

Klaudia Gustaw<sup>1\*</sup>, Magdalena Michalak<sup>1</sup>, Magdalena Polak-Berecka<sup>1</sup>, Adam Waśko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności,  
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wpłynęło w czerwcu 2016 r.  
Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Występowanie. 3. Cechy morfologiczne FLAB. 4. Cechy fizjologiczne FLAB. 5. Właściwości biochemiczne FLAB. 6. Filogenetyka. 7. Krótka charakterystyka wybranych gatunków z rodzaju *Fructobacillus*. 7.1. *Fructobacillus fructosus*. 7.2. *Fructobacillus ficulneus*. 7.3. *Fructobacillus durionis*. 7.4. *Fructobacillus pseudoficulneus*. 7.5. *Fructobacillus tropaeoli*. 7.6. *Lactobacillus kunkeei*. 7.7. *Lactobacillus florum*. 8. Podsumowanie

#### Fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) – a new group of heterofermentative microorganisms from the plant environment

**Abstract:** Recently, a unique kind of lactic acid bacteria (LAB) i.e. fructophilic lactic acid bacteria (FLAB), has been described. This specific group prefers D-fructose over D-glucose as a carbon source to growth. They can be found in fructose rich environments such as flowers, fruits and food products made of fermented fruits, for example tempoyak. In recent years, it has been revealed that insects which feed on food high in fructose are an abundant source of fructophilic bacteria. Bacterial communities inhabiting intestinal tracts of honeybees, bumblebees, *Camponotus* ants and tropical fruit flies were examined. At present FLAB includes six species: *Fructobacillus fructosus*, *Fructobacillus durionis*, *Fructobacillus ficulneus*, *Fructobacillus pseudoficulneus*, *Fructobacillus tropaeoli* and *Lactobacillus kunkeei* classified by Endo as obligatorily fructophilic, and only one species, namely *Lactobacillus florum*, as facultatively fructophilic. Latest publications describe new species of potential fructophilic characteristics, which suggests that there is still much to discover in that group.

1. Introduction. 2. Occurrence / Habitat. 3. Morphological characteristics of FLAB. 4. Physiological characteristics of FLAB. 5. Biochemical properties of FLAB. 6. Phylogenetics. 7. Characterization of selected species of the genus *Fructobacillus*. 7.1. *Fructobacillus fructosus*. 7.2. *Fructobacillus ficulneus*. 7.3. *Fructobacillus durionis*. 7.4. *Fructobacillus pseudoficulneus*. 7.5. *Fructobacillus tropaeoli*. 7.6. *Lactobacillus kunkeei*. 7.7. *Lactobacillus florum*. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** FLAB, *Fructobacillus*, fruktofilne bakterie kwasu mlekowego

**Key words:** FLAB, *Fructobacillus*, fructophilic lactic acid bacteria

## 1. Wstęp

FLAB (fructophilic lactic acid bacteria) są nietypową grupą bakterii kwasu mlekowego, które preferują fruktozę zamiast glukozy jako źródło węgla [10]. Występują one w niszach ekologicznych bogatych we fruktozę, takich jak: nektar kwiatów, owoce oraz żywność fermentowana wytwarzana na bazie owoców. Bakterie te wyizolowano także z przewodów pokarmowych owadów żywiących się pokarmem bogatym we fruktozę, takich jak trzmiele, pszczoły, tropikalne muszki owocowe, czy też mrówki z rodzaju *Camponotus*. *Fructobacillus* spp. są grupą mikroorganizmów należącą do fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego. Początkowo zostały one zaklasyfikowane jako gatunek *Leuconostoc*, jednak ze względu na ich pozycję filogenetyczną, właściwości biochemiczne i morfologiczne nazwa ta została zmieniona na *Fructobacillus* [2, 5, 31] nawiązując do fruktozy, która stanowi dominujące źródło węgla wykorzystywane przez te mikroorganizmy [12]. Do grupy FLAB obecnie

należą następujące gatunki: *F. pseudoficulneus*, *F. fructosus*, *F. ficulneus*, *F. tropaeoli*. *Lactobacillus kunkeei* oraz *Lactobacillus florum*. W południowej Afryce *F. tropaeoli* został wyizolowany z kwiatów rośliny *Tropaeolum majus* [10]. Pierwotnie *F. fructosus* został zaklasyfikowany jako *Lactobacillus fructosus*, bazując na jego morfologicznych właściwościach. Następnie po szczegółowych badaniach filogenetycznych został zaklasyfikowany jako *Leuconostoc fructosus* [28], natomiast w 2008 roku Endo i Okada zmienili jego nazwę na *F. fructosus*. Wszystkie gatunki *Fructobacillus* posiadają zestaw unikalnych cech, które odróżniają je od ich filogenetycznych sąsiadów, jest to preferencja fruktozy zamiast glukozy jako źródła węgla, oraz konieczność obecności zewnętrznego akceptora elektronu do fermentacji glukozy. Dotychczas na temat rodzaju *Fructobacillus* ukazało się zaledwie kilka publikacji naukowych. Tylko jeden dokument został opublikowany na temat izolacji *F. fructosus* [28], jeden na temat *F. ficulneus* [2], oraz dwa o *F. pseudoficulneus* [5, 12] i jeden o *F. tropaeoli* [18]. Do tej pory jedynym

\* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin; e-mail: klaudiagustaw1@gmail.com

gatunkiem z rodzaju *Lactobacillus*, zakwalifikowanym do grupy FLAB był *Lb. kunkeei*. Gatunek ten został oryginalnie wyizolowany z wina, i w czasie propozycji jego zaklasyfikowania, jego fruktofilne cechy nie zostały omówione [9]. Dopiero w 2012 *Lb. kunkeei* dołączył do grupy FLAB [11]. Powodem występowania tak małej liczby publikacji na ten temat, mogą być problemy dotyczące sposobu izolacji bakterii z rodzaju *Fructobacillus*, związane z używaniem konwencjonalnych pożywek takich jak MRS, Rogosa SL, KPL, pożywki z kwasem sorbowym, pożywki na bazie soku pomidorowego czy innych pożywek na bazie sacharozy [23]. Żadna z tych pożywek nie zawiera fruktozy jako źródła węgla. Gatunki *F. fructosus* i *F. pseudoficulnes* udało się wyizolować z kwiatów i owoców za pomocą specjalnie skomponowanej pożywki FYP, zawierającej fruktozę jako jedyne źródło węgla [10]. Gatunki *Fructobacillus* mają kilka unikalnych cech których nie posiadają inne bakterie z grupy LAB. Znajomość gatunków *Fructobacillus* jest więc konieczna do uzyskania pełnego obrazu różnorodności LAB.

## 2. Występowanie

Bakterie kwasu mlekowego można znaleźć w różnych środowiskach, a szereg badań sugeruje, że LAB dostosowują się do środowisk w których żyją [33, 34]. Gatunki bakterii pochodzące z przetworów mlecznych takie jak *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*, preferują laktozę zamiast glukozy jako źródło węgla, oraz w celu zdominowania środowiska bogatego w białko wykształciły bardzo rozwinięte systemy proteolityczne [37]. Jelitowe bakterie kwasu mlekowego są zwykle odporne za żółć i produkują bakteriocyny pozwalające na konkurowanie z innymi bakteriami [27]. Sugeruje się, że FLAB zamieszkując nisze bogate we fruktozę utraciły zdolność metabolizowania glukozy w czasie ewolucyjnych zmian umożliwiających zasiedlenie tej niszy ekologicznej [14]. W 1956 roku *F. fructosus* był po raz pierwszy wyizolowany z kwiatów w Japonii [28], i gatunek ten nie został opisany przez ponad 50 lat. Gatunki *Fructophilic* wyizolowywano z wina, kwiatów i tradycyjnego napoju Taberny wytwarzanego i spożywanego w południowym Meksyku [5, 10, 18]. Jest to słodkie musujące wino uzyskiwane na drodze naturalnej fermentacji z soku palm *Acrocomia aculeate* [38]. Gatunek *F. pseudoficulneus* jest najczęściej izolowany z naturalnych środowisk, takich jak banany, figi, kwiaty czy też z Taberny [5, 10, 30]. Natomiast *F. ficulneus* i *F. durionis* udało się pozyskać tylko z fig, oraz tempoyaku – fermentowanej przyprawy z duriana, spożywanej przez Malajów w Indonezji i Malezji [2, 31]. Niedawno opisano gatunek *F. tropaeoli* wyizolowany z kwiatów

[29]. Ostatnie badania sugerują, że bogatym źródłem gatunków *Fructobacillus* są fermentowane ziarna kakaowca [30, 37, 39]. Wyizolowany z wina, miodu i kwiatów jest *Lb. kunkeei* [10, 14]. Co ciekawe, FLAB odkryto w przewodach pokarmowych różnych owadów. Trzmiele i tropikalne muszki owocowe są ściśle związane z kwiatami, a ich dieta jest bogata we fruktozę. Mrówki *Camponotus* zbierają i spożywają spadź produkowaną przez mszyce [24, 41]. Wyniki te pokazują, że czynnikami determinującymi zasiedlanie środowiska przez FLAB jest dostępność fruktozy oraz warunki anaerobowe. Mikroorganizmy te nie mogą wzrastać w warunkach beztlenowych, jeśli jedynym źródłem węgla jest glukoza, dlatego możliwe jest występowanie bakterii fruktofilnych w przewodach pokarmowych wegetarian. Należy podkreślić, że na tle bakterii kwasu mlekowego powiązanych z żywnością, grupa FLAB jest unikalna i może być wykorzystana w przyszłości w przemyśle spożywczym i paszowym [14].

## 3. Cechy morfologiczne FLAB

Komórki bakterii z rodzaju *Fructobacillus* są Gram-dodatnie, nie posiadają zdolności do ruchu oraz nie wytwarzają zarodników. Są fakultatywnie beztlenowe [17]. Wszystkie z pięciu gatunków *Fructobacillus* mają komórki kształtu pałeczkowatego zbliżonego do morfologii pałeczek bakterii kwasu mlekowego. Natomiast *F. pseudoficulneus* pierwotnie został opisany jako bakterie o kształcie owalnym, jednakże obraz wykonany za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) wyraźnie wskazuje ich pałeczkowaty kształt [30]. Komórki występują pojedynczo lub w parach, kolonie inkubowane w warunkach tlenowych są nieco większe od kolonii rosnących w warunkach beztlenowych. Jednakże różnice warunków hodowli nie mają istotnego wpływu na morfologię komórek badanych szczepów.

## 4. Cechy fizjologiczne FLAB

Niektóre gatunki *Fructobacillus* są znane ze sprawnie działających mechanizmów utrzymujących równowagę osmotyczną komórki, *F. durionis*, *F. ficulneus*, *F. fructosus*, *F. pseudoficulneus* wykazują wzrost na pożywce z dodatkiem 30% fruktozy. Na podłożu z zawartością 40% fruktozy, nadal występuje wzrost bakterii, jednakże jest on znacznie spowolniony [12]. Gatunek *F. tropaeoli* rośnie słabo w obecności 30% fruktozy [18]. Prawie każdy gatunek *Fructobacillus* jest osmotolerancyjny, dlatego cecha ta może być wykorzystana przy selektywnej izolacji tych gatunków. Pierwotnie dzięki wykorzystaniu pożywki z zawartością 30% glukozy udało się wyizolować *F. ficulneus* [10], pozostałe gatunki

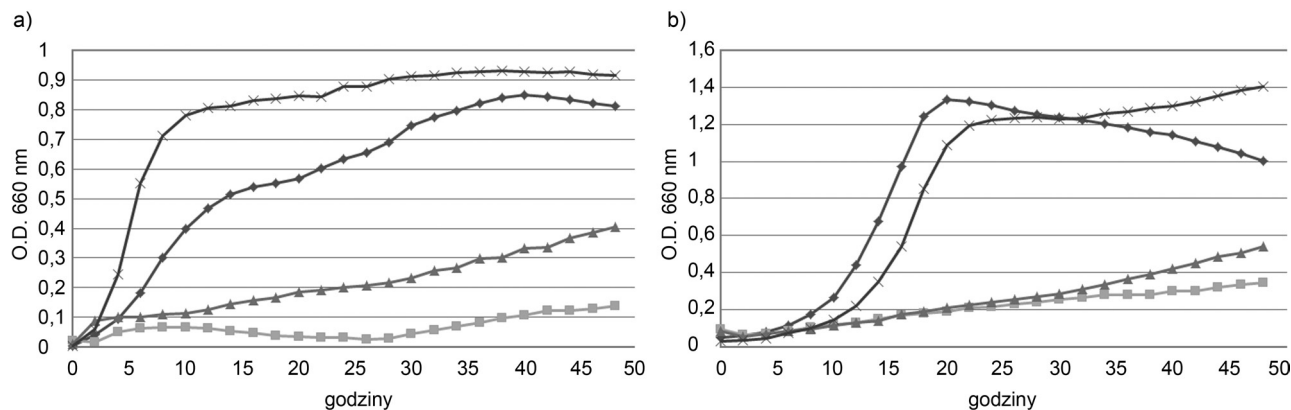
*Fructobacillus* wyizolowano już dzięki selekcyjnym właściwościom pożywki z 30% zawartością fruktozy [10]. Znakomity system osmotyczny fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego pozwala *F. durionis*, *F. ficulneus*, *F. fructosus*, *F. pseudoficulneus* na wzrost w pożywkach o zawartości 5% NaCl [12], w przeciwieństwie do *F. trophaeoli* który nie rośnie w takich warunkach [18].

## 5. Właściwości biochemiczne FLAB

Dzięki występowaniu kilku unikalnych cech biochemicznych rodzaj *Fructobacillus* można było odróżnić od innych gatunków należących do bakterii mlekowych. Podstawową i najważniejszą właściwością jest ich dobry wzrost na pożywkach z D-fruktozą, a słaby na D-glukozie, która jest najbardziej powszechnym substratem wzrostu u LAB [19]. Wśród bakterii z rodzaju *Lactobacillus* opisano już podobne przystosowania np. *Lactobacillus sanfranciscencis* fermentuje maltozę, zaś *Lactobacillus vacciostercus* metabolizuje ksylozę [33]. FLAB mogą rosnąć na glukozie, ale tylko w obecności 1% pirogronianu lub w warunkach tlenowych. Wyniki te sugerują, iż fruktofilne bakterie kwasu mlekowego potrzebują obecności akceptora elektronów w postaci tlenu lub pirogronianu do metabolizmu glukozy. Organizmy te świetnie rosną na agarowych pożywkach zawierających glukozę jako jedyne źródło węgla tylko w warunkach tlenowych, natomiast w warunkach beztlenowych wzrost nie występuje lub jest znikomy [14, 33]. W obecności tlenu na podłożu agarowym można zaobserwować dobry wzrost FLAB, po 2 dniach powstają kolonie o średnicy 1–2 mm, natomiast w warunkach beztlenowych i przy braku akceptorów elektronów kolonie osiągają średnicę 0,1–0,2 mm [13]. Cecha ta pozwala łatwo odróżnić bakterie należące do FLAB od pozostałych bakterii z grupy LAB [14]. Fruktofilne gatunki LAB można podzielić na dwie grupy czyli na bakterie fruktofilne, obligatoryjnie oraz na

fakultatywnie fruktofilne [12]. Cechami różnicującymi obligatoryjne od fakultatywnych bakterii jest wzrost na D-glukozie bez akceptora elektronów i wytwarzanie etanolu z D-glukozy [10]. Gatunki obligatoryjnie fruktofilne preferują fruktozę jako substrat do wzrostu, natomiast aby metabolizować glukozę potrzebują zewnętrznego akceptora elektronów czyli fruktozy, pirogronianu lub tlenu [19]. Jest to spowodowane różnicami w wydajności ATP pochodzących z fermentacji. W obecności tlenu 2 mole ATP jest wytwarzane podczas metabolizmu 1 mola glukozy, zaś 1,5 mola ATP produkowane jest w obecności pirogronianu [38]. Bakterie z grupy FLAB wykorzystując fruktozę jako akceptor tlenu produkują 0,67 moli na jeden mol zużytej fruktozy [3]. Obligatoryjne FLAB nie wytwarzają etanolu z D-glukozy, do grupy tej obecnie zaliczane są wszystkie gatunki *Fructobacillus* oraz *Lb. kunkeei*, który wykazuje praktycznie te same charakterystyki wzrostu co gatunki *Fructobacillus* oraz potrzebuje akceptora elektronu do metabolizmu glukozy [10]. Fakultatywnie fruktofilne LAB rosną na pożywce z D-glukozą bez obecności akceptora elektronów oraz produkują z D-glukozy etanol. Przykładem fakultatywnych gatunków FLAB obecnie jest jedynie *Lb. florum*, który dobrze rośnie zarówno na glukozie jak i na fruktozie w obecności akceptora elektronów [10, 17]. Jednakże *Lb. florum* różni się od innych FLAB pod względem cechy wzrostu na glukozie bez akceptora elektronów. Gatunek *Lb. florum* wykazuje zdolność do wzrostu na glukozie lecz w opóźnionym tempie [14].

Kolejną interesującą cechą FLAB jest ich brak zdolności do produkcji etanolu w metabolizmie glukozy, przy czym są one kwalifikowane jako heterofermentatywne LAB [10]. Zamiast etanolu z glukozy wytwarzany jest kwas octowy, cecha ta pozwoliła na odróżnienie od *Leuconostoc* i stworzenie nowego rodzaju *Fructobacillus*. [40]. Endo i inni przypuszczają, że wytłumaczeniem wyjątkowej charakterystyki FLAB, jest niewystarczająca regeneracja  $NAD^+$  [12]. Dehydrogenaza alkoholowa (ADH) i dehydrogenaza aldehydu octo-



Rys. 1. Charakterystyki wzrostu przykładowych FLAB na różnych pożywkach

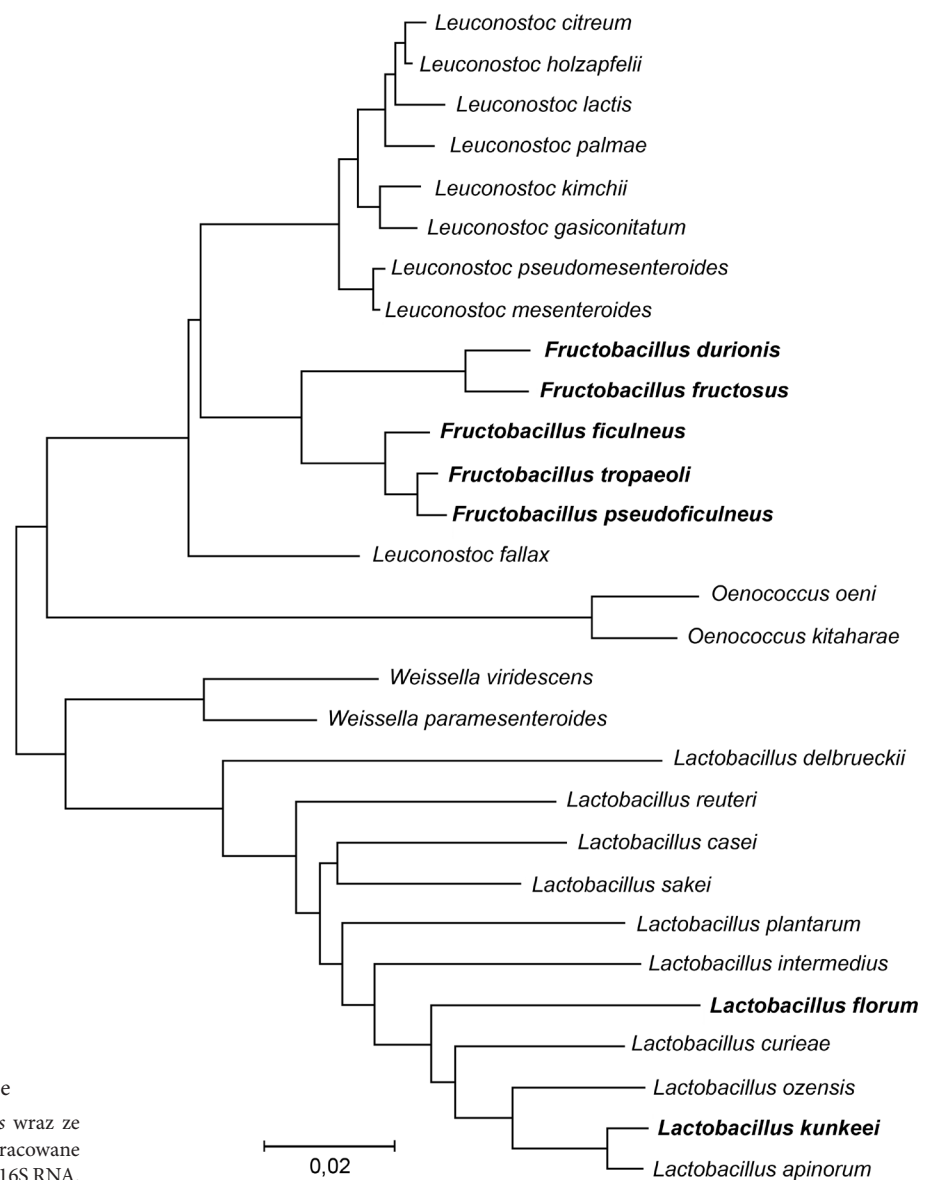
Wzrost a) *Fructobacillus ficulneus* DSMZ 13613, b) *Lactobacillus florum* DSMZ 22689, na:  $\diamond$  FYP,  $\square$  GYP,  $\Delta$  GYP z zawartością 1% pirogronianu,  $\times$  MRS w warunkach tlenowych.

wego (ALDH) odgrywają kluczową rolę w metabolicznych szlakach heterofermentatywnych LAB w regeneracji  $\text{NAD}^+$ . Badania przeprowadzone w 2013 roku wykazały brak obecności genu *adhE* kodującego dwufunkcyjne białko odpowiedzialne za działanie ADH i ALDH u *Fructobacillus* spp., a co za tym idzie, brak u tych bakterii szlaku wymaganego do produkcji etanolu. Tłumaczy to niedobór  $\text{NAD}^+$  i potrzebę występowania akceptorów elektronów w metabolizmie glukozy. Fruktofilne cechy u *Fructobacillus* spp. w głównej mierze wynikają z braku genu *adhE* [19]. Gen *adhE* u obligatoryjnie heterofermentatywnych LAB jest wykorzystywany do wytwarzania etanolu z fosforanu acetylu poprzez aldehyd octowy [29].

W oparciu o wyniki badań zdolności fermentacji węglowodanów, można stwierdzić, że FLAB metabolizują ograniczoną ilość węglowodanów, od dwóch do pięciu [10]. Większość gatunków FLAB metabolizuje tylko glukozę, fruktozę i mannitol. Przy czym meta-

bolizm fruktozy trwa znacznie krócej, około 1 dnia, natomiast do metabolizmu glukozy potrzeba od 2 do 4 dni [14]. Wszystkie gatunki *Fructobacillus* fermentują glukozę i fruktozę, fermentacja mannitolu jest opóźniona. FLAB nie prowadzą fermentacji pentoz, prawdopodobnie ze względu na brak izomeraz i epimeraz. Również *Lb. kunkeei* i *Lb. florum* są asacharolityczne, jednakże można je odróżnić od innych gatunków *Fructobacillus* na podstawie zdolności do fermentacji kilku węglowodanów.

Wszystkie bakterie FLAB należą do obligatoryjnie heterofermentatywnych bakterii kwasu mlekowego, ponieważ produkują  $\text{CO}_2$  z glukozy. Zasadniczo obligatoryjne heterofermentatywne LAB wykorzystują szlak fosforanowo-pentozowy do metabolizmu glukozy przy wytwarzaniu równomolowych ilości kwasu mlekowego, etanolu, dwutlenku węgla czy też śladowych ilości kwasu octowego. Fruktofilne gatunki produkują octan zamiast etanolu [11]. Poza śladowymi ilościami etanolu



Rys. 2. Drzewo filogenetyczne

Relacje filogenetyczne dla *Fructobacillus* wraz ze spokrewnionymi gatunkami zostały opracowane na podstawie sekwencji genu kodującego 16S RNA.

z glukozy wszystkie pięć gatunków *Fructobacillus* produkują prawie równomolowe ilości kwasu mlekowego i kwasu octowego. Stosunek kwasu D-mlekowego do L-mlekowego produkowanego przez FLAB wynosi 9:1 [18].

## 6. Filogenetyka

Rodzaj *Fructobacillus* jest filogenetycznie umieszczony wewnątrz rodziny *Leuconostocaceae* wraz z rodzajami: *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Weissella*. *Fructobacillus* spp. są podzielone na dwie podgrupy na podstawie analizy sekwencji wysoce konserwatywnego regionu genu 16S rRNA. Pierwszy subklaster zawiera *F. fructosus* i *F. durionis*, natomiast w drugim znajdują się gatunki *F. ficulneus*, *F. pseudoficulneus* oraz *F. tropaeoli*. Podobieństwo analizowanej sekwencji 16S rRNA pomiędzy gatunkami waha się od 94,2% do 99,2%. Rodzaj *Fructobacillus* dzieli 90,4% do 94,4% podobieństwa sekwencji z *Leuconostoc*, 82,8% do 83,3% z *Oenococcus* oraz 85,4% do 89,1% z *Weissella* [13].

Gatunki należące do rodzaju *Weissella* oraz większość gatunków LAB posiadają różne regiony międzygenowe (ISR) genu 16S-23S rRNA [40, 44]. Jednakże gatunki *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Oenococcus* posiadają tylko jeden rodzaj ISR [12, 44]. Pomiędzy sobą rodzaj *Fructobacillus* ma 81,3% do 92,4% podobieństwa jeśli chodzi o regiony ISR, oraz dzielą 69,2–80,1% podobieństwa z gatunkami *Leuconostoc* [13].

Niektóre gatunki *Fructobacillus* posiadają wysokie podobieństwo sekwencji genu 16S rRNA, z tego powodu analiza wielu loci (MLSA) sekwencji genów housekeeping pozwala na bardziej wiarygodne rozróżnienie gatunków *Fructobacillus*. Sekwencje genów *rpoC* oraz *recA* potwierdzają że rodzaj *Fructobacillus* jest różny filogenetycznie od pozostałych LAB [12]. Prace z 2007 roku Chelo i innych oraz De Bruyne i innych potwierdzają niezależność filogenetycznej pozycji gatunków *Fructobacillus* od pokrewnych taksonów [6, 8]. W powyższych badaniach z 2007 roku sekwencje *dnaA*, *rpoC*, *gyrB*, *dnaK*, *pheS*, *atpA* oraz *rpoA* użyto w metodzie MLSA. Okazało się że *F. pseudoficulneus* i *F. tropaeoli* posiadają w 99,2% podobne sekwencje genów 16S rRNA, i w 84,6% posiadają podobne sekwencje genów *recA* [13].

## 7. Krótka charakterystyka wybranych gatunków z rodzaju *Fructobacillus*

### 7.1. *Fructobacillus fructosus*

Po raz pierwszy opisany jako *Lactobacillus fructosus*, został wyizolowany z kwiatów w Japonii i opisany przez Kodama w 1956 roku [28]. Komórki *F. fructo-*

*sus* są Gram-dodatnimi, nieruchliwymi pałeczkami o wymiarach  $0,5-0,8 \times 2-8 \mu\text{m}$ . Zazwyczaj występują pojedynczo lub w parach. Gatunek jest fakultatywnie beztlenowy, katalazo ujemny, należy do obligatoryjnie fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego, dlatego też obecność zewnętrznego akceptora elektronów, czyli tlenu, pirogronianu oraz D-fruktozy stymuluje jego wzrost na D-glukozie [12]. W warunkach beztlenowych *F. fructosus* na D-glukozie nie wykazuje wzrostu. Kolonie na agarze GYP po inkubacji przez 2 dni w warunkach tlenowych są białe, gładkie o średnicy 1 do 2 mm, natomiast w warunkach beztlenowych osiągają około 0,1 do 0,2 mm. Optymalna temperatura do wzrostu dla tego gatunku to około 30°C. Wzrost występuje od 6°C do 40°C, w 45°C następuje zahamowanie wzrostu. Optimum pH waha się pomiędzy od 6,5 do 7,0, wzrost nie występuje w pH 4,5. Co ciekawe, szczep *F. fructosus* może rosnąć w obecności 5% NaCl i 40% fruktozy, ze względu na sprawny system osmotyczny [19]. Komórki tych bakterii są heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i kwas octowy z D-glukozy w proporcji 1:1 z bardzo małą ilością etanolu. Gatunek *F. fructosus* potrafi produkować duże ilości kwasu mlekowego i octowego, molowy stosunek wynosi 1:0,6 do 1:0,9. Stosunek molowy etanolu w porównaniu do kwasu mlekowego sięga 0,02:1 [18]. Z D-glukozy jest wytwarzany gaz. Izomer mleczanu jest D(-), mannitol jest wytwarzany z D-fruktozy, molowy stosunek waha się od 0,7:1 do 1:1. Bakteria nie redukuje azotanów. Z sacharozy nie jest produkowany dekstran. Dehydro-laza arginianu nie występuje u tego gatunku. Bakterie *F. fructosus* nie hydrolizują elastyny, żelatyny, kazeiny, fibryny czy eskuliny. Hydrolizują tylko D-fruktozę, D-glukozę oraz mannitol. Wykazuje słabą aktywność fosfatazy alkalicznej, oraz chymotrypsyny [18]. Procentowa zawartość molowa % G+C w DNA wynosi 43. W genomie *F. fructosus* brak jest genu *adhE* [19].

### 7.2. *Fructobacillus ficulneus*

Gatunek ten został wyizolowany z dojrzałej figi z Portugalii w 2002 roku, pierwotnie jako *Leuconostoc ficulneum* [5]. Gatunek *F. ficulneus* to Gram-dodatnie, nieruchliwe pałeczki o wielkości  $0,5 \times 1,5-3 \mu\text{m}$ . Pałeczki występują pojedynczo lub w parach. Wzrost występuje powyżej 6°C i poniżej 40°C, optymalna temperatura wzrostu wynosi 30°C. Brak wzrostu w pH 4,5, optimum pH jest zbliżone do obojętnego od 6,5 do 7,0. Zarówno *F. ficulneus* jak i *F. fructosus* jest zdolny do wzrostu w obecności 5% NaCl lub 40% fruktozy. Gatunek *F. ficulneus* jest fakultatywnym beztlenowcem, który co jest dość wyjątkowe wśród FLAB, wykazuje aktywność katalazy. Należy do obligatoryjnie fruktofilnych LAB, rośnie na pożywce z glukozą jedynie w obecności akceptora elektronów tlenu, pirogro-

nianu i D-fruktozy. W warunkach beztlenowych nie wykazuje wzrostu na pożywce, której jedynym źródłem węgla jest D-glukoza. Kolonie na agarze GYP po inkubacji w warunkach tlenowych po 2 dniach osiągają od 1 do 2 mm, w warunkach beztlenowych około 0,1 do 0,2 mm. Bakterie *F. ficulneus* są heterofermentatywne, produkują z D-glukozy w proporcji 1:1 kwas octowy i kwas mlekowy, natomiast produkują znikome ilości etanolu. Wytwarzają gaz z D-glukozy i z D-fruktozy. Produkują izomer D(-) mleczanu. Bakterie te nie mają zdolności do redukcji azotanów. Nie produkują dekstranu z sacharozy. U tego gatunku nie występuje enzym dehydrolaza argininy, ponadto nie hydrolizuje elastyny, eskuliny, firbyny, kazeiny oraz żelatyny. Stosunek molowy % G+C w DNA jest równy 43 [12].

### 7.3. *Fructobacillus durionis*

Obecnie *F. durionis*, dawniej *Leuconostoc durionis* został wyizolowany z tempoyaku, czyli malezyjskiej fermentowanej kwasowej przyprawy wytwarzanej z mięszu owocu duriana [31]. Są to bakterie Gram-dodatnie, pałeczki o wymiarach  $0,5 \times 2-6 \mu\text{m}$ . Komórki nie posiadają zdolności do ruchu, zazwyczaj występują pojedynczo lub w parach. Optymalny wzrost występuje w temperaturze od  $5^\circ\text{C}$  do  $35^\circ\text{C}$ , zahamowanie wzrostu obserwuje się przy  $45^\circ\text{C}$ . Bakteria jest zdolna do wzrostu na pożywce o 5% zawartości NaCl czy też 40% fruktozy. Są fakultatywnymi beztlenowcami nie wykazują aktywności katalazy. Należą do obligatoryjnie fruktofilnych LAB, gdzie dodatkowy akceptor elektronów tlen, pirogronian oraz D-fruktoza poprawiają wzrost na pożywce z D-glukozą w warunkach tlenowych, zaś w warunkach beztlenowych na pożywce z D-glukozą wzrost nie występuje. Kolonie na pożywce GYP po inkubacji przez 2 dni są gładkie i białe, w warunkach tlenowych osiągają około 1–2 mm średnicy, zaś w beztlenowych warunkach około 0,1–0,2 mm. Gatunek *F. durionis* jest heterofermentatywny i produkuje małe ilości etanolu oraz kwas mlekowy i octowy z D-glukozy w ilości 1:1 [12]. Gaz jest produkowany z D-glukozy, izomer mleczanu jest D(-). Z D-fruktozy produkowany jest mannitol. Gatunek ten nie redukuje azotanów oraz nie produkuje dekstranu z sacharozy ani amoniaku z argininy. Procentowa molowa zawartość G+C DNA wynosi 44 [13].

### 7.4. *Fructobacillus pseudoficulneus*

Gatunek ten został wyizolowany z dojrzałej figi z regionu Alentejo w Portugalii w 2006 roku, pierwotnie zaklasyfikowany jako *Leuconostoc pseudoficulneus* [5]. Komórki są Gram-dodatnimi, jajowatymi pałeczkami, osiągającymi rozmiary  $0,5 \times 1-5 \mu\text{m}$ . Występują pojedynczo lub w parach, nie posiadają zdolności do

ruchu oraz nie zarodnikują. Kolonie są małe, gładkie, okrągłe, wypukłe o nieprzejrzysto szaro-białym kolorze. Optimum temperaturowe do wzrostu to około  $30^\circ\text{C}$ , przy czym wzrost występuje od  $37^\circ\text{C}$  do  $4^\circ\text{C}$ . Optymalne pH dla tego gatunku waha się pomiędzy 6,5 i 7,0 lecz komórki mogą występować w pH od 4,8 do 8,5. Gatunek *F. pseudoficulneus* wykazuje wzrost na pożywce z 3% i 5% zawartością NaCl, lecz nie przy stężeniu 10% NaCl. Bakterie te są fakultatywnie beztlenowe i obligatoryjnie fruktofilne, dodatkowy akceptor elektronów taki jak pirogronian, tlen czy D-fruktoza jest niezbędny do wzrostu na D-glukozie w warunkach beztlenowych. Kolonie na agarze GYP po dwudniowej inkubacji osiągają w warunkach tlenowych 1–2 mm, w warunkach beztlenowych około 0,1–0,2 mm średnicy [13]. Bakterie należące do tego gatunku są zdolne do wzrostu w obecności 40% fruktozy. Aktywność katalazy i oksydazy cytochromu nie została wykryta u tego gatunku. Dehydrolaza argininy nie jest produkowana. Nie zaobserwowano wzrostu w obecności 10% etanolu. Gaz jest produkowany z D-glukozy. Występuje D(-) izomer mleczanu. Gatunek *F. pseudoficulneus* to bakterie heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy w ilości 1:1 oraz śladowe ilości etanolu. Mannitol jest produkowany z D-fruktozy, azotany nie są redukowane. Dekstran nie jest produkowany z sacharozy. W komórkach przeważają kwasy tłuszczowe 11, 12-okradecenowy (18:1D11, 18:1v7c) i kwas heksadekanowy. Nie produkowany jest żółty pigment. Żelatyna, skrobia eskulina nie są hydrolizowane. Kwas może być wytwarzany z D-fruktozy, D-glukozy i D-mannitolu, natomiast nie jest wytwarzany z D-adonitolu, amigdaliny, L-arabinozy, D-arabitolu, arbutyny, celobiozy, dulcitolu, eskuliny, erytrytolu, D-fukozy, D-galaktozy,  $\beta$ -gencjiozy, glukonianu, glicerolu, glikogenu, inozytolu, insuliny, laktozy, D-maltozy, D-mannozy, D-melezytozy, D-melibiozy, D-rafinozy, L-ramnozy, D-rybozy, salicyny, D-sorbitolu, L-sorbozy, sacharozy, D-trehalozy, D-turanozy, ksylitolu lub D-ksylozy. Aktywność fosfataz alkalicznych i kwasowych oraz  $\alpha$ -chymotrypsyny została wykryta. Typowy szczep to LC51T (= DSM 15468T = CECT 5759T), gdzie zawartość G+C w DNA to 44,5 mol% [5].

### 7.5. *Fructobacillus tropaeoli*

Gatunek opisany przez Endo i innych w 2011, wyizolowany z kwiatu nasturcji *Tropaeolum majus* z południowej Afryki. W celu izolacji świeże kwiaty zostały zebrane w czerwcu 2009 roku, przeniesione i rozdrobione w sterylnych plastikowych torebkach, do których następnie dodano pożywki FYP, inkubowano oraz przeniesiono na płytki z agarem. Po wielokrotnych pasażach uzyskano czyste izolaty. Bazując na analizie filogenetycznej genu 16S rRNA, *F. tropaeoli* został ujęty

w podgrupie z *F. ficulneus* oraz *F. pseudoficulneus*. Szczep wykazywał wszystkie cechy specyficzne dla obligatoryjnych FLAB [10]. Komórki są Gram-dodatnie, pałeczkowatego kształtu o wymiarach  $0,8 \times 1,5-6 \mu\text{m}$ , występują pojedynczo, w parach lub w formie łańcuszków. Gatunek dobrze rośnie w  $15^\circ\text{C}$ , słabo w  $10^\circ\text{C}$ , a zahamowanie wzrostu następuje w  $45^\circ\text{C}$  [18]. Optymalne pH wynosi 4–8 i dopuszczalna jest obecność 2,5% NaCl. Nie wykazuje wzrostu natomiast przy 30% stężeniu fruktozy. Bakterie z gatunku *F. tropaeoli* nie wykazują aktywności katalazy i są fakultatywnie beztlenowe. Są obligatoryjnie fruktofilne, wzrost na D-glukozie zostaje poprawiony wraz z dodaniem zewnętrznego akceptora elektronów czyli tlenu lub pirogronianu. Wzrost na D-glukozie jest wstrzymany w warunkach beztlenowych. Po inkubacji przez 2 dni na agarze GYP, kolonie są białe gładkie i w warunkach tlenowych osiągają 1–2 mm średnicy, w warunkach beztlenowych kolonie są mniejsze o średnicy 0,1–0,2 mm. Heterofermentatywne bakterie *F. tropaeoli* produkują kwas mlekowy i octowy z D-glukozy, w stosunku 1:1, przy jednoczesnej produkcji niewielkich ilości etanolu. Gaz jest produkowany z D-glukozy, D- i L-mleczan są produkowane w stosunku 9:1. Z D-fruktozy produkowany jest mannitol, azotany nie są redukowane. Kwas jest produkowany tylko z D-fruktozy, D-glukozy i mannitolu. D-fruktoza jest fermentowana szybciej niż D-glukoza. Kwas nie jest produkowany z D- lub L-arabinozy, D- lub L-arabitolu, N-acetyloglukozaminy, maltozy, rybozy, adonitolu, amigdaliny, arbutyny, celobiozy, dulcitolu, eskuliny, erytrytolu, D- lub L-fruktozy,  $\beta$ -gencjobiozy, 2- lub 5-ketoglukonianu, glukonianu potasu, metylo- $\alpha$ -D-glukozydu, glicerolu, glikogenu, mio-inozytolu, inuliny, D-liksozy, D-mannozy,  $\alpha$ -D-mannozydu metylu, melezytozy, rafinozy, ramnozy, sacharozy, salicyny, skrobi, sorbitolu, L-sorbozy, D-tagalozy, trehalozy, turanozy, ksylitolu, L-ksylozy, D-galaktozy, laktozy, melibiozy, D-ksylozy. Dekstran nie jest wytwarzany z sacharozy. W składzie peptydoglikanu komórek bakterii *F. tropaeoli* nie występuje kwas mezo-diaminopimelinowy. Procentowa molowa zawartość G+C w DNA wynosi 44 [13].

### 7.6. *Lactobacillus kunkeei*

Gatunek ten został wyizolowany w 1998 roku z dostępnego w handlu wina Cabernet Sauvignon charakteryzującego się powolnie przechodzącą fermentacją [9]. Bakterie kwasu mlekowego są powszechnie uważane za organizmy powodujące psucie napojów alkoholowych, ze względu na produkcję kwasu octowego i innych związków zmieniających smak czy zapach [7]. W roku odkrycia *Lb. kunkeei* nie zauważono fruktofilnych właściwości tych bakterii. Dopiero w 2009 r. szczepy *Lb. kunkeei* zostały wyizolowane ponownie z wina, kwiatów oraz miodu i zaklasyfikowane przez

Endo i wsp. do obligatoryjnie fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego [10, 11]. Wszystkie wyizolowane szczepy rosły bardzo dobrze na fruktozie, a słabo na glukozie. Jednakże obserwowano znaczną poprawę wzrostu na pożywce na bazie glukozy, poprzez dodatek 1% pirogronianu lub poprzez hodowlę tlenową z wytrząsaniem, co sugeruje, iż bakterie te potrzebują zewnętrznego akceptora elektronów do metabolizmu glukozy. Powyższa obserwacja jest zgodna z definicją obligatoryjnie fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego [18]. Co ciekawe, szczep *Lb. kunkeei* DSM 12361<sup>T</sup> rośnie wolno zarówno na glukozie jak i na fruktozie, szczep potrzebuje od 5 do 7 dni aby urosnąć na obu podłożach. Wzrost szczepu *Lb. kunkeei* DSM 12361<sup>T</sup> na glukozie poprawił się poprzez dodanie pirogronianu lub hodowlę w warunkach tlenowych. Interesującym jest fakt, iż dany szczep rośnie bardzo powoli na glukozie lub na fruktozie, natomiast bardzo dobrze przy wspólnej fermentacji glukozy i fruktozy. Bakterie należące do szczepu *Lb. kunkeei* DSM 12361<sup>T</sup> produkują mannitol z fruktozy, co oznacza że cukier ten jest wykorzystany jako akceptor elektronów w ko-fermentacji. Szczep *Lb. kunkeei* DSM 12361<sup>T</sup> w warunkach tlenowych rośnie dobrze na pożywce z glukozą, natomiast przy suplementacji fruktozą wzrost jest niewielki, co sugeruje iż fruktoza jest bardzo słabo metabolizowana. Może to wynikać ze słabej aktywności fosfatazy fosfoenolpirogronianu cukru (PTS) dla fruktozy. *Lactobacilli* zwykle posiadają dwa systemy wychwytu fruktozy, to jest fruktozowy-PTS który pozwala na wykorzystanie fruktozy jako substratu oraz poprzez użycie permeazy fruktozy która umożliwia bakterii wykorzystanie fruktozy jako akceptora elektronów [1]. Specyficzny transporter fruktozy/mannitolu jest zwykle obecny u bakterii kwasu mlekowego [7]. W przypadku szczepu *Lb. kunkeei* DSM 12361<sup>T</sup>, który używa fruktozy jako akceptora elektronów, ale słabo jako substratu, szczep ten może mieć bardzo słabą aktywność transportera fruktozy/mannitolu właściwego dla PTS. Dehydrogenaza mannitolu, która działa jako akceptor elektronów w metabolizmie fruktozy [21], jest niezwiązana z PTS. Jednakże *Lb. kunkeei* oficjalnie zaklasyfikowany jest to obligatoryjnych FLAB przez Endo [10], ponieważ wszystkie szczepy *Lb. kunkeei* produkują gaz z D-glukozy, wytwarzają równomolową ilość kwasu octowego i mlekowego oraz nieznaczne ilości etanolu (w stosunku molowym odpowiednio 1:0,9–1,2:0,005–0,01). Cechy te są unikalne w grupie obligatoryjnych heterofermentatywnych bakterii kwasu mlekowego, lecz także skorelowane z charakterystyką bakterii obligatoryjnych fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego, włączając w to gatunki *Fructobacillus* [12].

Gatunek *Lb. kunkeei* jest Gram-dodatnią bakterią, o pałeczkowatym kształcie o rozmiarach  $0,5 \times 1-1,5 \mu\text{m}$ . Komórki występują pojedynczo, w parach, lub mogą

tworzyć łańcuszki. Są fakultatywnie beztlenowe, katalazo-ujemne, jednakże w obecności hemu uaktywnia się aktywność katalazy. Kolonie na agarze MRS po inkubacji w 30°C po dwóch dniach są białe, nieprzezroczyste, gładkie i wklęsłe, ich średnica w warunkach tlenowych mierzy około 1–2 mm, w beztlenowych są znacznie mniejsze około 0,1–0,2 mm średnicy [9]. Bakterie *Lb. kunkeei* preferuje temperatury w granicach 15–40°C, w 45°C następuje zahamowanie wzrostu. Komórki zwykle rosną przy pH 4,5–6,8, dla niektórych szczepów nawet 5,5–6,8 [11]. Gatunek ten wykazuje słaby wzrost na pożywce o 5% zawartości NaCl. Szczepy produkują prawie równomolową ilość kwasu mlekowego i octowego, przy śladowych ilościach etanolu. Kwas D-mlekowy i L-mlekowy są produkowane w stosunku 2:8. Gaz jest produkowany z glukozy. Mannitol jest produkowany z fruktozy. Azotyny nie są redukowane. Amoniak nie jest przekształcany z argininy. Dekstran nie jest wytwarzany z sacharozy. Cytrynian i jabłczan są wykorzystywane w obecności glukozy [9]. Peptydoglikan ściany komórkowej tego gatunku jest typu A4a (L-Lys-D-Asp). Zawartość G+C w DNA jest w zakresie od 36 do 37 mol%. Kwas jest produkowany z D-fruktozy, D-glukozy, i sacharozy. W zależności od

szczepu produkowany jest kwas z D-galaktozy, mannitolu, melibiozy, trehalozy, i w małym stopniu z glukonianu potasu. Kwas nie jest wytwarzany z L-arabinozy, L- i D-arbitolu, maltozy, D-arabinozy, rybozy, N-acetyloglukozaminy, aonitolu, arbutyny, amigdaliny, celobiozy, eskuliny, erytrytolu, L- i D-fukozy, β-gencjobiozy, 2 i 5-ketoglukoniany, metylo-α-D-glukozydu, rafinozy, melezytozy, ramnozy, salicyny, sorbitolu, skrobi, L-sorbozy, turanozy, D-tagatozy, L- i D-ksylozy, ksylitolu, α-D-mannozydu metylu oraz laktozy [11].

### 7.7. *Lactobacillus florum*

W 2010 roku wyizolowano *Lb. florum* z kwiatów *Paeonia suffruticosa*, i *Chrysanthemoides monilifera* pochodzących z Stellenbosch oraz z Hermanus z RPA. Gatunek *Lb. florum* jest wyjątkowy wśród FLAB ze względu na jego fakultatywną fruktofilność [17]. Bakterie z gatunku *Lb. florum* wykazują powolny wzrost na D-glukozie bez zewnętrznego akceptora elektronów oraz produkują etanol z D-glukozy, co jest cechą charakterystyczną dla fakultatywnie fruktofilnych LAB [10]. Wytwarza kwas tylko z D-glukozy, D-fruktozy, przy czym fermentacja D-fruktozy przebiega szybciej

Tabela I  
Porównanie wybranych cech fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego

	<i>F. fructosus</i>	<i>F. ficulneus</i>	<i>F. pseudo-ficulneus</i>	<i>F. tropaeoli</i>	<i>F. durionis</i>	<i>Lb. kunkeei</i>	<i>Lb. florum</i>
Gram	+	+	+	+	+	+	+
Morfologia	pałeczki	pałeczki	pałeczki	pałeczki	pałeczki	pałeczki	pałeczki
Tolerancja tlenu	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy
Próba na katalazę	ujemna	dodatnia	ujemna	ujemna	ujemna	dodatnia	ujemna
Rodzaj FLAB	obligatoryjnie fruktofilny	obligatoryjnie fruktofilny	obligatoryjnie fruktofilny	obligatoryjnie fruktofilny	obligatoryjnie fruktofilny	obligatoryjnie fruktofilny	fakultatywnie fruktofilny
Typ fermentacji, główne produkty	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy
Gaz z glukozy	tak	tak	tak	tak	tak	tak	tak
Rodzaj izomeru mleczanu	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	brak danych	brak danych
Redukcja azotanów	nie redukuje	nie redukuje	nie redukuje	nie redukuje	nie redukuje	nie redukuje	nie redukuje
Dekstran z sacharozy	nie	nie	nie	nie	nie	nie	nie
Optimum temperaturowe	30°C	30°C	30°C	15°C	35°C	30°C	30°C
Wzrost w temperaturze	6–45°C	6–40°C	4–37°C	10–45°C	5–45°C	15–45°C	15–45°C
Zakres pH	6,5–7,0	6,5–7,0	4,8–8,5	4,0–8,0	6,5–7,0	4,4–6,8	4,0–8,0
Wzrost na 5% NaCl	tak	tak	tak	nie	tak	tak*	tak
Wzrost na 40% fruktozie	tak	tak	tak	nie	tak	tak*	tak*
Piśmiennictwo	[2, 10, 12, 28,]	[2, 12, 13]	[5, 12]	[14, 18]	[3, 16]	[12, 31] *-badania własne	[5, 38] *-badania własne



niż D-glukozy. Dobry wzrost obserwowano na D-fruktozie, D-glukozie w obecności zewnętrznego akceptora elektronów. Bakterie te są heterofermentatywne, wytwarzają kwas mlekowy, etanol i kwas octowy odpowiednio w stosunku 1:0,8:0,2. Komórki *Lb. florum* są Gram-dodatnie, nie ruchliwe, wielkości  $0,8 \times 1,5-7 \mu\text{m}$ . Pałeczki występują pojedynczo w parach lub w formie łańcuszków. Preferowana temperatura do wzrostu to zakres  $15-40^\circ\text{C}$ , ale nie  $45^\circ\text{C}$ . Rośnie w pH 4,0–8,0 oraz w obecności 5% NaCl. Gatunek ten jest osmotolerancyjny, komórki rosną w stężeniu 30% fruktozy, należą do fakultatywnych beztlenowców. Test na katalazę jest zazwyczaj negatywny, lecz aktywność katalazy można zaobserwować u komórek rosnących na agarze FYP zawierających 5% owczej krwi. Kolonie na agarze FYP są beżowe, gładkie i po 3 dniach osiągają średnicę 1–2 mm w beztlenowych warunkach. Wzrost kolonii w warunkach tlenowych jest słaby. Gaz jest produkowany z D-glukozy. D-mleczan i L-mleczan są produkowane w stosunku 1:1. Azotyny nie są redukowane. Glukonian potasu jest słabo fermentowany. Kwas nie jest produkowany z L- i D-arabinozy, N-acetyloglukozaminy, D-arabitolu, maltozy, rybozy, celobiozy, L-arabitolu, adonitolu, amigdaliny, arutyny, eskuliny, dulcitolu, erytrytolu, L- i D-fukozy,  $\beta$ -gencjobiozy, 2 i 5-ketoglukonianu, metylo- $\alpha$ -D-glukozydu, glikogenu, D-galaktozy, melibiozy, mannitolu, inuliny, inozytolu, D-liksozy, D-mannozy, sacharozy, rafinozy, glicerolu, melezytozy, ramnozy, salicyny, sorbitolu, skrobi, L-sorbozy, turanozy, trehalozy, D-tagatozy, L- i D-ksylozy, ksylitolu,  $\alpha$ -D-mannozydu metylu oraz laktozy. Dekstran nie jest wytwarzany z sacharozy. Pirogromian zwiększa wzrost szczepów. Gatunek nie zawiera kwasu mezo-diaminopimelinowego w peptydoglikanie ściany komórkowej. Procentowa molowa zawartość G+C w DNA wynosi 42. Typowy szczep to F9-1<sup>T</sup> = Jcm 16035<sup>T</sup> = DSM 22689<sup>T</sup> [17].

## 8. Podsumowanie

Pomimo iż istnieje stosunkowo wiele informacji naukowych na temat bakterii kwasu mlekowego, to wciąż odkrywano są mikroorganizmy o nowych właściwościach, klasyfikowane w oddzielne grupy. Występowanie i przystosowanie się grupy LAB do wielu różnorodnych nisz ekologicznych, jest możliwe dzięki różnorodnemu potencjałowi metabolicznemu tych bakterii [21]. Analiza porównawcza genomu pokazała, że w trakcie ewolucji, *Lactobacillus* znacznie odbiegł od swoich przodków [32]. Genomowe i metaboliczne uproszczenie poprzez utratę genów lub ich degradację, spowodowało adaptację do środowisk produktów spożywczych takich jak mleko, piwo, wino czy też miód, w których obecne węglowodany stały się głównym źród-

łem węgla dla bytujących w nich bakterii [4, 36]. Fruktofilne bakterie kwasu mlekowego są wyjątkową grupą opisaną niedawno [4], posiadającą niepowtarzalne charakterystyczne cechy, do których należy dobry wzrost na D-fruktozie i D-glukozie w obecności zewnętrznego akceptora elektronów, przy preferencji i szybszej fermentacji D-fruktozy. Do tej pory opisano sześć obligatoryjnie fruktofilnych gatunków *F. fructosus*, *F. durionis*, *F. ficulneus*, *F. pseudoficulneus* [12], *Lb. kumkei* [10], *F. tropaeoli* [18] oraz jeden fakultatywnie fruktofilny *Lb. florum* [17]. Coraz częściej odkrywano są nowe gatunki posiadające fruktofilne cechy na przykład *Weissella confusa/cibaria*. Ewolucja bakterii w stronę fruktofilności zazwyczaj występuje na poziomie całego gatunku, lecz w przypadku niektórych gatunków bakterii właściwości te posiadają tylko niektóre szczepy [16].

Analiza szczepów izolowanych z przewodów pokarmowych pszczoł będących w różnych stadiach rozwoju, czy też z miodu i świeżego pyłku pszczelego wykazała u wszystkich szczepów fruktofilny charakter. Sugeruje to, iż pszczoły są bogatym i efektywnym źródłem FLAB. Co ciekawe, na podstawie wyników badań genetycznych izolaty FLAB pogrupowane zostały w grupy genetyczne, zgodne z ich źródłem pochodzenia, co wskazuje, że niektóre grupy genetyczne są wspólne dla pszczoł, larw i ich produktów [15]. Ponadto badania sugerują, iż fruktofilne bakterie kwasu mlekowego wraz z innymi gatunkami charakterystycznymi dla kwiatów i nektaru, mogą stanowić istotny czynnik zwabiania owadów zapylających. Ponad 200 gatunków roślin europejskich jest uznawanych za kwiaty często odwiedzane przez pszczoły miodne (*Apis mellifera* L.) [35]. Zauważono, iż indywidualna pszczoła ma tendencję trzymania się jednego rodzaju kwiatów przez pewien okres czasu, i spożywa nektar tylko z tego wybranego gatunku [22, 35]. Skłania to do głębszej analizy udziału mikroorganizmów w tym ekosystemie, albowiem stanowią niewidzialną większość, pod względem ilości jak i różnorodności gatunków, stąd też mogą odgrywać kluczową rolę w funkcjonowaniu zapylaczy [20, 43]. Metabolizm fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego sprawia, iż bakterie te mogą mieć wpływ na profil chemiczny nektaru, metabolizując jego pewne składniki.

W ten sposób bakterie bezpośrednio kontrolują owady zapylające, a tym samym wpływają pośrednio na kondycję roślin [25, 26, 42]. Poznanie fruktofilnych gatunków kwasu mlekowego i innych bakterii kultur nektarowych jest kluczowym czynnikiem do poznania ekologii roślin i ich zapylaczy [22]. Odkrycie grupy FLAB znacznie poszerza informacje na temat bakterii kwasu mlekowego. Unikalne cechy fruktofilnych bakterii są ściśle powiązane z bogatym w składniki odżywcze środowiskiem, w którym żyją. Ich nietypowy metabolizm niesie ze sobą ogromny potencjał do przyszłego wykorzystania w przemyśle.

## Piśmiennictwo

- Akinterinwa O., Khankal R., Cirino P.C.: Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. *Curr. Op. Biotechnol.* **19**, 461–467 (2008)
- Antunes A., Rainey F.A., Nobre M.F., Schumann P., Ferreira A.M., Ramos A., Santos H., da Costa M.S.: *Leuconostoc ficulneum* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe fig, and reclassification of *Lactobacillus fructosus* as *Leuconostoc fructosum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **52**, 647–655 (2002)
- Axelsson L.: Lactic acid bacteria: classification and physiology (w) Lactic Acid Bacteria. red. S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand, Marcel Dekker Inc., New York, 1993, s. 1–63
- Azcarate-Peril M.A., Klaenhammer T.R.: Genomics of lactic acid bacteria: The post-genomics challenge – from sequence to function (w) Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel Applications. red. F. Mozzi, R.R. Raya, G.M. Vignolo, Wiley-Blackwell, Hoboken, 2010, s. 32–54
- Chambel L., Chelo I.M., Ze' Ze' L., Pedro L.G., Santos M.A., Tenreiro R.: *Leuconostoc pseudoficulneum* sp. nov., isolated from a ripe fig. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **56**, 1375–1381 (2006)
- Chelo I.M., Zé-Zé L., Tenreiro R.: Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *dnaA*, *gyrB*, *rpoC* and *dnaK*. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **57**, 276–286 (2007)
- Davis C.R., Wibowo D., Eschenbruch R., Lee T.H., Fleet G.H.: Practical implications of malolactic fermentation: a review. *Am. J. Enol. Viticult.* **36**, 290–301 (1985)
- De Bruyne K., Schillinger U., Caroline L., Boehringer B., Cleenwerck I., Vancanneyt M., De Vuyst L., Franz C.M.A.P., Vandamme P.: *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **57**, 2952–2959 (2007)
- Edwards C.G., Haag K.M., Collins M.D., Hutson R.A., Huang Y.C.: *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 698–702 (1998)
- Endo A., Futagawa-Endo Y., Dicks L.M.T.: Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructoserich niches. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**, 593–600 (2009)
- Endo A., Irisawa T., Futagawa-Endo Y., Takano K., du Toit M., Okada S., Dicks L.M.: Characterization and emended description of *Lactobacillus kunkeei* as a fructophilic lactic acid bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **62**, 500–504 (2012)
- Endo A., Okada S.: Reclassification of the genus *Leuconostoc*, and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **58**, 2195–2205 (2008)
- Endo A., Dicks L.M.T.: The genus *Fructobacillus*. Lactic acid bacteria biodiversity and taxonomy (w) Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. red. H.W. Holzapfel, B.J.B. Wood, Wiley-Blackwell, Hoboken, 2014, s. 381–385
- Endo A.: Fructophilic lactic acid bacteria inhabit fructose-rich niches in nature. *Microb. Ecol. Health D.*, DOI: 10.3402/mehd.v23i0.18563. (2012)
- Endo A., Salminen S.: Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 444–448 (2013)
- Endo A., Futagawa-Endo Y., Dicks L.M.T.: Influence of carbohydrates on the isolation of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 1085–1092 (2011)
- Endo A., Futagawa-Endo Y., Sakamoto M., Kitahara M., Dicks L.M.: *Lactobacillus florum* sp. nov., a fructophilic species isolated from flowers. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **60**, 2478–2482 (2010)
- Endo A., Irisawa T., Futagawa-Endo Y., Sonomoto K., Itoh K., Takano K., Okada S., Dicks L.M.T.: *Fructobacillus tropaeoli* sp. nov., a novel fructophilic lactic acid bacterium isolated from a flower. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **61**, 898–902 (2011)
- Endo A., Tanaka N., Oikawa Y., Okada S., Dicks L.: Fructophilic characteristics of *Fructobacillus* spp. may be due to the absence of an alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*). *Curr. Microbiol.* **68**, 531–535 (2014)
- Fuhrman J.A.: Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, **459**, 193–199 (2009)
- Gajewska J., Blaszczyk M.K.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Post. Mikrobiol.* **51**, 55–65 (2012)
- Gruter C., Moore H., Firmin N., Helantera H., Ratnieks F.L.: Flower constancy in honey bee workers (*Apis mellifera*) depends on ecologically realistic rewards. *J. Exp. Biol.* **214**, 1397–1402 (2011)
- Hammes W.P., Hertel C.: The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. (w) The Prokaryotes. red. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt, Springer, New York, 2006, s. 320–403
- He H., Chen Y., Zhang Y., Wei C.: Bacteria associated with gut lumen of *Camponotus japonicus* Mayr. *Environ. Entomol.* **40**, 1405–1409, (2011)
- Herrera C.M., Garcia I.M., Perez R.: Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology*, **89**, 2369–2376 (2008)
- Herrera C.M., Pozo M.I.: Nectar yeasts warm the flowers of a winter-blooming plant. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* **277**, 1827–1834 (2010)
- Klaenhammer T.R., Altermann E., Pfeiler E., Buck B.L., Goh Y.J., O'Flaherty S., Barrangou R., Duong T.: Functional genomics of probiotic *Lactobacilli*. *J. Clin. Gastroenterol.* **42**, 160–162 (2008)
- Kodama R.: *Lactobacillus fructosus* nov. sp., a new species of lactic acid bacteria. Studies on the nutrition of lactic acid bacteria. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **30**, 705–708 (1956)
- Koo O.K., Jeong D.W., Lee J.M., Kim M.J., Lee J-H., Chang H.C., Kim J.H., Lee H.J.: Cloning and characterization of the bifunctional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*) in *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. *Biotechnol. Lett.* **27**, 505–510 (2005)
- Lefeber T., Gobert W., Vrancken G., Camu N., De Vuyst L.: Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiol.* **28**, 457–464 (2011)
- Leisner J.J., Vancanneyt M. i wsp.: *Leuconostoc durionis* sp. nov., a heterofermenter with no detectable gas production from glucose. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **55**, 1267–1270 (2005)
- Makarova K., Slesarev A., i wsp.: Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **42**, 15611–15616 (2006)
- Makarova K.S., Koonin E.V.: Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* **189**, 1199–1208 (2007)
- Marri P.R., Hao W., Golding G.B.: Gene gain and gene loss in streptococcus: is it driven by habitat? *Mol. Biol. Evol.* **23**, 2379–2391 (2006)
- Moran N.A., Hansen A.K., Powell J.E., Sabree Z.L.: Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS One*, **7**, e36393 (2012)
- Mtshali P.S., Divol B., Du Toit M.: Identification and characterization of *Lactobacillus florum* strains isolated from South African grape and wine samples. *Int. J. Food Microbiol.* **153**, 106–113 (2012)

37. Nielsen D.S., Teniola O.D., Ban-Koffi L., Owusu M., Andersson T.S., Holzapfel W.H.: The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 168–186, (2007)
38. Nuraida L., Grigolava I., Owens J.D., Campbell-Platt G.: Oxygen and pyruvate as external electron acceptors for *Leuconostoc* spp. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 517–522, (1992)
39. Papalexandratou Z., Falony G., Romanens E., Jimenez J.C., Amores F., Daniel H.M., De Vuyst L.: Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 7698–7714 (2011)
40. Rachman C.N., Kabadjova H., Prévost H., Dousset X.: Identification of *Lactobacillus alimentarius* and *Lactobacillus farciminis* with 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism and PCR amplification using species-specific oligonucleotide. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 1207–1216 (2003)
41. Thaochan N., Drew R.A., Hughes J.M., Vijayasegaran S., Chinajariyawong A.: Alimentary tract bacteria isolated and identified with API-20E and molecular cloning techniques from Australian tropical fruit flies, *Bactrocera cacuminata* and *B. tryoni*. *J. Insect Sci.* **10**, 1–16 (2010)
42. Vannette R.L., Gauthier M.P.L., Fukami T. Nectar bacteria, but not yeast, weaken a plant-pollinator mutualism. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* **280**, DOI: 10.1098/rspb.2012.2601 (2012)
43. Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6578–6583 (1998)
44. Zavaleta A.I., Martinez-Murcia A.J., Rodriguez-Valera F.: 16S-23S rDNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. *Microbiology*, **142**, 2102–2114 (1996)