

ELŻBIETA KLEWICKA, ZDZISŁAWA LIBUDZISZ

BAKTERIOCYNOGENNE WŁAŚCIWOŚCI *LACTOBACILLUS* *ACIDOPHILUS*

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań prowadzące do wyselekcjonowania, spośród 20 kultur *Lactobacillus acidophilus*, szczepów o zdolności produkowania związków białkowych, charakteryzujących się aktywnością przeciwbakteryjną. Wykazano, że związki takie produkowane były przez szczepy oznakowane jako: 0.3, B, 336. Tworzone przez te kultury związki białkowe charakteryzowały się aktywnością antagonistyczną w stosunku do: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Badania zmierzające do charakterystyki chemicznej i optymalnych warunków działania tych związków są kontynuowane.

Wstęp

Bakterie fermentacji mlekowej mogą wytwarzać zewnątrzkomórkowo wiele związków o niskiej masie molekularnej, takich jak: kwasy organiczne, alkohole, dwutlenek węgla, diacetyl, reuteryna, nadtlenuk wodoru oraz związki o charakterze białkowym zwane bakteriocynami. Wymienione produkty metabolizmu bakterii mlekowych obecne w środowisku żywności nie tylko podnoszą jej walory dietetyczno-sensoryczne, ale również poprzez oddziaływanie antagonistyczne zabezpieczają ją przed rozwojem mikroflory niepożądanego, a często chorobotwórczej. Pomimo, iż niektóre bakteriocyny produkowane przez bakterie fermentacji mlekowej nie wywołują bójkowego efektu na wszystkie bakterie zanieczyszczające żywność, a jedynie efekt bakteriostatyczny, ich zastosowanie w konserwowaniu żywności stwarza producentom nową alternatywę w produkcji bezpiecznej żywności [6]. Bakteriocyny definiowane są jako związki białkowe o aktywności przeciwbakteryjnej skierowanej do wąskiej grupy bakterii, zazwyczaj mikroorganizmów tego samego rodzaju, a nawet gatunku [1]. W

oparciu o właściwości fizyczne i chemiczne, bakteriocyny syntetyzowane przez bakterie mlekowe zostały sklasyfikowane w czterech klasach. Klasa I są to lantynyotyki, czyli małe peptydy zawierające nietypowe aminokwasy np. lantioninę, (Laktocyna S o masie 3,7 kDa, Karnocyna U149 o masie 4,6 kDa). Do II klasy zaliczono małe hydrofobowe peptydy, odporne na ogrzewanie w temperaturze 100°C przez 30 minut (Laktocyna 27 – 12,4 kDa, Laktocyna B – 6,3 kDa) lub w 121°C w czasie 15 minut (Laktocyna F – 6,3 kDa), a ich masa molekularna nie przekracza 13 kDa. Klasę III stanowią duże białka wrażliwe na działanie podwyższonych temperatur (60–100°C), w czasie około 10–15 minut (Helwetycyna J – 37 kDa). W IV klasie umieszczono bakteriocyny stanowiące kompleksy białek z lipidami i węglowodanami [4].

Celem prezentowanych badań była ocena zdolności syntetyzowania związków białkowych o aktywności przeciwbakteryjnej przez 20 szczepów *Lactobacillus acidophilus* oraz, dla kultur syntetyzujących takie związki, określenie spektrum oddziaływania w stosunku do *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923 i *P.aeruginosa* ATCC 27853.

Materiały i metody badań

Materiał badawczy stanowiło 20 kultur *Lactobacillus acidophilus*. Szczepy oznaczone symbolami: 1nd1, Cz-1, 20T1, In3, CH-2, Ros, 172, H1, 336, 343 pochodziły z kolekcji kultur Rhodia Food Biolacta w Olsztynie; CH-5, Nestle, Bauer, Diat, A92 otrzymano z kolekcji Wyższej Szkoły Chemiczno-Technicznej w Pradze, B i 0.3 z kolekcji Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej; 1075, 1152 pochodziły z Narodowej Kolekcji Mikroorganizmów Rolnych i Przemysłowych w Budapeszcie.

Badania antagonizmu międzyszczepowego w stosunku do kultur *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923 i *P.aeruginosa* ATCC 27853, przeprowadzono w podłożu MRS o zawartości 1,5 i 0,15% laktozy. Zmniejszenie źródła węgla miało na celu ograniczenie aktywności kwasotwórczej badanych bakterii. Do oceny poziomu hamowania wzrostu bakterii testowych zastosowano metodę kropelkową i studzienkową.

Metoda kropelkowa [7] polega na równoległym wzroście szczepu wskaźnikowego i badanego. Na podłożu MRS nanoszono w formie kropli 5 μ l hodowli bakterii *L.acidophilus* i po 24-godzinnej inkubacji powierzchnię zalewano murawą zawierającą szczep wskaźnikowy w ilości 10^5 – 10^6 jtk/ml. Płytki ponownie inkubowano przez 24 godziny. Wyniki odczytywano jako strefy zahamowania wzrostu szczepu wskaźnikowego, mierzone w mm, odejmując średnicę wzrostu szczepu *L.acidophilus*.

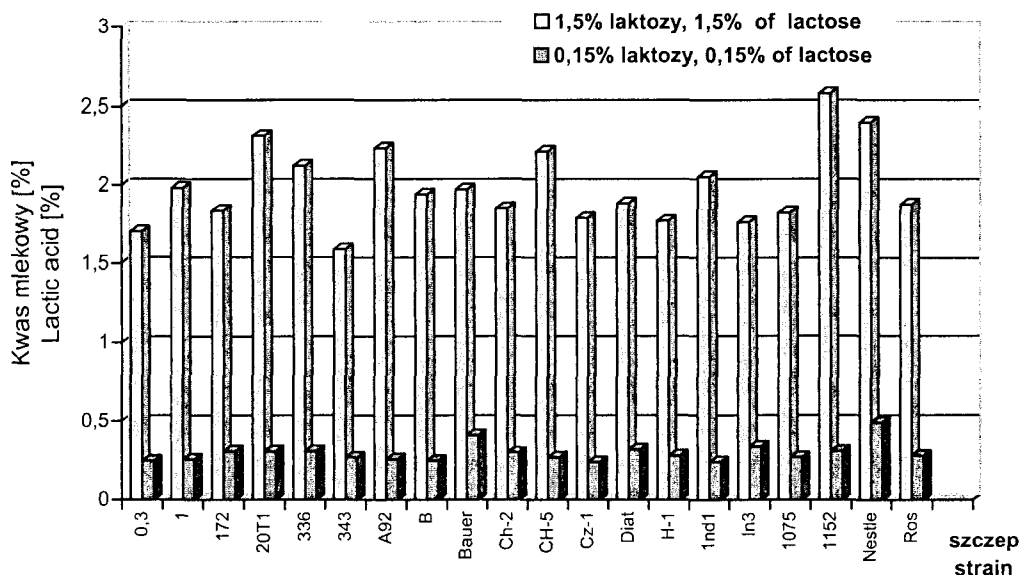
Metoda studzienkowa [3] polega na wprowadzeniu cieczy po 18-godzinnej hodowli szczepu *L.acidophilus* (w ilości 60 μ l) do studzienek wyciętych (średnica 1 cm) w murawie zawierającej szczep wskaźnikowy (10^5 – 10^6 jtk/ml). Ciecz po hodowli uprzednio wirowano i filtrowano przez filtr bakteriologiczny o średnicy porów 0,2 μ m.

Po 24 godzinach inkubacji odczytywano strefy hamowania wzrostu szczepu wskaźnikowego, po odjęciu średnicy studzienki. Wynik podawano w mm.

W celu wyizolowania białek zewnątrzkomórkowych, po 18-godzinnej hodowli szczepów *L.acidophilus* płyn pochodzący poddawano wysalaniu siarczanem amonowym o stężeniu 65% (wysycenie w roztworze). Otrzymany osad zawieszano w 0,2M buforze fosforanowym o pH 6,5, w objętości dającej efekt 20-krotnego zateżenia w stosunku do objętości wyjściowej. Następnie preparat poddawano 24-godzinnej dializie w woreczkach dializacyjnych o wielkości por 3,5 kDa, wobec buforu fosforanowego o pH 6,5, stosując trzykrotną wymianę buforu.

Wyniki i dyskusja

Bakteriocyny produkowane przez *Lactobacillus acidophilus* często charakteryzują się wąskim spektrum antagonizycznym. Aktywne są zazwyczaj w stosunku do mikroorganizmów tego samego rodzaju, często nawet w stosunku do innych szczepów tego samego gatunku, jednakże niektóre mogą wykazywać również aktywność antagonizyczną lub bakteriostatyczną w stosunku do bakterii patogennych, takich jak *Escherichia coli* czy *Salmonella sp.* [10]. Przykładem takiej bakteriocyny jest acidofilina 801, produkowana przez *L.acidophilus* IBB 801, hamująca wzrost bakterii chorobotwórczych *Escherichia coli* Row oraz *Salmonella panama* 1467 [9].



Rys. 1. Zdolności kwaszące kultur *L.acidophilus* w podłożu MRS o zawartości 1,5% i 0,15% laktozy.

Fig. 1. Lactic acid production by *L.acidophilus* in MRS medium containing 1,5% and 0,15% of lactose.

Badane kultury *Lactobacillus acidophilus*, na podłożu MRS zawierającym 1,5% laktozy, wykazywały aktywność antagonistyczną w stosunku do bakterii testowych (*E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923 i *P.aeruginosa* ATCC 27853). Skrening kultur zdolnych do syntezy związków antagonistycznych o charakterze białkowym, prowadzono w pożywce MRS o 10-krotnie zmniejszonej zawartości laktozy, w celu wyeliminowania aktywności antagonistycznej pochodzącej od kwaśnych metabolitów bakterii mlekowych. Takie warunki hodowli spowodowały zmniejszenie syntezy kwasów organicznych średnio o około 85% (rys. 1). Stwierdzono, że w pożywce o obniżonym stężeniu cukru wzrost *E.coli* ATCC 25922 był hamowany przez 10 kultur *L.acidophilus* (tab. 1), a wzrost *S.aureus* ATCC 25923 był hamowany przez 8 kultur

Tabela 1

Aktywność antagonistyczna bakterii *Lactobacillus acidophilus* w stosunku do *Escherichia coli* ATCC 25922 (podłoże MRS).

Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* strains towards *Escherichia coli* ATCC 25922 (MRS medium).

Szczep Strain	Strefa hamowania szczepu wskaźnikowego [mm] Zone of inhibited growth of the test strain [mm]			
	1,5% laktozy 1,5% of lactose	0,15% laktozy 0,15% of lactose	1,5% laktozy + trypsyna 1,5% of lactose + trypsin	0,15% laktozy + pepsyna 0,15% of lactose + pepsin
0.3	22,0	14,0	- ^{a)}	-
1	12,0	-	-	-
172	18,0	6,0	6,0	5,0
20T1	17,0	-	-	-
336	18,0	-	-	-
343	18,5	-	-	-
A92	19,5	-	-	-
B	25,0	8,0	-	-
Bauer	25,5	-	-	-
Ch-2	28,0	-	-	-
Ch-5	28,0	6,0	3,0	4,5
Cz-1	30,0	5,0	4,5	5,5
Diat	28,0	3,0	5,0	6,0
H-1	27,0	2,5	4,5	5,0
Ind1	13,0	-	-	-
In3	31,0	-	-	-
1075	12,5	-	-	-
1152	27,5	1,5	3,0	2,0
Nestle	26,0	8,0	6,0	5,5
Ros	14,5	5,5	6,0	8,0

a) brak strefy hamowania

a) no inhibition zone

Tabela 2

Aktywność antagonistyczna bakterii *Lactobacillus acidophilus* w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (podłoże MRS).

Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* strains towards *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (MRS medium).

Szczep Strain	Strefa hamowania szczepu wskaźnikowego [mm] Zone of inhibited growth of the test strain [mm]			
	1,5% laktozy 1,5% of lactose	0,15% laktozy 0,15% of lactose	1,5% laktozy + trypsyna 1,5% of lactose + trypsin	0,15% laktozy + pepsyna 0,15% of lactose + pepsin
0.3	31,5	8,0	- ^{a)}	-
1	28,0	7,0	6,0	3,0
172	27,2	7,0	5,5	5,0
20T1	32,0	8,5	4,0	6,0
336	33,5	8,0	-	-
343	35,0	8,0	2,0	6,0
A92	30,0	9,0	1,0	4,0
B	31,5	3,0	4,0	4,0
Bauer	31,5	10,0	3,0	7,0
Ch-2	20,1	2,0	1,5	6,0
Ch-5	20,0	1,0	2,5	5,5
Cz-1	20,0	1,0	6,0	5,5
Diat	31,0	9,0	5,5	5,5
H-1	20,5	6,0	4,5	6,0
Ind1	22,5	5,2	6,5	7,5
In3	24,5	6,2	10,0	2,0
1075	28,0	12,0	6,5	6,0
1152	30,0	10,0	5,0	7,0
Nestle	29,0	2,0	5,0	2,5
Ros	30,0	4,5	5,0	8,5

brak strefy hamowania

no inhibition zone

L.acidophilus (tab. 2). Aktywność antagonistyczna w stosunku do *P.aeruginosa* ATCC 27853 była obniżona o około 76% (tab. 3). W celu rozkładu białek, w tym również bakteriocyn, do płynów pochodzących *L.acidophilus* dodano enzym proteolityczny (pepsynę lub trypsynę wprowadzając do studzienki zawierającej roztwór badanego preparatu białkowego). W tych warunkach doświadczenia stwierdzono utratę aktywności antagonistycznej kultur *Lactobacillus acidophilus* oznaczonych symbolami 0.3, B i 336 (tab. 1–3). Wskazuje to, że szczepy te są zdolne do syntezy białek o aktywności antagonistycznej. W kolejnym etapie badań białko syntetyzowane zewnątrzkomórkowo przez szczepy *L.acidophilus* 0.3, B i 336 wytrącano z cieczy po hodowli metodą wysalania siarczanem amonu, poddawano dializie, a następnie oznaczano aktywność

Tabela 3

Aktywność antagonistyczna bakterii *Lactobacillus acidophilus* w stosunku do *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (podłoże MRS).

Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* strains towards *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MRS medium).

Szczep Strain	Strefa hamowania szczepu wskaźnikowego [mm] Zone of inhibited growth of the test strain [mm]			
	1,5% laktozy 1,5% of lactose	0,15% laktozy 0,15% of lactose	1,5% laktozy + trypsyna 1,5% of lactose+trypsin	0,15% laktozy + pepsyna 0,15% of lactose+pepsin
0.3	12,0	10,0	- ^{a)}	-
1	16,0	-	-	-
172	31,0	-	-	-
20T1	25,0	-	-	-
336	26,0	16,0	8,0	-
343	12,0	-	-	-
A92	13,0	2,0	2,0	3,5
B	28,0	6,0	-	-
Bauer	16,0	-	-	-
Ch-2	19,5	-	-	-
Ch-5	31,5	-	-	-
Cz-1	28,0	12,0	10,0	12,0
Diat	16,0	8,0	9,0	8,0
H-1	15,0	-	-	-
Ind1	9,0	6,0	5,5	6,0
In3	18,5	-	-	-
1075	21,0	-	-	-
1152	22,0	6,0	7,0	5,0
Nestle	16,0	-	-	-
Ros	15,0	-	-	-

a) brak strefy hamowania

a) no inhibition zone

antagonistyczną otrzymanego roztworu białka. Rezultaty przedstawiono w tab. 4. Wyizolowane preparaty białek wykazywały zróżnicowanie aktywności antagonistycznej w stosunku do kultur testowych. W przypadku szczepu *L.acidophilus* 336 zaobserwowano utratę aktywności antagonistycznej w stosunku do *E.coli* ATCC 25922 i *P.aeruginosa* ATCC 27853 po zastosowaniu enzymu proteolitycznego. Natomiast *S.aureus* ATCC 25923 zareagował jedynie obniżeniem wrażliwości. Wskazuje to, iż szczep *L.acidophilus* 336 może produkować dwa związki białkowe o aktywności antagonistycznej. Badania prowadzone przez Lewus i wsp. [5] wykazały, iż bakterie fermentacji mlekowej mogą produkować więcej niż jedną bakteriocynę, np.: *L.acidophilus* wytwarza dwie bakteriocyny, mianowicie lactocynę B i F. Natomiast w

Tabela 4

Zdolności bakteriocynogenne szczepu *L.acidophilus* 0.3, B i 336.
Bacteriocynogenic ability of *L.acidophilus* 0.3, B and 336.

<i>L.acidophilus</i>	Szczep testowy Test strain	Strefy hamowania wzrostu [mm] Zone of inhibited growth [mm]		
		S	WD	EP
0.3	<i>P.aeruginosa</i>	14,3	0,0	0,0
	<i>S.aureus</i>	12,5	0,0	0,0
	<i>E.coli</i>	15,0	4,0	0,0
B	<i>P.aeruginosa</i>	15,3	0,0	0,0
	<i>S.aureus</i>	12,5	0,0	0,0
	<i>E.coli</i>	15,3	4,0	0,0
336	<i>P.aeruginosa</i>	12,8	14,00	0,0
	<i>S.aureus</i>	7,5	6,5	2,0
	<i>E.coli</i>	14,0	2,0	0,0

S – supernatant surowy, WD – preparat białkowy po wysoleniu i dializie, EP – preparat białkowy poddany działaniu enzymów proteolitycznych.

S – crude supernatant, WD – protein preparation concentrated by ammonium sulfate precipitation and dialysis, EP – protein preparation exposed to proteolytic enzymes.

Tabela 5

Aktywność antagonistyczna preparatów wydzielonych z hodowli *L.acidophilus* w stosunku do wrażliwych kultur testowych.

Antagonistic activity of proteins secreted by lactic acid bacteria *L.acidophilus* towards sensitive test strains.

<i>L.acidophilus</i>	Szczep testowy Test strain	Aktywność preparatu [J/mg białka] Activity of the preparation [U/mg of protein]		
		S	WD	EP
0.3	<i>E.coli</i> ATCC 25922	4,94	7,17	0,00
336	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	3,45	6,50	6,5
B	<i>E.coli</i> ATCC 25922	9,17	12,30	0,00

S – supernatant surowy, WD – preparat białkowy po wysoleniu i dializie, EP – preparat białkowy poddany działaniu enzymów proteolitycznych.

Jednostkę aktywności związków białkowych definiowano jako udział (porcję 60 µl) użytą do oznaczenia aktywności antagonistycznej z najwyższego rozcieńczenia roztworu badanego białka, która hamowała wzrost szczepu wskaźnikowego w teście studzienkowym w czasie 18h. Aktywność wyrażano w J/mg białka.

S – crude supernatant, WD – protein preparation concentrated by ammonium sulfate precipitation and dialysis, EP – protein preparation exposed to proteolytic enzymes.

A unit of the protein preparation defined as the reciprocal of the highest dilution, in 60.0 µl, which gave a clear zone of inhibited growth in a well test in 18 h time. Activity of the protein preparation expressed in U per mg of protein.

badaniach przedstawionych przez Bogovič-Matijašić i wsp. [2] stwierdzono, iż szczep *Lactobacillus acidophilus* LF 221 produkuje przynajmniej dwie bakteriocyny tworzące kompleks białkowy o aktywności antagonistycznej w stosunku do *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* oraz *Listeria innocua*. Jednakże kompleks ten tracił całkowicie swoją aktywność pod wpływem enzymów proteolitycznych (trypsyna, pepsyna, proteinaza K). W przypadku acidocyny J1132 stwierdzono, iż składa się ona z dwóch białek oznaczonych jako α i β , mających wpływ na całkowitą aktywność antagonistyczną bakteriocyny. Obydwa te białka pojedynczo, zarówno α jak i β , posiadały jednak aktywność antagonistyczną w odniesieniu do szczepów testowych, a ich spektrum antagonistyczne było identyczne [8]. Można, więc przypuszczać, iż powodem obniżenia aktywności przeciwbakteryjnej w przypadku preparatu białkowego uzyskanego z hodowli bakterii *Lactobacillus acidophilus* 336, może być kompleksowa budowa związku o aktywności antagonistycznej, w którego skład wchodzi oprócz białka inna część, np.: lipidowa lub węglowodanowa.

Badania zmierzające do charakterystyki chemicznej oraz ustalenia optymalnych warunków syntezy i działania tych związków są kontynuowane.

Wnioski

1. Spośród 20 kultur *L.acidophilus*, wyselekcjonowano 2 szczepy oznaczone symbolami 0.3 i B zdolne do zewnątrzkomórkowej syntezy związków o strukturze białkowej, charakteryzujących się aktywnością antagonistyczną w stosunku do *E.coli* ATCC 25922.
2. Szczep *L.acidophilus* 336 produkował związek białkowy wykazujący aktywność antagonistyczną w odniesieniu do bakterii *S.aureus* ATCC 25923.
3. Związek białkowy syntetyzowany przez *L.acidophilus* 336 nie tracił swojej aktywności antagonistycznej w stosunku do *S.aureus* ATCC 25923 pod wpływem trypsyny, co może wskazywać na jego kompleksową budowę z węglowodanami lub lipidami.

Literatura

- [1] Barnaby-Smith F.M.: Bacteriocins: applications in food preservation, *Trend. Food Scien.Technol.*, **3**, 1992, 133.
- [2] Bogovič-Matijašić B., Rogelj I.: Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF 221 – production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009, *Process Biochemistry*, **33**, 1998, 345.
- [3] Harris L.J., Fleming H.P., Klaenhammer T.R.: Developments in nisin research, *Food Rev. Int.*, **25**, 1992, 57.

- [4] Jimenez-Diaz R., Píad J.C., Ruiz-Barba J.L., Desmazeaud M.J., w: Bacteriocins of lactic acid bacteria, Eds. D. G. Hoover, L.K. Steeson, Academic Press Inc. New York, 1993, 156.
- [5] Lewus C.B., Kaiser A., Montville T.J.: Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1991, 1683.
- [6] Schillinger U., Geisen R., Holzapfel W.H.: Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods, *Trend. Food Sci. Technol.*, **7**, 1996, 158.
- [7] Strus M.: Nowa metoda oceny antagonistycznego działania bakterii kwasu mlekowego (LAB) na wybrane, chorobotwórcze bakterie wskaźnikowe, *Med. Dośw. Mikrobiol.*, **50**, 1998, 123.
- [8] Tahara T., Oshimura M., Umezawa C. Kanatani K.: Isolation, partial characterization, and mode of action of adocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62(3)**, 1996, 892.
- [9] Zamfir M., Callewaert R., Cornea P.C., De Vuyst L.: Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801, *FEMS Microbiol. Lett.*, **190(2)**, 2000, 305.
- [10] Zamfir M., Callewaert R., Cornea P.C., Savu L., Vatafu J., De Vuyst L.: Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801, *J. Appl. Microbiol.*, **87 (6)**, 1999, 923.

BACTERIOCIINOGENIC ACTIVITY OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

S u m m a r y

The aim of the work was to screen bacteriocin-producing strains from among 20 *Lactobacillus acidophilus* strains. It was found that such compounds are produced by strains with the symbols 0.3, 336, B. The protein compounds showed antagonistic activity towards *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 strains. The studies aimed at the characterization of chemical properties of these compounds and optimal conditions for their action are continued.

