

MARCIN JURKOWSKI, MIECZYSLAW BŁASZCZYK

*Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa
E-mail: mrcnjurkowski@gmail.com*

CHARAKTERYSTYKA FIZJOLOGICZNO-BIOCHEMICZNA BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ

WPROWADZENIE

Bakterie fermentacji mlekowej (ang. lactic acid bacteria, LAB) są grupą mikroorganizmów wyróżnioną ze względu na właściwości metaboliczne – fermentację cukrów w warunkach mikroaerofilnych lub ściśle beztlenowych z kwasem mlekowym jako głównym produktem fermentacji glukozy (TANNOCK 1999, PFEILER i KLAENHAMMER 2007). Gatunki należące do bakterii mlekowych można przypisać do trzech rzędów: Lactobacillales i Bacillales, w obrębie typu Firmicutes, oraz Bifidobacteriales z typu Actinobacteria (Vos i współaut. 2009). Oprócz metabolizmu cukrów bakterie mlekowe łączą kilka innych cech. Wszystkie są Gram-dodatnie, katalazo-ujemne i nie wytwarzają spor,

a z racji typu metabolizmu tolerują także niskie pH. Jako mikroorganizmy beztlenowe nie posiadają cytochromów i funkcjonalnego cyklu Krebsa. Brak im także rzęsek (TANNOCK 1999, SAVADOGO i współaut. 2006, KORHONEN 2010). Bakterie mlekowe mają kształt laseczek (np. *Lactobacillus*) lub ziarniaków (*Lactococcus*, *Streptococcus*), a *Bifidobacterium* może przybierać kształt litery Y lub V (TANNOCK 1999, KLAENHAMMER i współaut. 2002). Praca ta poświęcona jest głównie charakterystyce bakterii fermentacji mlekowej pod względem fizjologicznym. Natomiast w niewielkim tylko stopniu porusza ona temat ich biotechnologicznego wykorzystania.

KLASYFIKACJA

Jak już zostało wspomniane, LAB są grupą filogenetycznie niejednorodną. W obrębie typu Actinobacteria grupa bakterii mlekowych obejmuje tylko jedną rodzinę Bifidobacteriaceae, a w niej jeden rodzaj *Bifidobacterium* z ponad 30 gatunkami. Pozostałe gatunki należą do typu Firmicutes, rzędów Bacillales (1 rodzaj) oraz Lactobacillales, który zawiera 6 rodzin. Dokładna systematyka Lactobacillales jest ciągle sprawą otwartą, ponieważ klasyfikacja oparta na cechach fenotypowych (głównie typ fermentacji) nie pokrywa się z prowadzoną w oparciu o sekwencje nukleotydów (MAKAROVA i współaut. 2006).

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

- 1) Lactobacillaceae: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*;
- 2) Aerococcaceae: *Aerococcus*, *Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Ignavigranum*;
- 3) Carnobacteriaceae: *Carnobacterium*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopostipes*, *Desemzia*, *Dolosigranum*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilactobacillus*, *Trichococcus*;

4) Enterococcaceae: *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*;

5) Leuconostocaceae: *Leuconostoc*, *Oecococcus*, *Weissella*;

6) Streptococcaceae: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactovum*

oraz w rzędzie Bacillales

7) Sporolactobacillaceae: *Sporolactobacillus* (Vos i współaut. 2009).

WYSTĘPOWANIE W ŚRODOWISKU

Bakterie kwasu mlekowego są mikroorganizmami powszechnie występującymi w środowisku. Ze względu na ich duże zapotrzebowanie pokarmowe najczęściej znajdowane są one w środowiskach bogatych w węglowodany, aminokwasy i pochodne nukleotydów. Z drugiej strony jednak, wykazują one znaczne przystosowania do trudnych warunków, zwiększając tym samym spektrum zamieszkiwanych przez siebie nisz (KORHONEN 2010).

Jednym ze środowisk, w którym występują LAB jest przewód pokarmowy człowieka i zwierząt. Odnotowano występowanie bakterii mlekowych w ślinie, jelicie cienkim oraz okrężnicy (KORHONEN 2010). Głównymi gatunkami występującymi zarówno u niemowląt, jak i dorosłych ludzi są *Lactobacillus ruminis*, *L. salivarius*, *L. gasseri*, *L. reuteri* oraz *Bifidobacterium longum* i *B. breve* (ISHIBASHI i współaut. 1997, SALMINEN i współaut. 2005). Różnorodność bakterii mlekowych zasiedlających przewód pokarmowy człowieka nie ogranicza się do tych gatunków, a ich skład gatunkowy cały czas się zmienia; większość gatunków kolonizuje przewód pokarmowy tylko na krótki okres (KORHONEN 2010). Liczba mikroorganizmów w jelicie dorosłego człowieka przewyższa liczbę komórek jego ciała 10-krotnie, a skład (który zmienia się wraz z wiekiem lub może być wynikiem choroby, stosowania antybiotyków, różnic w diecie czy czynników środowiskowych populacji) jest unikalny dla każdego człowieka (SALMINEN i współaut. 2005). Naturalne występowanie bakterii mlekowych na roślinach (na owocach, warzywach i ziarnach zbóż) i w mleku umożliwiło ich biotechnologiczne wykorzystanie (MAKAROVA i współaut. 2006). Występujące na winogronach bakterie *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Oenococcus* umożliwiają fermentację moszczu i produkcję wina (DE NADRA 2007).

Bakterie fermentacji mlekowej mogą być również niepożądane. Dzieje się to w przypadku, kiedy powodują one psucie napojów alkoholowych takich jak sake i piwo. LAB powodujące psucie sake są szeroką grupą mikroorganizmów zwanych hiochi bakterie. „Hiochi” jest japońskim słowem określającym fakt psucia się sake po pasteryzacji produktów, z których jest wytwarzane. Hiochi bakterie zostały podzielone na dwie grupy: hiochi-lactobacilli i prawdziwe hiochi-bacilli. Pierwsza składa się z różnych gatunków, w tym *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* i *L. hilgardii*. Generalnie, hiochi-lactobacilli są bardziej wrażliwe na wysokie stężenia etanolu i znośzą je tylko do wartości 16,5% (v/v). Ponadto, są mniej odporne na wysokie temperatury i przeważnie giną podczas procesu pasteryzacji, dlatego powodują dużo mniejsze zagrożenie dla sake. Prawdziwe hiochi-bacilli znośzą wysokie stężenia etanolu, ponad 20% (v/v). Do tej grupy należą dwa główne gatunki, *L. fructivorans* i *L. homohiochi*, które są w stanie przeżyć pasteryzację (SUZUKI i współaut. 2006, 2008).

W środowisku morskim LAB odgrywają rolę w rozkładzie materii organicznej, jednak poznano niewiele ich gatunków z tego środowiska. W okolicach Antarktydy wyizolowano dwa gatunki: *Carnobacterium funditum* i *C. alterfunditum*. *Marinilactobacillus psychrotolerance* został wyizolowany z martwego organizmu morskiego w Japonii, a kilka innych przedstawicieli tego rodzaju odnaleziono w osadzie dennym. *M. piezotolerans* otrzymano z mułu dennego na głębokości 4790,7 m w rowie Nankai. Dwa nowe gatunki, *Halolactobacillus halophilus* i *H. miurensis*, odkryto w żyjących i rozkładających się organizmach morskich, a ekstremalny psychrofil, *Trichococcus patagoniensis*, został wyizolowany z pingwina *Spheniscus magellanicus* w Chile (NAIR i SURENDRAN 2005, KATHIRESAN i THIRUNEELAKANDAN 2008).

GENOMIKA

Ubiegłowieczny, gwałtowny rozwój bioinformatycznych narzędzi analizy DNA i białek umożliwił charakteryzację organizmów żywych pod względem zawartości ich genomu. Dzięki temu, że sekwencja kwasów nukleinowych nie jest podatna na zmianę warunków hodowli, możliwa jest identyfikacja poszczególnych gatunków i porównywanie wyników między grupami badaczy (KLAENHAMMER i współaut. 2005).

Wielkość genomu bakterii kwasu mlekowego zawiera się między 1,8 mln par zasad u *Oenococcus oeni* i 3,3 mln par zasad u *Lactobacillus plantarum*, co wskazuje na stosunkowo niewielki rozmiar, średnio 2 mln par zasad, u gatunków z rzędu *Lactobacillales*. Ponadto, w jego skład wchodzi mała zawartość par guanina-cytosyna, wynosząca przeważnie poniżej 35%; dla *Bifidobacterium* ta wartość zawiera się między 42 a 67%. Geny zawarte w małym genomie LAB odzwierciedlają ich przystosowanie do bogatego w składniki odżywcze środowiska poprzez szeroki wachlarz genów transporterów potrzebnych do efektywnego pobierania związków węgla i azotu, a także ograniczone możliwości biosyntezy, zarówno u szczepów prototroficznych, jak i auktotroficznych (KLIJN i współaut. 2005, MAYO i współaut. 2008).

Mimo filogenetycznego pokrewieństwa przez mały genom, LAB zajmują różne nisze ekologiczne, co sugeruje wystąpienie znacznych genetycznych adaptacji podczas ich ewolucji. Uważa się, że wspólny przodek *Lactobacillales* posiadał co najmniej 2100–2200 genów, w ciągu ewolucji stracił 600–1200, a zyskał poniżej 100 genów, w porównaniu z przodkiem wszystkich *Bacilli* (2700–3700 genów). Większość zmian, które zaszły pod-

czas ewolucji świadczą o przystosowaniu się do środowiska bogatego w składniki pokarmowe. Do genów nabytych w procesie adaptacji można zaliczyć geny szlaku mewałonowego, pozyskane na drodze horyzontalnego transferu genów (HGT), prawdopodobnie od archeonów. Szlak ten zastąpił ścieżkę biosyntezy izoprenoidów z deoksyksylulozy. Gen kinazy mewałonianu uległ duplikacji i razem z pozostałymi trzema genami szlaku mewałonowego (geny kinazy fosfomewałonianu, dekarboksylazy pirofosforanu mewałonianu i izomerazy difosforanu pentyłu) tworzy wspólny operon, który jest konserwowany u wszystkich *Lactobacillales*. Innym genem, nabytym na drodze duplikacji, jest druga enolaza, enzym glikolityczny występujący powszechnie u wszystkich innych bakterii najczęściej w pojedynczej kopii. Ponadto, wiele genów związanych z metabolizmem cukrów i transportem zostało nabytych na drodze HGT lub w wyniku podwojenia liczby kopii. Są to m.in. mutarotaza galaktozy, dehydrogenaza L-mleczanu, czy geny białek biorących udział w transporcie aminokwasów lub oporności na antybiotyki (laktamazy, acylaza penicylinowa). Geny utracone kodowały białka odpowiedzialne za biosyntezę czy sporulację. Na podstawie faktu utraty katalazy i genów oksydazy cytochromowej/hydrochinonowej można stwierdzić, że już wspólny przodek *Lactobacillales* był mikroaerofilem lub bezwzględnie beztlenowcem. Jedynie kilka cech genetycznych, w tym geny glikolizy, zostało powszechnie zachowanych wśród bakterii mlekowych. (KLIJN i współaut. 2005, MAKAROVA i współaut. 2006, PFEILER i KLAENHAMMER 2007, ZHU i współaut. 2009).

WPŁYW CZYNNIKÓW CHEMICZNYCH I FIZYCZNYCH

TEMPERATURA

Temperatura działa na organizmy bezpośrednio, wpływając na szybkość wzrostu, aktywność enzymów, skład chemiczny komórek i wymagania pokarmowe, oraz pośrednio poprzez regulację rozpuszczalności cząsteczek związków wewnątrzkomórkowych, transport jonów, dyfuzję substancji chemicznych i zmianę właściwości osmotycznych błon komórkowych (LIBUDZISZ i współaut. 2007). Ze względu na wymagania tempera-

turkowe bakterie mlekowe można zaliczyć do dwóch grup: mezofili (zdolne do wzrostu w temperaturach umiarkowanych: 20–28°C) oraz termofili (posiadające optimum wzrostu w temperaturze 37–45°C). Przedstawicielami pierwszej grupy są *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* – drugiej natomiast *Streptococcus thermophilus* oraz niektóre gatunki z rodzaju *Lactobacillus*, np. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum* (DE GIORI i współaut. 1985, LIBUDZISZ 2002,

HELINCK i współaut. 2004, LIBUDZISZ i współaut. 2007).

PH

Chociaż LAB są często izolowane z kwaśnych środowisk należy, z pewnymi wyjątkami w rodzaju *Lactobacillus*, uznać je jednak jako neutrofile. Przykładem mogą być gatunki *L. lactis* ssp. *lactis* i *L. lactis* ssp. *cremoris*, dla których pH optymalne wynosi 6,3–6,9 lub *S. thermophilus*, który najlepiej rośnie w pH zawierającym się między 6,5 a 7,5. Spośród LAB używanych jako kultury startowe, tylko bakterie *Lactobacillus* (*L. helveticus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) preferują środowisko o pH 5,5–5,8 (DE GIORGI i współaut. 1985).

Podczas wzrostu i fermentacji pH podłoża (pH_{out}) obniża się na skutek akumulacji kwasów organicznych, początkowo kwasu mlekowego. Jednakże pH cytoplazmy (pH_{in}) fermentujących bakterii mlekowych pozostaje bardziej zasadowe niż otoczenie, głównie dzięki sprawnym mechanizmom regulacji gradientu pH (pompy protonowe, system symportu protonów, produkcja kwasów i zasad). Wraz ze spadkiem pH podłoża z 6,8 do 5,0, pH_{in} jest utrzymywane blisko poziomu neutralnego. Jednakże dalsze obniżenie odczynu powoduje, że komórki nie są w stanie utrzymać wysokiego gradientu pH (ΔpH), które załamuje się, a żywotność komórki zostaje obniżona (DE GIORGI i współaut. 1985). Na przykład, według badań *L. lactis* ssp. *lactis* oraz *Leuconostoc mesenteroides* utrzymują pH_{in} około 7,0, nawet gdy pH zewnątrzkomórkowe wynosi 5,0. Natomiast w przypadku rodzaju *Lactobacillus* pH_{in} obniża się wraz ze spadkiem pH_{out} , ale tylko do stopnia umożliwiającego wygenerowanie i utrzymanie odpowiedniego ΔpH . *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *L. casei* są w stanie rosnać dopóki pH_{in} nie spadnie poniżej 4,4; w przypadku *L. plantarum* ta wartość wynosi 4,7. Sugeruje się, że wartości wielu aktywności metabolicznych są skorelowane z nieznacznymi, nawet o części dziesiąte, zmianami pH_{in} . (HUTKINS i NANNEN 1993, ZANNINI i współaut. 2005, SHAO-CHI i współaut. 2007).

WARUNKI TLENOWE

LAB należą do obligatoryjnych (*Bifidobacterium*) lub względnych beztlenowców (*Lactobacillales*), więc brak im efektywnych mechanizmów obrony przez tlenem, takich jak np. katalaza. Beztlenowość wiąże się także z

niemożnością syntezy cytochromów i innych enzymów zawierających hem, ważnych w łańcuchu transportu elektronów. Skazuje to więc bakterie kwasu mlekowego na całkowitą zależność od fermentacji i brak możliwości syntezy ATP przez oddychanie komórkowe (TALWALKAR i KAILASAPATHY 2004).

ANTYBIOTYKI

Przez oporność na antybiotyki rozumie się zdolność bakterii do przeżycia w obecności tegoż przeciwbakteryjnego czynnika. Należy rozróżnić oporność naturalną i nabytą. Naturalna (dziedziczna) oporność na dany antybiotyk może być specyficzna dla gatunku lub rodzaju. Nie jest ona horyzontalnie przekazywana i nie ma znaczenia w przypadku niepatogennych bakterii. Natomiast nabyta oporność jest obecna w niektórych szczepach w obrębie gatunku generalnie wrażliwego na dany antybiotyk. Może być ona rozprzestrzeniona horyzontalnie i wynika z mutacji w genomie lub przez nabycie dodatkowego genu kodującego mechanizm oporności, jakim może być zmiana przepuszczalności błony, enzymatyczna inaktywacja antybiotyku, aktywny transport antybiotyku, modyfikacja celu antybiotyku (np. metylacja 23S rRNA) lub zmiana związanej z nim ścieżki metabolicznej (MATHUR i SINGH 2005). Oporności na antybiotyki bakterii z poszczególnych rodzajów przedstawione są w Tabeli 1.

ZWIĄZKI CHMIELOWE

Kwasy goryczkowe, których źródłem jest chmiel, to izo- α -kwasy występujące w piwie w stężeniu 17–55 ppm. Działają one jako protonofory i wywierają przeciwbakteryjny efekt na Gram-dodatnie bakterie, wliczając w to większość szczepów bakterii mlekowych. Warunki stresu chmielowego zmniejszają również poziom wewnątrzkomórkowego manganu, prowadząc do inhibicji aktywności metabolicznej u wrażliwych na chmiel szczepów LAB. Oporność na związki chmielowe jest cechą charakterystyczną danego szczepu LAB i odróżnia go od innych szczepów należących do tego samego gatunku (SUZUKI i współaut. 2006, SUZUKI i współaut. 2008).

Jednym z białek transbłonowych biorącym udział w oporności na kwasy chmielowe jest kodowane na plazmidzie białko horA. Jest to błonowy transporter ABC (ang. ATP-binding cassette transporter). Działanie tego białka polega na aktywnym wydalaniu gorzkich kwasów chmielowych poza komórkę. Drugim białkiem związanym z oporno-

Tabela 1. Bakterie fermentacji mlekowej – oporność/wrażliwość na antybiotyki (MATHUR i SINGH 2005, AMMOR i współaut. 2008, BERNARDEAU i współaut. 2008, KORHONEN 2010).

Antybiotyk	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
cefalosporyny	i		s	s	
klindamycyna	i	s	s		
wankomycyna	a	i	i	s	
neomycyna	i	i		v	v
kanamycyna	i	i	i	v	v
gentamycyna	s	i	i	v	v
streptomycyna	i	i/a	i	v	v
trimetoprim/ sulfmetoksazol		i	i	i	v
tetracyklina	s	s/a	s/a	s	s
oksacylina	i	s		s	
ampicylina		s	s	s	
penicylina	s	s	s	s	v
chloramifenikol	s	s	s	s	s
polimyksyna		i	i		v
erytromycyna	s	s/a	s/a	s/a	
kwas nalidyksowy		i	i		v

i – oporność naturalna, a – oporność nabyta, v – oporność zróżnicowana, s – wrażliwość, l – obniżona wrażliwość

ścią na kwasy chmielowe jest białko horC. Aktywność horA i horC prawdopodobnie skutkuje zmniejszonym napływem niezdysocjowanych, przenikających przez błonę kwasów chmielowych do cytoplazmy, co, tym samym, zmniejsza protonoforyczny efekt o charakterze przeciwbakteryjnym. Innym mechanizmem oporności jest ten, oparty na działaniu ATP-az przenoszących protony. Bakterie chronią się przed antyseptycznym działaniem kwasów goryczkowych przez zwiększenie wydalania protonów poza komórkę, tym samym utrzymując wysoki transbłonowy gradient pH. Utrzymanie odpowiedniego poziomu manganu możliwe jest dzięki działaniu białka HitA, transportera kationów dwuwartościowych. Niezależnym od energii systemem ochronnym są zlokalizowane w ścianie komórkowej kwasy lipotejchowe, które stanowią rezerwuuar kationów dwuwartościowych. Natomiast obserwacje morfologiczne wskazują, że bakterie mlekowe występujące w piwie mają kształt krótszych pałeczek, co sugeruje, że mniejsza powierzchnia komórki jest korzystna w efektywnej mobilizacji me-

chanizmów obronnych (SUZUKI i współaut. 2006; SUZUKI i współaut. 2008).

ALKOHOL

Innym typem napoju, którego zepsucie może być spowodowane przez bakterie kwasu mlekowego, jest sake. W tym przypadku oporność związana jest z możliwością wzrostu w środowisku zawierającym wysokie stężenie etanolu sięgające 15–20% (v/v). Bakterie powodujące psucie sake zalicza się do alkoholofili, co oznacza, że obecność etanolu w stężeniu 7% poprawia ich wzrost, podczas gdy zwykle LAB mają zakłócony wzrost przy każdym stężeniu. Według badań, obecność 10% etanolu nieistotnie wpływa na pobieranie glukozy przez bakterie powodujące psucie sake, podczas gdy u wrażliwych na alkohol LAB inhibicja tego procesu jest znaczna. Podobnie jak w przypadku oporności na związki chmielu, zmniejszenie powierzchni komórki sprzyja większej tolerancji etanolu. Także grubość ściany komórkowej ma wpływ na oporność na alkohol – w jego obecności grubość ściany zwiększa się, co utrudnia wnikanie. W

obecności etanolu, 30–40% tłuszczowych łańcuchów acylowych błon stanowią mononie-

nasycone kwasy o zawierające co najmniej 20 atomów węgla (SUZUKI i współaut. 2008).

METABOLIZM CUKRÓW

Ze względu na sposób metabolizowania heksoz bakterie kwasu mlekowego można podzielić na homofermentatywne, tj. takie, które wytwarzają wyłącznie lub prawie wyłącznie (90%) kwas mlekowy, oraz heterofermentatywne – produkujące oprócz kwasu mlekowego także dwutlenek węgla, kwas octowy, kwas mrówkowy i/lub etanol (MAKAROVA i współaut. 2006). Przedstawicielami pierwszej grupy są *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lb. plantarum* i *Lb. acidophilus*, drugiej natomiast bakterie z rodzaju *Leuconostoc* i niektórzy przedstawiciele rodzaju *Lactobacillus* – *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* (LIBUDZISZ i KOWAL 2000). Podstawowym substratem fermentacji wykorzystywanym przez LAB zasiedlające mleko jest laktoza. Wolna laktoza jest wewnątrzkomórkowo hydrolizowana do glukozy i galaktozy przy udziale β -galaktozydazy. Glukoza jest gotowym substratem do dalszych przemian metabolicznych, natomiast galaktoza musi wcześniej ulec przemianie do ufosforylowanej glukozy przy udziale swoistej galaktokinazy. Ufosforylowana laktoza jest hydrolizowana przez fosfo- β -galaktozydazę do glukozy i galaktozo-6-fosforanu, który jest przekształcany w fosfodihydroksyaceton i aldehyd trifosfoglicerynowy w szlaku tagatozowym, i dopiero wtedy może być dalej metabolizowany (LIBUDZISZ i KOWAL 2000, SCHLEGEL 2005). Dalsza przemiana heksoz zależy od typu fermentacji mlekowej.

HOMOFERMENTACJA MLEKOWA

W homofermentacji mlekowej metabolizm glukozy odbywa się na drodze glikolizy, gdzie z jednej cząsteczki glukozy powstają 2 cząsteczki pirogronianu, 2 cząsteczki ATP oraz 2 cząsteczki NADH^+ , które zużywane są następnie do redukcji pirogronianu do kwasu mlekowego. Powstanie kwasu mlekowego jest możliwe dzięki aktywności enzymu dehydrogenazy mleczanowej. Jedynie niewielka część pirogronianu ulega dekarboksylacji z uwolnieniem octanu, etanolu i CO_2 . Ilość produktów ubocznych zależy od dostępności tlenu (HOLS i współaut. 2005, NEVES i współaut. 2005, WEE i współaut. 2006).

HETEROFERMENTACJA MLEKOWA

Odrębność metaboliczna tej grupy organizmów jest wynikiem braku niektórych enzymów glikolizy, aldolazy i izomerazy triozofosforanowej. Początkowy rozkład glukozy zachodzi więc wyłącznie w szlaku pentozofosforanowym, tj. przez glukozo-6-fosforan, 6-fosfoglukonian i rybulozo-5-fosforan, który jest następnie przekształcany przez epimerazę do ksylulozo-5-fosforanu. Ten z kolei, w reakcji wymagającej pirofosforanu tiaminy, jest rozszczepiany przez fosfoketolazę z wytworzeniem aldehydu 3-fosfoglicerynowego i acetylofosforanu. Acetylofosforan ulega albo przekształceniu do octanu przez kinazę octanową, z równoczesną fosforylacją ADP (*Lactobacillus brevis*), albo redukcji do etanolu poprzez acetylo-CoA i aldehyd octowy (*Leuconostoc mesenteroides*). Aldehyd 3-fosfoglicerynowy jest utleniany w szlaku fruktozobisfosforanowym i przekształcany ostatecznie w kwas mlekowy (SCHLEGEL 2005, NEVES i współaut. 2005, MILLS i współaut. 2005).

Zdolność do wytwarzania kwasu mlekowego przez *Bifidobacterium* spp. pozwoliła zaklasyfikować bakterie z tego rodzaju do grupy bakterii mlekowych, mimo że są one filogenetycznie odległe (należą do typu Actinobacteria). Można je zaliczyć do grupy bakterii heterofermentatywnych, gdyż z 2 cząsteczek glukozy wytwarzają 2 cząsteczki kwasu mlekowego i 3 cząsteczki kwasu octowego. U *Bifidobacterium* fermentacja odbywa się w szlaku fosfoketolazowym. Bakterie te nie posiadają aldolazy ani dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu, lecz wytwarzają fosfoketolazę, które rozszczepiają fruktozo-6-fosforan do acetylofosforanu oraz ksylulozo-3-fosforan do erytrozo-4-fosforanu lub aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Z acetylofosforanu i ksylulozo-3-fosforanu powstaje octan, natomiast aldehyd 3-fosfoglicerynowy jest przekształcany w mleczan (TANNOCK 1999, PALFRAMAN i współaut. 2003).

Bakteryjne egzopolisacharydy (EPS) są zewnętrzkomórkowymi polisacharydami, które wiążą się z powierzchnią ściany komórkowej w formie otoczek lub są wydzielane do środowiska pozakomórkowego w formie śluzu. Większość bakterii mlekowych produkują

cych EPS należy do rodzajów *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*; wykazano także zdolność do produkcji biopolimerów u niektórych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* (RICH i współaut. 2010). Biologiczną rolą bakteryjnych egzopolisacharydów jest ochrona komórek przed wysychaniem, fagocytozą, atakiem fagów, antybiotykami lub substancjami toksycznymi, pożarciem przez protisty czy stresem osmotycznym; umożliwiają także tworzenie biofilmów. Jest mało prawdopodobne, że EPS służą jako rezerwa pokarmowa, ponieważ większość bakterii produkujących śluz nie jest zdolna do katabolizowania egzopolisacharydów, które wytwarzają (CERNING 1995, DE VUYST i DEGEEST 1999, RUAS-MADIEDO i DE LOS REYES-GAVILAN 2005).

METABOLIZM AZOTU

Bakterie kwasu mlekowego pobierają aminokwasy lub peptydy, będące produktami proteolizy białek dostępnych w środowisku. W warunkach niedoboru substancji pokarmowych niektóre ważne aminokwasy mogą być syntetyzowane z intermediatów metabolicznych pochodzących od kwasów organicznych. Przykładem może być synteza L-asparaginy, L-izoleucyny i L-cysteiny (w różnych kombinacjach, nigdy przy braku wszystkich trzech aminokwasów) z kwasu L-jabłkowego i cytrynowego u szczepów *Oenococcus oeni* (DE NADRA 2007).

Katabolizm aminokwasów może odgrywać istotną rolę w uzyskiwaniu energii w środowiskach ubogich w składniki pokarmowe. Niektóre z LAB są w stanie wykorzystywać argininę. Nie jest to jednak cecha stała, a zależy od gatunku lub szczepu. *Oenococcus oeni* różni się zdolnością do degradacji argininy. Heterofermentatywne bakterie z rodzaju *Lactobacillus* taką zdolność posiadają, podczas gdy homofermentatywne bakterie z rodzajów *Lactobacillus* oraz *Pediococcus* nie są w stanie wykorzystywać argininy jako źródła energii. Degradacja argininy zachodzi z udziałem ścieżki deiminazy argininy, w której udział biorą deiminaza argininy (ADI), transkarbamylaza ornityny (OTC) i kinaza karbaminianowa (CK). Z jednego mola argininy powstają dwa mole amoniaku oraz po jednym dwutlenku węgla, ornityny i ATP. Niemożność katabolizowania argininy przez niektóre szczepy *O. oeni* wynika z braku obecności

Proces biosyntezy niektórych homopolisacharydów, np. dekstranów, mutanów, alternanów i lewanów, przebiega zewnątrzkomórkowo i wymaga specyficznego substratu – sacharozy. Reakcję polimeryzacji katalizuje wysoce specyficzna transferaza glikozydowa. Energia potrzebna do polimeryzacji pochodzi z hydrolizy sacharozy. Heteropolisacharydy natomiast powstają na drodze polimeryzacji powtarzających się jednostek prekursorów uformowanych w cytoplazmie. Kilka enzymów i/lub białek jest zaangażowanych w proces biosyntezy i sekrecji heteroegzopolisacharydów, które nie są konieczne specyficzne dla procesu formowania EPS (NEVES i współaut. 2005, SEMJONOV i współaut. 2008).

któregoś z enzymów szlaku deiminazy argininy, np. brak ADI uniemożliwia wykorzystanie argininy, lecz cytrulina może być rozłożona do ornityny, dwutlenku węgla i amoniaku (DE NADRA, 2007, LIU i współaut. 2010).

U LAB katabolizm aminokwasów jest inicjowany głównie przez reakcję transaminacji, która wymaga obecności α -ketokwasu jako akceptora grupy aminowej. Produkcja α -ketokwasu przez LAB często ogranicza katabolizm aminokwasów, jednak szczepy posiadające aktywność dehydrogenazy glutaminianowej (GDH) są w stanie wyprodukować α -ketoglutaran z glutaminianu (LIU i PILONE 1998).

Kwasy, alkohole i aldehydy mogą być wyprodukowane z α -ketokwasów na drodze dwóch różnych ścieżek:

- 1) dekarboksylacja α -ketokwasu do aldehydu przez dekarboksylazę α -ketokwasów (KADC), po której następuje redukcja lub oksydacja aldehydu, odpowiednio do alkoholu lub kwasu;

- 2) oksydacyjna dekarboksylacja α -ketokwasu do acylo-koenzymu A (acylo-CoA) przez dehydrogenazę α -ketokwasów (KADH). Acylo-CoA może następnie zostać przekształcony do kwasu karboksylowego przez hydrolazę acylo-CoA lub zredukowany do aldehydu przez reduktazę acylo-CoA. Aldehyd z kolei może zostać utleniony lub zredukowany do kwasu lub alkoholu (HELINCK i współaut. 2004).

BAKTERIOCYN LAB

Wiele Gram-ujemnych i Gram-dodatnich bakterii, a w tym bakterie kwasu mlekowego, produkuje podczas wzrostu białkowe substancje o właściwościach przeciwbakteryjnych, zwanych bakteriocynami. Cechą odróżniającą bakteriocyny od antybiotyków jest to, że ich działanie jest specyficzne do szczepów gatunków powiązanych z gatunkiem produkującym daną bakteriocynę. Natomiast antybiotyki mają szerszy zakres działania, który nie wykazuje szczególnych preferencji co do spokrewnionych mikroorganizmów. Również stężenie wymagane do ich efektywnego działania jest niższe niż w przypadku antybiotyków. Ponadto, bakteriocyny są syntetyzowane rybosomalnie podczas początkowej fazy wzrostu, a antybiotyki są zazwyczaj metabolitami wtórnymi wytwarzanymi przez wieloenzymatyczne kompleksy (ZACHAROF i współaut. 2010). Bakteriocyny są kationowymi białkami lub polipeptydami o właściwościach hydrofobowych lub amfifilnych oraz posiadają małą masę molekularną, rzadko przekraczającą 10 kDa. Syntetyzowane jako pre-propeptydy, bakteriocyny ulegają obróbce i są wydzielane poza komórkę, a ich produkcja jest związana ze wzrostem: pojawia się zazwyczaj podczas początkowej fazy wzrostu i ustaje pod koniec fazy wykładniczej. Związki z tej klasy produkowane przez LAB (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*) mają większe spektrum działania niż produkowane przez *E. coli* kolicyny. Działanie większości bakteriocyn bakterii mlekowych polega na formowaniu porów w dwuwarstwie fosfolipidowej i niwelacji siły protonomotorycznej. Wszystkie bakterie są odporne na działanie wyprodukowanej przez siebie bakteriocyny (SAVADOGO i współaut. 2006). Obecnie bakteriocyny bakterii Gram-dodatnich podzielone są na cztery główne klasy:

1. Lantybiotyki. Są to bakteriocyny zawierające pierścień lantioninowy. Obecnie scharakteryzowano ponad 40 lantybiotyków wykazujących większe zróżnicowanie niż początkowo uważano, co utrudnia stworzenie uniwersalnego kryterium ich podziału na podgrupy (NES i współaut. 2007). W przeciwieństwie do strukturalnie prostszych bakteriocyn klasy drugiej, lantybiotyki podlegają modyfikacjom potranslacyjnym podczas ich biosyntezy. Geny tego procesu zostały dokładnie scharakteryzowane; znajdują się one najczęściej na plazmidzie lub innym ruchomym elemencie genetycznym i są zorganizowane

wane w operony. Strukturalny gen bakteriocyny koduje preformę zawierającą liderową sekwencję podwójnej glicyny na N-końcu, która, jak się wydaje, powoduje biologiczną nieaktywność podczas przebywania w komórce i zapewnia rozpoznanie sygnału przez system transportowy. Ponadto, w niedalekiej odległości znajdują się geny oporności chroniące gospodarza przed działaniem własnej bakteriocyny, gen kodujący związany z błoną transporter typu ABC przenoszący lantybiotyki przez błonę (BECKER 2005). W procesie obróbki lantybiotyku bierze udział kilka genów: gen proteazy serynowej usuwający sekwencję liderową z propeptydu, dwa geny enzymów zaangażowanych w formowanie lantioniny i metylolantioniny oraz geny białek regulatorowych, które transmitują zewnętrzny sygnał tym samym indukując produkcję antybiotyku (NES i współaut. 2007, ZHU i współaut. 2009).

2. Niezmodyfikowane bakteriocyny termostabilne.

3. Duże termolabilne bakteriocyny.

4. Bakteriocyny cykliczne.

Bakteriocyny znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym jako naturalne konserwanty. Mogą być stosowane w formie oczyszczonej lub surowej. Jednakże użycie wyłącznie bakteriocyny nie jest w stanie zapewnić pełnego bezpieczeństwa, szczególnie w stosunku do bakterii Gram-ujemnych. Dlatego stosowanie bakteriocyn musi być połączone z innymi technologiami, które mogą niszczyć ścianę komórkową, umożliwiając bakteriocynom unieszkodliwienie patogenów (DIEZ-GONZALES 2007). Bakteriocynami o dużym znaczeniu przemysłowym są nizyna, plantarycyna, pediocyna i laktacyna, przy czym największą wagę ma nizyna. Składa się ona z 34 aminokwasów (2,9 kDa), jest produkowana przez *Lactococcus lactis* oraz występuje w dwóch formach, A i Z, różniących się jednym aminokwasem. Jej działanie może hamować wzrost bakterii patogennych i powodujących psucie się produktów spożywczych: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*. Wiele badań potwierdziło także obecność nizyny w ludzkim mleku, co chroni matki przed infekcjami piersi oraz niemowlęta przed patogennym *Staphylococcus aureus* stanowiącym naturalną mikroflorę skóry. Ponadto zapobiega ona rozwojowi *Clostridium*

w serach i ich przetworach, bakterii *Lactobacillus* w piwie i winach, hamuje wzrost niektórych psychrotolerantów w twarogach oraz zapewnia dodatkową ochronę przed sporującymi bakteriami *Bacillus* i *Clostridium* w kon-

serwach. Nizyna jest jedyną bakteriocyną zatwierdzoną jako bezpieczny dodatek do żywności. Stosuje się ją w ponad 50 krajach pod nazwą handlową Nisaplin (AMMOR i współaut. 2006, ZHU i współaut. 2009).

NIEBEZPIECZNE PRODUKTY METABOLICZNE

W produkcji winnej jedną z głównych obaw dotyczących metabolizmu bakterii kwasu mlekowego jest produkcja karbaminianu etylu, posiadającego właściwości kancerogenne. Związek ten to produkt metabolizmu cytruliny i argininy. Występuje kilka źródeł jego wytworzenia, zawsze jest to spontaniczna reakcja chemiczna, w której udział bierze etanol oraz związek zawierający grupę karbamoilową, jak np. mocznik, cytrulina czy fosforan karbamylu (MILLS i współaut. 2005, DE NADRA 2007).

Aminy biogenne, organiczne zasady o niskiej masie cząsteczkowej, mogą być formowane i degradowane jako wynik normalnego metabolizmu organizmów żywych. Ich produkcja, polegająca na dekarboksylacji aminokwasów, jest kojarzona z mechanizmami obronnymi mikroorganizmów. Aminy biogenne, takie jak tyramina i diaminy (putrescyna, kadaweryna), są opisane jako prekursorzy kancerogennych nitrozoamin (LIU i współaut. 2010). Bakterie kwasu mlekowego są znane jako główni producenci amin biogennych w napojach alkoholowych. Najczęstszą biogen-

ną aminą w winie jest putrescyna, w piwie natomiast agmatyna. Agmatyna produkowana jest jako produkt pośredni podczas produkcji putrescyny z argininy. Przekształcenie agmatyny w putrescynę nie wymaga dekarboksylacji ani wytworzenia mocznika. Degradacja agmatyny zwiększa przeżywalność mikroorganizmów oraz powoduje alkalizację podłoża. Natomiast wytworzenie putrescyny zmniejsza obecność kwasu protokatechowego, waniliowego i kawowego oraz flawonoidów – katechiny i rutyny. W winach, poza putrescyną, występują spore ilości histaminy, tyraminy i fenyloetyloaminy. Ich obecność jest skorelowana z występowaniem bakterii kwasu mlekowego. Produkcja fenyloetyloaminy jest powiązana z produkcją tyraminy u *L. brevis* i *L. hilgardii*. Ta korelacja może być wyjaśniona faktem, iż fenyloetyloamina jest również substratem dla dekarboksylazy tyrozyny, produkującej fenyloetyloaminę w drugorzędowej reakcji. Poza tym w winach można też znaleźć śladowe ilości kadaweryny i tryptaminy (MILLS i współaut. 2005, DE NADRA 2007).

ZASTOSOWANIE BIOTECHNOLOGICZNE

PRZEMYSŁ SPOŻYWCZY

W przemyśle spożywczym bakterie mlekowe używane są najczęściej jako kultury startowe, szczegółowo wybrane i propagowane kultury znanych szczepów bakterii lub drożdży przeprowadzające odpowiedni typ fermentacji (homomlekową, heteromlekową, cytrynową itd.). LAB wykorzystuje się głównie do produkcji wyrobów mlecznych (sery, jogurty, fermentowane napoje, itd.), kiszzonej kapusty, korniszonów i oliwek. W produkcji wina bakterie kwasu mlekowego, głównie *Oenococcus oeni*, przeprowadzają fermentację jabłkowo-mlekową (MLF) poprzez dekarboksylację L-jabłczanu do L-mleczanu i dwutlenku węgla (ZACHAROF i współaut. 2010).

KWAS MLEKOWY

Do przemysłowej produkcji kwasu mlekowego używa się tylko homofermentatywnych szczepów bakterii mlekowych, jako że wytwarzają one z glukozy prawie wyłącznie mleczan (YOUNG-YUNG i współaut. 2006). Kwas mlekowy znajduje zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, z których cztery główne to: przemysł spożywczy (regulacja pH, poprawa jakości mikrobiologicznej przetworów mięsnych), kosmetyczny (wygładza i odmładza skórę), farmaceutyczny (składnik protez oraz szwów chirurgicznych) i chemiczny (rozpuszczalnik, środek czyszczący, pochłaniacz wilgoci) (PROBERT i GIBSON 2002, YOUNG-YUNG i współaut. 2006, SEMJONOV i współaut. 2008, ZHU i współaut. 2009).

BAKTERYJNE EGZOPOLISACHARYDY

Bakteryjne egzopolisacharydy (EPS) znajdują zastosowanie w przemyśle; są to m. in. dekstrany, ksantany i pululany. Przemysłowe dekstrany są używane w produkcji żelów filtracyjnych, jako zagęszczacze krwi, substancje poprawiające przepływ krwi, także jako stabilizatory syropów spożywczych (DE VUYST I DEGEEST 1999).

PROBIOTYKI

Obecnie probiotyki są definiowane jako pojedyncze lub mieszane kultury żywych mikroorganizmów, które podawane człowiekowi lub zwierzętom poprawiają ich stan zdrowia. Wpływ ten wynika głównie z zapewnienia przez kultury probiotyczne właściwej równowagi mikroflory jelitowej (LIBUDZISZ 2002). Aby uznać dany szczep za probiotyczny, musi on spełniać wyznaczone kryteria. Podstawowym kryterium, uzasadnionym ekologicznie, jest pochodzenie z organizmu, dla którego dany probiotyk jest przeznaczony. Co więcej, szczepy probiotyczne muszą przeżyć drogę przez żołądek i tolerować sole żółciowe oraz powinny przylegać do nabłonka jelita i w ten sposób oprzeć się przepływowi strawionej treści (MORELLI 2000). Bardzo ważny jest pozytywny wpływ na konsumenten-

ta, najlepiej z wyjaśnionym mechanizmem działania. Probiotyki powinny poza tym: mieć dokładnie określoną przynależność systematyczną, być genetycznie stabilne, produkować substancje przeciwbakteryjne, tj. bakteriocyny, kwasy organiczne, być antagonistyczne w stosunku do patogennych/kancerogennych bakterii, stymulować system odpornościowy oraz przeżyć proces produkcji i przechowywania (KULLEN I KLAENHAMMER 2000, SANDERS i współaut. 2007). Jednakże jest mało prawdopodobne, aby każdy szczep danego gatunku posiadał wszystkie cechy charakteryzujące probiotyki (MORELLI 2000).

Uważa się, że bakterie mlekowe posiadają status GRAS (ang. generally regarded as safe), co oznacza, że są bezpieczne przy odpowiednim stosowaniu. Nadanie statusu GRAS może bazować na istniejących dowodach w literaturze naukowej lub długiej historii bezpiecznego użycia. Tylko kilka probiotycznych mikroorganizmów znajduje się na oficjalnej liście GRAS. Często wszystkie probiotyki mylnie uważane są za GRAS. Należy pamiętać, że nie każdy produkt mający w składzie probiotyk jest uważany za bezpieczny, nawet jeśli zawiera gatunki *Lactobacillus* czy *Bifidobacterium* (SANDERS i współaut. 2007).

CHARAKTERYSTYKA FIZJOLOGICZNO-BIOCHEMICZNA BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ

Streszczenie

Bakterie fermentacji mlekowej (ang. Lactic Acid Bacteria – LAB) są grupą mikroorganizmów wyróżnioną ze względu na podobne właściwości metaboliczne. Procesem umożliwiającym im zdobycie energii jest fermentacja mlekowa, której głównym produktem jest zawsze kwas mlekowy. Ze względu na typ fermentacji wyróżnia się bakterie hetero- i homofermentatywne. Filogenetycznie LAB obejmują 3 rzędy – Lactobacillales, Bacillales i Bifidobacteriales. Ewolucyjne wyodrębnienie się tej grupy zaszło dzięki genetycznemu przystoso-

waniu do środowiska bogatego w substancje pokarmowe poprzez nabycie genów transporterów błonowych i utratę genów szlaków biosyntezy. Jako aukсотrofny, LAB katabolizują aminokwasy, w wyniku czego mogą powstawać niebezpieczne metabolity, takie jak karbaminian etylu i aminy biogenne. Ponieważ bakterie fermentacji mlekowej są powszechnie wykorzystywane biotechnologicznie, brak zdolności do wytwarzania takich związków musi być potwierdzony u szczepów przemysłowych.

PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF LACTIC ACID BACTERIA

Summary

Lactic acid bacteria (LAB) are a group of microorganisms encompassing bacteria with similar metabolic capacities. The process which enables them to gain energy is lactic acid fermentation, where lactic acid is the major product. Taking into consideration the type of fermentation, LAB can be divided into two groups – hetero- and homofermentative. Phylogenetically, LAB are comprised of 3 orders: Lactobacillales, Bacillales and Bifidobacteriales. Their evolutionary separation was preceded by the ge-

netic adjustment to the environment rich in nutrients through the gain of genes encoding membrane transporters and the loss of genes encoding biosynthetic pathways. As auxotrophic organisms, they catabolise amino acids – i.e. arginine, methionine and phenylalanine, which can be turned into harmful metabolites such as ethyl carbamate or biogenic amines. Since lactic acid bacteria are ubiquitously used in biotechnology, the inability to produce such compounds by industrial strains must be confirmed.

LITERATURA

- AMMOR S., TAVERON G., DUFOUR E., CHEVALLIER I., 2006. *Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility*. Food Control 17, 454–461.
- BECKER P., 2005. *Physiological Achilles' Heels of Enteropathogenic Bacteria in Livestock*. Curr. Issues Intest. Microbiol. 6, 31–54.
- BERNARDEAU M., VERNOUX J., HENRI-DUBERNET S., GUÉGUEN M., 2008. *Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus*. International Journal of Food Microbiology. 126, 278–285.
- CERNING J., 1995. *Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria*. Lait 75, 463–472.
- DE GIORI G., DE VALDEZ G., DE RUIZ HOLGADO A., OLIVER G., 1985. *Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria*. J. Dairy Sci. 68, 2160–2164.
- DE NADRA M., 2007. *Nitrogen metabolism in lactic acid bacteria from fruits: a review*. Commun. Curr. Res. Educ. Topics Trends Applied Microbiol. 1, 500–510.
- DE VUYST L., DEGEEST B., 1999. *Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol. Rev. 23, 153–177.
- DIEZ-GONZALES F., 2007. *Applications of Bacteriocins in Livestock*. Curr. Issues Intest. Microbiol. 8, 15–24.
- HELINCK S., LE BARS D., MOREAU D., MIREILLE YVON., 2004. *Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3855–3861.
- HOLS P., HANCY F., FONTAINE L., GROSSIORD B., PROZZI D., LEBLOND-BOURGET N., DECARIS B., BOLOTIN A., DELORME C., EHRLICH S., GUEDON E., MONNET V., RENAULT P., KLEEREBEZEM M., 2005. *New insight in the molecular biology and physiology of Streptococcus thermophilus revealed by comparative genomics*. FEMS Microbiol. Rev. 29, 435–465.
- HUTKINS R., NANNEN N., 1993. *pH homeostasis in lactic acid bacteria*. J. Dairy Sci. 76, 2354–2365.
- ISHIBASHI N., YAESHIMA T., HAYASAWA H., 1997. *Bifidobacteria: their significance in human intestinal health*. Malaysian J. Nutrit. 3, 149–159.
- KATHIRESAN K., THIRUNEELAKANDAN G., 2008. *Prospects of lactic acid bacteria of marine origin*. Indian J. Biotechnol. 7, 170–177.
- KLAENHAMMER T., ALTERMANN E., ARIGONI F., BOLOTIN A., BREIDT F., BROADBENT J., CANO R., CHAILLOU S., DEUTSCHER J., GASSON M., VAN DE GUCHTE M., GUZZO J., HARTKE A., HAWKINS T., HOLS P., HUTKINS R., KLEEREBEZEM M., KOK J., KUIPERS O., LUBBERS M., MAGUIN E., MCKAY L., MILLS D., NAUTA A., OVERBEEK R., PEL H., PRIDMORE D., SAIER M., VAN SINDEREN D., SOROKIN A., STEELE J., O'SULLIVAN D., DE VOS W., WEIMER B., ZAGOREC M., SIEZEN R., 2002. *Discovering lactic acid bacteria by genomics*. Kluwer Acad. Publ. 82, 29–58.
- KLAENHAMMER T., PERIL A., BARRANGOU R., DUONG T., ALTERMANN T., 2005. *Genomic perspectives on probiotic lactic acid bacteria*. Biosci. Microflora 24, 31–33.
- KLIJN A., MERCENIER A., ARIGONI F., 2005. *Lessons from the genome of bifidobacteria*. FEMS Microbiol. Rev. 29, 491–509.
- KORHONEN J., 2010. *Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria*. Dissertations in Forestry and Natural Sciences. Publications of the University of Eastern Finland, Kuopio.
- KULLEN M., KLAENHAMMER T., 2000. *Genetic modification of intestinal Lactobacilli and Bifidobacteria*. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2, 41–50.
- LIBUDZISZ Z., 2002. *Probiotyki i prebiotyki w fermentowanych napojach mlecznych*. Pediatria Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka 4, 19–25.
- LIBUDZISZ Z., KOWAL K., 2000. *Mikrobiologia techniczna*. Tom II. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź.
- LIBUDZISZ Z., KOWAL K., ŻAKOWSKA Z., 2007. *Mikrobiologia techniczna*. Tom I. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- LIU M., BAYJANOV J., RENCKENS B., NAUTA A., SIEZEN R., 2010. *The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison*. BMC Genomics 11, 1–15.
- LIU S., PILONE G., 1998. *A review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance*. J. Appl. Microbiol. 84, 315–327.
- MAKAROVA K., SLESAREV, WOLF Y., SOROKIN A., MIRKIN B., KOONIN E., PAVLOV A., PAVLOVA N., KARAMYCHEV V., POLOUCHINE N., SHAKHOVA V., GRIGORIEV I., LOU Y., ROHKSAR Y., LUCAS S., HUANG K., GOODSTEIN D., HAWKINS T., 2006. *Comparative genomics of the lactic acid bacteria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 15611–15616.
- MATHUR S., SINGH R., 2005. *Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review*. Int. J. Food Microbiol. 105, 281–295.
- MAYO B., VAN SINDEREN D., VENTURA M., 2008. *Genome Analysis of Food Grade Lactic Acid-Producing Bacteria: From Basics to Applications*. Curr. Genom. 9, 169–183.
- MILLS D., RAWSTHORNE H., PARKER C., TAMIR D., MAKAROVA K., 2005. *Genomic analysis of Oenococcus oeni PSU-1 and its relevance to winemaking*. FEMS Microbiol. Rev. 29, 465–476.
- MORELLI L., 2000. *In vitro selection of probiotic Lactobacilli: A critical appraisal*. Curr. Issues Intest. Microbiol. 1, 59–67.
- NAIR P., SURENDRAN P., 2005. *Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn*. J. Culture Collect. 4, 48–52.
- NES I., YOON S., DIEP D., 2007. *Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A Review*. Food Sci. Biotechnol. 5, 675–690.
- NEVES A., POOL W., KOK J., KUIPERS O., SANTOS H., 2005. *Overview on sugar metabolism and its control in Lactococcus lactis – the input from in vivo NMR*. FEMS Microbiol. Rev. 29, 531–544.
- PALFRAMAN R., GLENN R., GIBSON G., RASTALL R., 2003. *Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut*. Curr. Issues Intest. Microbiol. 4, 71–75.
- PFEILER E., KLAENHAMMER T., 2007. *The genomics of lactic acid bacteria*. TRENDS Microbiol. 15, 546–553.
- PROBERT H., GIBSON R., 2002. *Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract*. Curr. Issues Intest. Microbiol. 3, 23–27.
- RICH J., BISCHOFF K., LEATHERS T., CÔTÉ G., LIU S., 2010. *Lactic acid bacteria: friend or foe? Lactic acid bacteria in the production of polysaccharides and fuel ethanol*. KKU Res. J. 15, 424–435.
- RUAS-MADIEDO P., DE LOS REYES-GAVILAN C., 2005. *Invited Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria*. Am. Dairy Sci. Assoc. 88, 843–856.

- SALMINEN S., NURMI J., GUEIMONDE M., 2005. *The genomics of probiotic intestinal microorganisms*. *Genome Biol.* 6, 225, 1–225.4.
- SANDERS M., GIBSON G., GILL H., GUARNER F., 2007. *Probiotics: their potential to impact human health*. *CAST* 36, 1–20.
- SAVADOGO A., OUATTARA C., BASSOLE I., TRAORE S., 2006. *Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview*. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 678–683.
- SEMJONOV P., JASKO J., AUZINA L., ZIKMANIS P., 2008. *The use of exopolysaccharide-producing culture of lactic acid bacteria to improve the functional value of fermented foods*. *J. Food Technol.* 6, 101–109.
- SCHLEGEL H., 2005. *Mikrobiologia ogólna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- SHAO-CHI W., FU-JIN W., CHORNG-LIANG P., 2007. *Growth and survival of lactic acid bacteria during the fermentation and storage of seaweed oligosaccharides solution*. *J. Marine Sci. Technol.* 15, 104–114.
- SUZUKI K., ASANO S., IJIMA K., KITAMOTO K., 2008. *Sake and beer spoilage lactic acid bacteria – a review*. *J. Inst. Brewing Distil.* 114, 209–223.
- SUZUKI K., IJIMA K., SAKAMOTO K., SAMI M., YAMASHITA H., 2006. *A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria*. *J. Instit. Brewing Distil.* 112, 173–191.
- TALWALKAR A., KAILASAPATHY K., 2004. *The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to L. acidophilus and Bifidobacterium spp.* *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 5, 1–8.
- TANNOCK G., 1999. *Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria*. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 1, 53–64.
- VOS P., GARRITY G., JONES D., KRIEG N., LUDWIG W., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3: The Firmicutes, Springer.
- WEE Y., KIM J., RYU H., 2006. *Biotechnological production of lactic acid and its recent applications*. *Food Technology and Biotechnology.* 44, 163–172.
- YOUNG-JUNG W., JIN-NAM K., HWA-WON R., 2006. *Biotechnological production of lactic acid and its recent applications*. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 163–172.
- ZACHAROF M., R.W. LOVITT R., RATANAPONGLEKA K., 2010. *The importance of Lactobacilli in contemporary food and pharmaceutical industry*. *Proc. Int. Conference on Chemical Engineering and Applications (CCEA 2010) Singapore*, 26–28 February, 2010.
- ZANNINI E., SANTARELLI S., OSIMANI A., DELL'AQUILA L., CLEMENTI F., 2005. *Effect of process parameters on the production of lactic acid bacteria in batch fermentation*. *Ann. Microbiol.* 55, 273–278.
- ZHU Y., ZHANG Y., LI Y., 2009. *Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 597–610.