn. Nie zawsze jednak obecność Tweenu 80 w pożywkach hodowlanych jest pożądana. Związek ten bowiem działa destrukcyjnie na niektóre bakteriocyny i wyraźnie redukuje ich aktywność. Przykładowo 0,01% Tweenu 80 silnie ogranicza antybakteryjną aktywność pediocyny A (69) oraz laktocyny S (31). Obecność Tweenu 80 w pożywkach stosowanych do hodowli bakteriocynogennych bakterii może mieć także negatywny wpływ na przebieg i wydajność oczyszczania ich bakteriocyn (70). Tween 80 z uwagi na tendencję do reagowania z siarczanem amonu utrudnia oczyszczanie wielu bakteriocyn (33). Van Laack i in. (51) zalecają, jeśli istnieje taka możliwość, prowadzenie ho-



dowli bakteriocynogennych bakterii na podłożach pozbawionych tego składnika.

Wiele innych składników również wpływa na poziom produkcji bakteriocyn. Dodatek witamin poprawia wydajność produkcji pediocyny AcH. Yang i Ray (41) wykazali, że wzbogacenie bulionu TGE w kwas pantotenowy, niacynę i biotyne zwiększa efektywność jej produkcji o 27%.  $\beta$ -glicerofosforan wprowadzony do pożywek zawierających glukozę, trypton, ekstrakt drożdżowy i Tween 80, stymuluje produkcję laktokokcyny A i D (54). Dodatek 4% NaCl do pożywki MRS w korzystny sposób wpływa na wydajność produkcji plantarycyny S. Jimenez-Diaz i in. (71) sugerują, że związek ten jest także promotorem syntezy plantarycyny T.

Czynnikiem wpływającym na efektywność biosyntezy niektórych bakteriocyn jest konsystencja środowiska hodowlanego. Poziom produkcji bakteriocyn wytwarzanych przez *Staphylococcus epidermis* na podłożu półstałym jest 20-krotnie wyższy od uzyskiwanego na podłożu płynnym (72). Plantarycyna BN, bawarycyna MN, pediocyna A (43), propionicyna PLG-1 (13,36) oraz bakteriocyny produkowane przez paciorkowce, izolowane z jamy ustnej (73), są również wytwarzane z wyższą wydajnością na podłożach zestalonych. Hoover i Harlander (16) sugerują, że większa efektywność produkcji niektórych bakteriocyn na podłożach stałych jest następstwem obecności w nich składników żelujących, takich jak dekstran, skrobia lub agar.

## 2.2. Temperatura

Temperatura hodowli wpływa na efektywność biosyntezy bakteriocyn oraz na ich stabilność w środowisku hodowlanym. W pierwszym rzędzie determinuje ona szybkość rozmnażania bakteriocynogennych bakterii. Większość bakterii produkuje bakteriocyny w szerokim zakresie temperatur. Przykładowo, bakterie *Pediococcus acidilactici* H syntetyzują bakteriocynę w środowisku o temperaturze od 4 do 37°C (42), bakterie *Carnobacterium piscicola* JG126 w zakresie temperatur od 1 do 30°C (48), natomiast bakterie *Carnobacterium piscicola* CP5 w przedziale od 4 do 30°C (23). Optymalna temperatura dla produkcji bakteriocyn jest zwykle niższa od temperatury optymalnej dla wzrostu wytwarzających je bakterii (16,24). Wydajność biosyntezy bakteriocyn stopniowo maleje poniżej tej temperatury. Niektóre bakterie w niskich temperaturach produkują równe ilości bakteriocyn do wytwarzanych w temperaturach optymalnych dla ich produkcji. Szybkość produkcji bakteriocyn w tych temperaturach jest jednak niższa niż w temperaturze optymalnej. Przykładowo, piscikolina 126 osiąga maksymalną aktywność w środowisku hodowlanym w temperaturach: 16°C po 2 dniach, 9°C po 3 dniach, 4°C po 7 dniach oraz 1°C po 9 dniach (57). Wiele bakterii w temperaturach wyższych od temperatury optymalnej dla swego wzrostu rośnie, lecz nie produkuje bakteriocyn (16,24,42,48). Temperatura hodowli wpływa także na stabilność bakteriocyn w środowisku hodowlanym. Przykładowo, straty aktywności piscikocyny V1 oraz divercyny V41 podczas fazy stacjonarnej są niższe w temperaturze 20 niż 30°C. Jest to najprawdopodobniej rezultatem wpływu tem-



peratury na produkcję enzymów proteolitycznych oraz ich aktywności w środowisku hodowlanym (74,75).

### 2.3. pH pożywki

Wydajność produkcji bakteriocyn oraz ich stabilność w środowisku hodowlanym zależą od pH. Wysokie pH początkowe bulionów hodowlanych warunkuje efektywną biosyntezę większości bakteriocyn. Piscikolina 126 podczas hodowli okresowych bez regulacji pH, prowadzonych na pożywkach o pH początkowym 8,0 – 9,0, jest produkowana z maksymalną wydajnością. Niskie pH początkowe ogranicza jej produkcję. W środowisku, którego pH początkowe jest niższe niż 5,5, biosynteza tej bakteriocyny zostaje całkowicie zahamowana (48). Niskie pH początkowe hamuje również produkcję enterocyny 900. Bakterie *Enterococcus faecium* BFE900 nie są zdolne do jej biosyntezy na pożywce MRS o pH początkowym niższym niż 6,0, natomiast efektywnie ją produkują, gdy pH początkowe mieści się w zakresie od 6,0 do 10,0 (47). Odczyn początkowy pożywki wpływa również na produkcję pediocyny N5p. Jej aktywność osiąga wartość maksymalną podczas hodowli prowadzonych na pożywce z soku winogronowego o pH początkowym 7,5 (38). Bawarycyna MN oraz pediocyna A są produkowane na pożywkach o pH początkowym od 5,2 do 7,9. Wydajność biosyntezy pediocyny A jest najwyższa przy pH 6,15-7,9, natomiast bawarycyny MN przy pH 6,5. Optymalnym pH początkowym dla produkcji plantarycyny BM jest pH 7,9 (43). Wysokie pH początkowe pożywki jest również niezbędne dla produkcji salicyny 140. Bakteriocyna ta jest syntetyzowana przez bakterie *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinii* T140 w najwyższych ilościach, gdy pH początkowe pożywek mieści się w przedziale od 7,5 do 8,5 (11). Kwaśny odczyn początkowy środowiska hodowlanego uniemożliwia również biosyntezę laktacyny B (32) oraz laktacyny F (50).

Silny wpływ na efektywność produkcji bakteriocyn wywiera również pH końcowe płynów hodowlanych. Pediocyna AcH jest produkowana w niewielkich ilościach w bulionie TGE, gdy jego pH końcowe jest wyższe niż 5,0. Jej produkcja jest natomiast największa przy pH końcowym 3,7. Niskie pH końcowe jest niezbędne do posttranslacyjnej modyfikacji tej bakteriocyny oraz prawdopodobnie również do uwolnienia jej z powierzchni komórek producentów (21,41,42). Efektywność produkcji nizyny, leukonocyny Lcm1 oraz sakacyny A zależy także od pH końcowego pożywki TGE. Bakteriocyny te, podobnie jak pediocyna AcH, są syntetyzowane w postaci związków nieaktywnych. Ich aktywacja następuje dopiero w środowisku o określonym stężeniu jonów wodorowych. Aktywacja nizyny zachodzi przy pH jest 5,8, leukonocyny Lcm1 5,0, natomiast sakacyny A 4,5. Yang i Ray (41) stwierdzili, że utrzymywanie pH płynów hodowlanych pod koniec hodowli okresowych na poziomie optymalnym dla aktywacji tych bakteriocyn umożliwia wytwarzanie ich z wysoką wydajnością. W wielu pracach stwierdzono, że wydajność biosyntezy bakteriocyn podczas hodowli z kontrolowanym pH jest wyższa, od uzyskiwanej w hodowlach bez regulacji pH. Bawarycyna MN (44) i nizyna (25) są produkowane z najwyższą efektywnością podczas hodowli okresowych



z pH utrzymywanym na stałym poziomie 6,0. Optymalnym pH dla produkcji enterocyny 1146 (76) oraz helwetycyny J (34) jest 5,5. Poziom produkcji propionicyny PLG-1 jest maksymalny, gdy pH pożywki jest utrzymywane na stałym poziomie 7,0. Produkcja tej bakteriocyny jest dużo niższa przy pH 6,0, 6,5 oraz 7,5, prawdopodobnie z uwagi na wysoką aktywność enzymów proteolitycznych (36). pH 7,0 jest również optymalnym dla produkcji laktacyny F (50). Produkcja laktostrepcyn wymaga natomiast niskiego pH. W środowisku o pH niższym niż 4,6 jest ona największa (59). Optymalne pH dla produkcji bakteriocyn zwykle różni się od pH optymalnego dla wzrostu wytwarzających je bakterii. pH wpływa również na zdolność bakteriocynogennych bakterii do wzrostu. Bakterie *Lactobacillus helveticus* V-1829 z uwagi na swą kwasolubną naturę ulegają lizie w środowisku o odczynie neutralnym i alkalicznym. Efektywnie rozwijają się natomiast podczas hodowli prowadzonych na pożywkach o pH niższym niż 6,0. W środowisku o stałym pH 5,5 produkują najwięcej bakteriocyny (52). Szybkość wzrostu bakterii syntetyzujących bakteriocyny jest skorelowana z pH. Przykładowo, największe tempo rozmnażania się bakterii *Leuconostoc paramesenteroides* jest obserwowane na pożywkach o odczynie neutralnym. Maksymalnej szybkości wzrostu tych bakterii towarzyszy największa produkcja leukonocyny S. Każda zmiana pH redukuje szybkość wzrostu bakterii *L. paramesenteroides* oraz ogranicza miano leukonocyny S. Wyższe pH od optymalnego dla wzrostu tych bakterii silniej ogranicza produkcję bakteriocyny (45). Spadek aktywności pediocyny PO2 jest również większy w środowisku o odczynie wyższym od optymalnego (77). Stwierdzono różnice w optymalnych wartościach pH dla produkcji bakteriocyn syntetyzowanych przez komórki wolne i immobilizowane. Dla komórek immobilizowanych jest ono wyższe (41,42,77).

#### 2.4. Kwas mlekowy

Zawartość kwasu mlekowego w środowisku hodowlanym wpływa na wydajność biosyntezy bakteriocyn. Taniguchi i in. (58) stwierdzili, że wysoka koncentracja tego związku w płynie hodowlanym silnie hamuje wzrost bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* oraz obniża wydajność biosyntezy nizyny. Wzrost bakterii oraz produkcja nizyny zostają zahamowane, gdy stężenie kwasu mlekowego osiąga poziom 30 g/l. Poprzez zastosowanie bioreaktora membranowego do hodowli bakterii *L. lactis* subsp. *lactis* możliwe jest ograniczenie koncentracji kwasu mlekowego w płynie hodowlanym. Zmniejszenie stężenia tego składnika w środowisku hodowlanym do 19 g/l eliminuje jego negatywny wpływ na produkcję nizyny. Wysokie stężenie kwasu mlekowego ogranicza również zdolność bakterii *Enterococcus faecium* DPC 1146 do wzrostu i produkcji enterocyny 1146 (54). Zawartość kwasu mlekowego w płynach hodowlanych prawdopodobnie wpływa również na produkcję innych bakteriocyn. W literaturze, jak dotąd, brak jest jednak informacji potwierdzających to przypuszczenie.



## 2.5. Faza wzrostu bakterii

Poziom produkcji bakteriocyn zależy od fazy wzrostu tworzących je mikroorganizmów. Większość bakterii syntetyzuje bakteriocyny podczas fazy logarytmicznego wzrostu. Niektóre bakterie produkują bakteriocyny również w trakcie fazy stacjonarnej. Przykładowo, bakterie *Pediococcus acidilactici* AcH wytwarzają 60% pediocyny AcH podczas pierwszych 8 godzin hodowli, tj. w fazie wzrostu logarytmicznego, natomiast 40% podczas kolejnych 8 godzin hodowli, czyli w fazie stacjonarnej (42). Poziom produkcji nizyny (40), sakacyny A (78), plantarycyny A (79), plantarycyny BN, pediocyny A, bawarycyny BM (43), helwetycyny J (34), helwetycyny V-1829 (52) oraz wielu innych bakteriocyn osiąga największą wartość pod koniec fazy wzrostu logarytmicznego tworzących je bakterii. Efektywność produkcji takich bakteriocyn, jak laktocyny 27 (37), laktacyny B (6), sakacyny A, leukonocyny Lcm1, pediocyny AcH (41) i karnozyny (51), jest najwyższa na początku fazy stacjonarnej. Niektóre bakteriocyny, np. propionicyna PLG-1, są wytwarzane do późnych etapów stacjonarnej fazy wzrostu i często dopiero wówczas osiągają swe plateau (36).

## 2.6. Czas hodowli

Silny wpływ na ilość uzyskiwanych bakteriocyn wywiera czas hodowli. Aktywność większości bakteriocyn produkowanych w sposób okresowy maleje podczas fazy stacjonarnej. Przykładowo, w trakcie hodowli okresowych z regulowanym pH miano leukonocyny S utrzymuje się na najwyższym poziomie przez 8 godzin, a następnie maleje podczas przechodzenia komórek w stacjonarną fazę wzrostu (45). Bawarycyna MN jest bardziej stabilna w środowisku hodowlanym. Podczas hodowli okresowych, z pH utrzymywanym na poziomie optymalnym dla jej produkcji, jej aktywność osiąga wartość maksymalną 3200 AU/ml w 24 godzinie hodowli i utrzymuje się na tym poziomie przez 54 godziny. Po 78 godzinach hodowli aktywność tej bakteriocyny w bulionie hodowlanym maleje do 800 AU/ml. Spadek aktywności bawarycyny MN podczas stacjonarnej fazy wzrostu bakterii jest bardziej gwałtowny w hodowlach prowadzonych w warunkach odbiegających od optymalnych dla jej produkcji (44). Obniżanie się aktywności bakteriocyn podczas fazy stacjonarnej może być następstwem działania specyficznych i/lub niespecyficznych enzymów proteolitycznych (34,40,45,54,75,80). Montville i in. (45) wykazali, że spadek aktywności leukonocyny S jest związany z sekrecją pozakomórkowych proteaz. Ich aktywność w środowisku hodowlanym wyraźnie rośnie w trakcie fazy stacjonarnej. Aktywność ta jest skorelowana z pH środowiska. W środowisku o odczynie zbliżonym do obojętnego enzymy proteolityczne produkowane przez bakterie *Leuconostoc paramesenteroides* OX posiadają najwyższą aktywność i prawdopodobnie dlatego straty aktywności bakteriocyny są w nim największe. Spadek aktywności bakteriocyn podczas stacjonarnej fazy wzrostu produkujących je bakterii może być również rezultatem silnego zakwaszenia środowiska hodowlanego. W trakcie ho-



dowli okresowych bez regulacji pH rośnie stężenie jonów wodorowych. Ich koncentracja osiąga wartość maksymalną na początku fazy stacjonarnej. W związku z tym można przypuszczać, że wysokie stężenie jonów wodorowych obniża stabilność bakteriocyn (48,54,80). Daeschel i in. (79) przypuszczają, że przyczyną strat aktywności bakteriocyn podczas fazy stacjonarnej może być również produkcja kwasu tejchojowego. Wiele bakteriocyn w środowisku o niskim pH adsorbują się do powierzchni wytwarzających je bakterii. Sugeruje to, że spadek aktywności bakteriocyn w płynach hodowlanych o wysokiej kwasowości może być również następstwem ich adsorpcji do powierzchni komórek (47,54,76).

## 2.7. Koncentracja biomasy

Poziom produkcji niektórych bakteriocyn zależy od gęstości populacji syntetyzujących je bakterii. Produkcja 5 leukonocyn rośnie wraz ze wzrostem koncentracji biomasy i osiąga wartość maksymalną przy maksymalnej jej gęstości (53). Wzrost koncentracji biomasy bakterii *Pediococcus acidilactici* AcH pociąga za sobą wzrost efektywności produkcji pediocyny AcH (42). Wysoka koncentracja biomasy gwarantuje również wydajną biosyntezę nizyny, sakacyny A oraz leukonocyny Lcm1 (41). Produkcja wielu bakteriocyn nie jest jednak skorelowana z koncentracją wytwarzających je bakterii, gdyż warunki optymalne do produkcji większości bakteriocyn nie są zbieżne z optymalnymi dla wzrostu organizmów-producentów (11,36,43,48,77).

## 2.8. Szybkość wzrostu

Szybkość wzrostu niektórych bakteriocynogennych bakterii jest ważnym czynnikiem determinującym efektywność produkcji bakteriocyn. Odnosi się to szczególnie do tych bakteriocyn, które są tworzone równolegle z biomasą komórkową. Poziom produkcji mikrocyn rośnie wraz ze wzrostem szybkości wzrostu bakterii *Escherichia coli*. Lewus i Montville (43) stwierdzili, że wzrost szybkości rozmnażania bakterii *Lactobacillus bavaricus* MN pociąga za sobą wzrost miana wytwarzanej przez nie bakteriocyny. W hodowlach z regulowanym pH wydajność produkcji sakacyny A, leukonocyny Lcm1, pediocyny AcH oraz nizyny jest również związana z szybkością wzrostu syntetyzujących je bakterii i rośnie wraz z jej wzrostem (41). Relacje między szybkością wzrostu innych bakteriocynogennych bakterii a efektywnością produkcji ich bakteriocyn są trudne do jednoznacznego określenia (40,46).

## 2.9. Metody hodowli

Wydajność biosyntezy bakteriocyn zależy w dużym stopniu od metody hodowli bakterii. W hodowlach okresowych bez regulacji pH miano większości bakteriocyn jest niższe niż 1000 AU/ml. Aktywność bakteriocyn można jednak zwiększyć poprzez prowadzenie hodowli wytwarzających je bakterii w warunkach kontrolowanych. Utrzymywanie pH pożywek podczas hodowli



na stałym poziomie, optymalnym do produkcji bakteriocyn, poprawia wydajność ich biosyntezy oraz zwiększa ich stabilność w środowisku hodowlanym podczas fazy stacjonarnej. Przykładowo, produkcja helwetycyny V-1829 podczas hodowli z kontrolowanym pH (pH-5,0) jest dwukrotnie wyższa od uzyskiwanej podczas hodowli bez regulacji pH (52). Maksymalne miano leukonocyny S w hodowlach ze stałym pH (pH 7,0) jest natomiast czterokrotnie wyższe od uzyskiwanego w hodowlach bez regulacji tego parametru (37,45). Bakteriocyny można również produkować w sposób ciągły, co prowadzi zwykle do zwiększenia poziomu ich produkcji. Wydajność biosyntezy nizyny w hodowlach ciągłych rośnie wraz ze wzrostem szybkości rozcieńczania (D) i osiąga wartość maksymalną przy  $D = 0,25/h$ . Aktywność nizyny przy  $D = 0,25/h$  jest 9-krotnie wyższa od otrzymywanej przy  $D = 0,05/h$ . Aktywność ta jest jednocześnie 5,6 razy wyższa niż w hodowlach okresowych (25). Produkcja bawarycyny MN podczas hodowli ciągłych przy D w zakresie od 0,058 do 0,205/h jest dwukrotnie wyższa od uzyskiwanej podczas hodowli okresowych i nie zmienia się pod wpływem zmian tego parametru (44). Parente i in. (46) stwierdzili, że aktywność enterocyny 1146 w hodowlach ciągłych przy D w zakresie od 0,12 do 0,17/h jest nieznacznie wyższa niż w hodowlach okresowych.

TABELA 6

PRZYKŁADY NAJWYŻSZYCH MIAN AKTYWNOŚCI BAKTERIOCYN OSIĄGANÝCH W PŁYNACH HODOWLANYCH

Bakteriocyna	Maksymalna aktywność [AU/ml]	Metody i parametry hodowli	Literatura
leukonocyna S	500	okresowa bez regulacji pH	(9)
	2 000	okresowa pH 7,0 const	(45)
bawarycyna MN	3 200	okresowa pH 6,0 const	(44)
	6 400	ciągła pH 6,0; D 0,058 – 0,205/h	(44)
brewicyna 286	25 600	okresowa pH 6,2 pocz.	(49)
	12 800	okresowo-dolewowa z immobilizacją komórek pH 6,2 pocz.; całkowita wymiana pożywki w kolumnie co 24 godziny	
	25 600	ciągła z immobilizacją komórek pH 6,2 pocz.; D 3,0/h	
nizyna	120	ciągła z recyrkulacją komórek pH 6,8 const; D 0,05/h	(58)
	180	ciągła z recyrkulacją komórek pH 6,8 const; D 0,05/h; $\alpha$ 0,1	
	125	okresowa pH 6,2 pocz.	(49)
	125	ciągła z immobilizacją komórek pH 6,2 pocz.; D 3,0/h	
pediocyna PO2	300	okresowa pH 6,2 pocz.	(49)
	300	ciągła z immobilizacją komórek pH 6,2 pocz.; D 3,0/h	



W celu zwiększenia produktywności bakteriocyn oraz ułatwienia ich separacji z płynów hodowlanych do produkcji bakteriocyn stosowano także komórki immobilizowane (49,77,81). Zezza i in. (81) stwierdzili, że bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* immobilizowane w kulkach alginianowych produkują nizinę. Podczas hodowli okresowych bakteriocyna ta jest uwalniana do pożywki. Produkcja nizyny przez komórki immobilizowane w alginianie wapnia jest 10-krotnie niższa od otrzymywanej w analogicznych warunkach w hodowlach z wolnymi komórkami. Brewicyna 286 jest również produkowana przez immobilizowane bakterie. Podczas hodowli okresowo-dolewowych, z całkowitą wymianą pożywki co 24 godziny, bakterie *Lactobacillus brevis* VB286 syntetyzują tę bakteriocynę (brewicynę 286) z wydajnością o 25 – 50% niższą od osiąganą w hodowlach z wolnymi komórkami. Aktywność brewicyny 286 w płynie hodowlanym w drugim i trzecim zalewie osiąga wartość 12 800 AU/ml, natomiast w czwartym zalewie jest dwukrotnie niższa, prawdopodobnie z uwagi na niewielki wypływ komórek z kulek alginianowych. Wan i in. (49) stwierdzili, że niższa produkcja brewicyny 286 przez komórki immobilizowane hodowane metodą okresowo-dolewową jest prawdopodobnie następstwem ich słabszego wzrostu. Brewicyna 286 jest syntetyzowana przez komórki immobilizowane z wyższą efektywnością podczas hodowli ciągłych. Po 8 godzinach od rozpoczęcia hodowli ciągłej z szybkością rozcieńczenia 3,0/h, jej aktywność osiąga 25 600 AU/ml. Aktywność ta jest równa z otrzymywaną w hodowlach z wolnymi komórkami. Miano brewicyny 286 utrzymuje się na maksymalnym poziomie do 68 godziny, a po tym czasie maleje z uwagi na wypływ komórek z kulek alginianowych. Bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* oraz *Pediococcus acidilactici* PO2, immobilizowane w alginianie wapnia, podczas hodowli ciągłych produkują bakteriocyny z taką samą efektywnością jak komórki wolne (49). Aktywność pediocyny PO2, syntetyzowanej przez bakterie *Pediococcus acidilactici* PO2 immobilizowane w żelu alginianowym, rośnie wraz ze wzrostem D w zakresie 0,63 – 1,19/dobę. Przy D = 1,19/dobę osiąga wartość maksymalną. Cho i in. (77) wykazali, że bioreaktor z komórkami immobilizowanymi może pracować w sposób ciągły przez 3 miesiące. Po tym czasie ok. 94% komórek nadal występuje w formie uwieżonej w żelu. Bakteriocynogenne bakterie mogą być również hodowane w sposób ciągły z recyrkulacją komórek. Taniguchi i in. (58) stwierdzili, że produktywność nizyny podczas hodowli prowadzonych w bioreaktorze membranowym przy D = 0,05/h jest 4,5 razy wyższa niż w hodowlach okresowych. Zastosowanie odbioru nadmiaru biomasy (ang. *bleeding*;  $\alpha$ ), w ilości 10% objętości dozowanej pożywki, zwiększa produkcję tej bakteriocyny o 100%. Należy jednak zaznaczyć, że stosowanie zbyt dużego odbioru komórek, prowadzącego do znacznego zmniejszenia się koncentracji biomasy w bioreaktorze, obniża wydajność biosyntezy nizyny.

### 3. Wnioski

Z przedstawionych danych wynika, że biosynteza bakteriocyn przez bakterie jest determinowana przez wiele czynników środowiskowych, stąd pro-



dukcja poszczególnych bakteriocyn wymaga doboru indywidualnych warunków hodowli. Większość bakteriocyn jest syntetyzowana w logarytmicznej lub stacjonarnej fazie wzrostu. Warunki hodowli wpływają nie tylko na ilość tworzonych bakteriocyn, ale również na ich sekrecję do pożywki oraz aktywność antymikrobiologiczną.

## Literatura

1. Montville T. J., Kaiser A. L., (1993), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Eds. Hoover D. H., Steenson L. R., 3-19, Academic Press Inc, New York.
2. Barefoot S. F., Hormon K. M., Grinstead D. A., (1992), *Bacteriocins, molecular biology*, in: *Encyclopedia of Microbiology*, Ed. Lederberg J., 1, 191-202, Academic Press Inc, New York.
3. Klaenhammer T. R., (1988), *Biochemie*, 70, 337-349.
4. Delves-Broughton J., (1990), *J. Soc. Dairy Technol.*, 43, 73-76.
5. Ortel S., (1989), *Int. J. Food Microbiol.*, 8, 249-250.
6. Barefoot S. F., Klaenhammer T. R., (1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1808-1815.
7. Tagg J. R., Dajani A. S., Wannamaker L. W., (1976), *Bacteriol. Rev.*, 40, 722-756.
8. Li Puma J. J., Richman H., Stull T. L., (1990), *Infect Immun.*, 58, 1600-1605.
9. Lewus C. B., Montville T. J., (1991), *Methods*, 13, 145-150.
10. Hoover D. G., (1992), *Bacteriocins: Activities and applications*, in: *Encyclopedia of Microbiology*, Ed. Lederberg J., 1, 181-190, Academic Press Inc, New York.
11. Arihara K., Ogihara S., Mukai T., Itoh M., Kondo Y., (1996), *Let. Appl. Microbiol.*, 22, 420-424.
12. Mayer-Harting A., Herders A. J., Berkley R. C., (1972), *Methods in microbiology*, Eds. Norris J. R., Ribbons D. W., 7A, 315-422, Academic Press, London.
13. Lyon W. J., Glatz B. A., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 701-706.
14. Upreti G. C., Hindsill R. D., (1973), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 4, 487-494.
15. de Klark H. C., Smit J. A., (1967), *J. Gen. Microbiol.*, 48, 309-316.
16. Hoover G. D., Harlander S. H., (1993), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Eds. Hoover D. H., Steenson L. R., 23-39, Academic Press Inc, New York.
17. Rammelsberg M., Radler F., (1990), *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 177-184.
18. Chen Y. R., Barefoot S. F., Hughes M. D., Hughes T. A., (1992), *Institute of Food Technologists Annual Meeting*, New Orleans, Louisiana, Abstr. 668.
19. Barefoot S. F., Nettles C. G., (1993), *J. Dairy Sci.*, 76, 2366-2379.
20. Hughes M. D., Barefoot S. E., (1990), *Amer. Soc. Microbiol. Annual Meeting*, Anaheim, California, Abstr. O-12.
21. Yang R., Johnson M. C., Ray B., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3355-3359.
22. Daba H., Lacroix C., Huang J., Simard R. E., Lemieux L., (1994), *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 682-688.
23. Mathieu F., Milliere J. B., Lebrihi A., Mathis R., Lefebvre G., (1994), *Poster, resume paru dans le recueil du colloque de la Societe Francaise de Microbiologie*, (9-10 Mars 1994).
24. Miteva V., Stefanova T., Budakov I., Ivanova I., Mitev V., Gancheva A., Ljubenov M., (1996), *Final Raport*, 1-21, Copernicus Project CIPA-CT 94-0202.
25. Petitdemange H., Meghrouis J., Huot E., Quittelier M., (1992), *Res. Microbiol.*, 143, 879-890.
26. Buchanan R. E., Bagi L. K., (1997), *J. Food Protect.*, 60, 254-261.
27. Rogers A. H., (1972), *Appl. Microbiol.*, 24, 294-295.
28. Rogers A. H., (1974), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 6, 547-550.
29. Konisky J., (1978), *The bacteriocins*, in: *The bacteria*, Eds. Orson L. N., Sokatch J. R., 6, 71-136, Academic Press Inc., New York.



30. Rekhif N., Atrih A., Lefebvre G., (1995), *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 349-358.
31. Mortvedt C. J., Nissen-Mayer J., Sletten K., Nes I. F., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 114-121.
32. Barefoot S. F., Klaenhammer T. R., (1984), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26, 326-334.
33. Muriana P. M., Klaenhammer T. R., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 114-121.
34. Joerger M. C., Klaenhammer T. R., (1986), *J. Bacteriol.*, 167, 439-446.
35. Schved F., Lalazar A. Henis Y., Juven B. J., (1993), *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 67-77.
36. Lyon W. J., Glatz B. A., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 83-88.
37. Upreti G. C., Hindsill R. D., (1975), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7, 139-145.
38. Strasser de Saad A. M., Pasteris S. E., Maca de Nedera M. C., (1995), *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 473-476.
39. Glatz B. A., Hisieh H.-Y., Paik H.-D., (1996), *J. Food Protect.*, 59, 734-738.
40. de Vuyst L., Vandamme E. J., (1992), *J. Gen. Microbiol.*, 138, 571-578.
41. Yang R., Ray B., (1994), *Food Microbiol.*, 11, 281-191.
42. Ray B., Biswas R. S., Ray P., Johnson M. C., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1265-1267.
43. Lewus C. B., Montville T. J., (1992), *Food Biotechnol.*, 6, 153-174.
44. Kaiser A. L., Montville T. J., (1993), *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 536-540.
45. Montville T. J., Winkowski K., Baker R. C., (1996), *Process Biochem.*, 31, 225-228.
46. Parente E., Brienza C., Ricciardi A., Addario G., (1997), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 62-65.
47. Franz C. M. A. P., Schillinger U., Holzapfel W. H., (1996), *Int. J. Food Microbiol.*, 29, 255-270.
48. Schillinger U., Stiles M. E., Holzapfel W. H., (1993), *Int. J. Food Microbiol.*, 20, 131-147.
49. Wan J., Hickey M. W., Coventry M. J., (1995), *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 671-676.
50. Muriana P. M., Klaenhammer T. R., (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 553-560.
51. van Laack R. L. J. M., Schillinger U., Holzapfel W. H., (1992), *Int. J. Food Microbiol.*, 16, 183-195.
52. Fitzgerald G. F., Vaughan E. V., Daly C., (1992), *J. Appl. Bacteriol.*, 73, 299-308.
53. Hastings J. W., Gibson P. T., Chauhan R., Dyckes G. A., Von Holy A., (1996), *South Afr. J. Sci.*, 92, 376-381.
54. Parente E., Hill C., (1992), *J. Appl. Bacteriol.*, 73, 290-298.
55. Strasser de Saad A. M., Pasteris S. E., Maca de Nedera M. C., (1993), *Microbiol. Alimen. Nutrit.*, 11, 147-150.
56. Daeschel M. A., (1993), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Eds. Hoover D. H., Steenson L. R., 63-91, Academic Press Inc., New York.
57. Schillinger U., Geisen R., Holzapfel W. H., (1996), *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 158-164.
58. Taniguchi M., Hoshino K., Urasaki H., Fujii M., (1994), *J. Ferment. Bioeng.*, 6, 704-708.
59. Kozak W., Dobrzański W. T., (1977), *Acta. Microbiol. Pol.*, 26, 361-368.
60. Meitert F., (1969), *Arch. Rouni. Pathol. Exp. Microbiol.*, 28, 1086-1097.
61. Grajek W., Lassocińska T., Sip A., (1996), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 5, 74-83.
62. Pucci M. J., Vedamuthu E. R., Kunka B. S., Vandenberg P. A., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2349.
63. Daba H., Pandian S., Gosselin J. F., Simard R. E., Huang J., Lacroix C., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3450-3455.
64. Adfoldi L., (1958), *Ann. Inst. Poster Paris*, 94, 474-484.
65. Kozlova Y. I., Glinkova T. I., Baranova I. P., Egorov N. S., (1979), *Mikrobiol.*, 48, 443-446.
66. de Vuyst L., de Poorter G., Vandamme E. J., (1989), *Med. Fac. Landebounn. Rijksuniv. Gent.*, 54, 1501-1506.
67. Huot E., Barrenagonzalez C., Petidemange H., (1996), *Letters Appl. Microbiol.*, 22, 307-310.
68. Garver K. I., Muriana P. I., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2191-2195.



69. Piva A., Haedon D. R., (1994), *Microbiol.*, 140, 697-702.
70. Hastings J. W., Carolissen-Mackay V., Arendse G., (1997) *Int. J. Food Microbiol.*, 34, 1-16.
71. Jimenez-Diaz R., Rios-Sanchez R. M., Desmazeaud M., Piard J. C., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1416-1424.
72. Jetten A. M., Vogels G. D., de Windt F., (1972), *J. Bacteriol.*, 112, 235-242.
73. Kelstrup J., Gibbons R. J., (1969), *Arch. Oral Biol.*, 14, 251-258.
74. Pilet M. F., (1994), *Caracterisation de la divercine V41 et de la pisciocine V1, bacteriocines produites par Carnobacterium divergens V 41 et Carnobacterium piscicola V1 isolees de produits marins*, Ph. Thesis., 1-139, Universite de Caen, Institut de Recherches en Biologie Appliquee.
75. Pilet M. F., Dusset X., Barre R., Novel G., Desmazaed M., Piard J. Ch., (1995), *J. Food Protect.*, 58, 256-262.
76. Parente E., Ricciardi A., (1994), *Lett. Appl. Microbiol.*, 19, 12-15.
77. Cho H.-Y. Yousef A. E., Yang S. T., (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 589-594.
78. Schillinger U., Lucke F-K., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 8, 1901-1906.
79. Daeschel M. A., McKenney M. C., McDonald L. C., (1990), *Food Microbiol.*, 7, 91-98.
80. Torrini Tarelli G., Carminati D., Giraffa G., (1994), *Food Microbiol.*, 11, 243-252.
81. Zezza N., Pasini G., Lombardi A., Mercenier A., Spettoli P., Zamorani A., Nuti M. P., (1993), *J. Dairy. Res.*, 60, 581-591.

## Production of bacteriocins by lactic acid bacteria

### Summary

Biosynthesis of bacteriocins by lactic acid bacteria is determined by culturing conditions, like medium composition, pH, temperature, cultivation method, metabolite concentration, cell density, phase of growth and time of fermentation. Generally, bacteriocins are produced during the logarithmic or stationary phase of growth. The culturing conditions influence both the amount of bacteriocin production as well as their antibacterial activity. In the paper numerous examples of culturing requirements for individual bacteriocins production are presented.

### Key words:

bacteriocins, antimicrobial activity, lactic acid bacteria.

### Adres do korespondencji:

Anna Sip, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań.