

BAKTERIOCYNINY W ŻYWIENIU ZWIERZĄT

Damian Józefiak, Bartosz Kierończyk, Mateusz Rawski

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej,
ul. Wołyńska 33, 60-673 Poznań

Słowa kluczowe: bakteriocyny, żywienie, mikroflora układu pokarmowego

Właściwości i klasyfikacja bakteriocyn

Bakteriocyny to wydzielane zewnątrzkomórkowo związki o budowie białkowej, które są syntetyzowane przez wiele gatunków bakterii obecnych w różnych ekosystemach. Kryteriami ich klasyfikacji są właściwości chemiczne, czynniki genetyczne, sposób działania oraz zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej (Klaenhammer, 1993, Jack *et al.*, 1995, Józefiak and Sip, 2013). Cechują się wysoką stabilnością w wielu rozpuszczalnikach organicznych, polimerach i roztworach detergentów, a ich masa cząsteczkowa mieści się w przedziale od kilku do kilkudziesięciu kDa. Bakterie produkujące bakteriocyny chronią się przed ich działaniem poprzez wydzielanie specyficznych białek odpornościowych, które kodowane są w operonie bakteriocynowym. Dla wielu szczepów bakterii odgrywają one istotną rolę w procesie kolonizacji różnych środowisk, w tym układu pokarmowego. Jednakże, w związku z budową białkową, wykazują podatność na działanie enzymów proteolitycznych, a większość z nich zostaje inaktywowana pod wpływem endogennych enzymów trawiennych takich jak pepsyna, trypsyna, proteinaza K oraz pronaza E. Znaczna część bakteriocyn jest stabilna w przedziale pH od 3.0 do 9.0, co więcej w ciśnieniu 1 atmosfery, zachowują aktywność nawet po działaniu temperatury do 121°C przez kilka minut (Montville *et al.*, 1995). Powyższe cechy świadczą o wysokim potencjale bakteriocyn w żywieniu zwierząt oraz w przemyśle paszowym. Gdyż nawet po częściowym trawieniu w górnych segmentach układu pokarmowego, niektóre z nich mogą modyfikować mikroflorę jelitową (Józefiak *et al.*, 2011, Józefiak *et al.*, 2013).

Zdolność do produkcji bakteriocyn wykazuje szereg szczepów bakteryjnych, izolowanych z produktów żywnościowych i przewodu pokarmowego zwierząt (Józefiak and Sip, 2013). Dotyczy to również bakterii fermentacji mlekowej, które są szeroko używane w przemyśle spożywczym i paszowym, posiadając równocześnie status GRAS (generally regarded as safe, 21 CFR 184.1538). Bakteriocyny syntetyzowane przez bakterie fermentacji mlekowej są zaliczane do 4 klas: I, II, III, IV (Klaenhammer, 1993, Nes *et al.*, 1996, Hécharde and Sahl, 2002, Diep *et al.*, 2007). Klasa I zawiera lantynobiotyki, t. j. termostabilne, membranowo-aktywne peptydy, w których budowie obecna jest lantionina, a ich masa cząsteczkowa nie przekracza 5 kDa. Do klasy II zaliczane są nielantynobiotykowe, termostabilne i membranowo-aktywne bakteriocyny, o masie cząsteczkowej poniżej 13kDa. Cechą charakterystyczną dla tej klasy jest sekwencja Gly-Gly obecna w peptydzie prekursorowym, rozpoznawanym przez specyficzne proteazy odcinające go od aktywnej formy bakteriocyny. Wyróżniono w niej 4 podklasy: IIa – pediocynopodobne, inaczej znane również jako cystynobiotyki; IIb – dwupeptydowe; IIc – bakteriocyny sec-zależne oraz IId – bakteriocyny różniące się od pozostałych należących do klasy II. W klasie III uwzględnia się termolabilne peptydy o masie cząsteczkowej powyżej 30 kDa, nie wykazujące zdolności do uszkodzenia membran komórkowych. Bakteriocyny zbudowane z połączeń białkowo-lipidowych oraz białkowo-węglowodanowych zostały zakwalifikowane do klasy IV (Józefiak and Sip, 2013). Bakterie kwasu mlekowego szeroko stosowane jako probiotyki są najczęściej zdolne do produkcji bakteriocyn. Fakt ten powinien być rozważany jako istotny czynnik wpływający na ich prozdrowotne właściwości. Pomimo częstego poruszania w literaturze tematu bakterii probiotycznych u wielu gatunków zwierząt, niewiele informacji jest dostępnych w aspekcie postrzegania aktywności bakteriocyn jako jednego z najistotniejszych mechanizmów działania omawianej grupy bakterii. Obecnie uważa się, że mają one zdolności bakteriobójcze i/lub bakteriostatyczne. Ich sposób działania opiera się o przyłączanie do specyficznych receptorów zlokalizowanych na powierzchni komórek bakteryjnych. Ułatwiają one transport bakteriocyn i innych cząstek przez membrany komórkowe. Dzięki tym właściwości bakteriocyny mogą powodować porażę ściany komórkowej, liżę komórki jak również upośledzanie bądź hamowanie syntezy DNA, RNA i białka (Diep *et al.*, 2007). W przeciwieństwie do antybiotyków, charakteryzują się one wąskim spektrum aktywności. Niezależnie od produkującego je

szczepu i klasy, działają wysoce specyficznie, wykazując właściwości antagonistyczne w stosunku do niewielkiej liczby gatunków bakterii, najczęściej blisko spokrewnionych z producentem danej bakteriocydu. Cechą przeciwstawną w tych dwóch grup związków jest również fakt posiadania, przez część bakteriocydu, właściwości bójczych lub hamujących względem bakterii potencjalnie patogennych, przy równoczesnym braku oddziaływania na mikroorganizmy uznawane za pożyteczne dla zdrowia człowieka i zwierząt w tym szczepy probiotyczne (Cleveland *et al.*, 2001, Gálvez *et al.*, 2007, Gálvez *et al.*, 2008). Ponadto, bakteriocydy trawione są do prostych, nieszkodliwych, dobrze metabolizowanych aminokwasów, nie wykazując właściwości cytotoksycznych, ani kancerogennych dla ludzi i zwierząt.

Bakteriocydy w żywieniu zwierząt

Mikrobiom układu pokarmowego pełni kluczową rolę dla zdrowia zwierząt, wpływając na ich dobrostan i wyniki odchowu (Choct, 2009, Mani *et al.*, 2014). Równocześnie wiele gatunków bakterii zasiedlających przewód pokarmowy drobiu i trzody chlewnej może powodować choroby u ludzi. Drób jest postrzegany jako istotny rezerwuuar mikroorganizmów zoonotycznych takich jak *Campylobacter jejuni* czy *Salmonella* sp.. Uznaje się więc, że homeostaza mikrobiologiczna układu pokarmowego jest istotnym elementem jakości i bezpieczeństwa łańcucha pokarmowego. Co więcej, w ostatnich dekadach w produkcji zwierzęcej coraz większą rolę odgrywa głos opinii publicznej, której uwaga skupia się na dobrostanie zwierząt, ograniczeniu użycia antybiotyków jak również zrównoważonych systemach produkcji. Z powyższych względów, warto rozważyć potencjalną rolę bakteriocydu w żywieniu zwierząt. Zaskakującym wydaje się fakt, iż zgodnie z dyrektywą Unii Europejskiej (numer 1831) żaden z preparatów zawierających bakteriocydy nie został zarejestrowany jako dodatek paszowy, na terenie UE. Natomiast już od ponad 40 lat, jedna z najlepiej poznanych bakteriocydu – nizyna, jest używana w żywieniu człowieka. Została ona dopuszczona jako dodatek do żywności i oznaczona symbolem E234, a na terenie USA Agencja Żywności i Leków nadała jej status GRAS (GRN 000065). Nizyna znajduje szerokie zastosowanie jako konserwant żywności i jest stosowana w produkcji przetworów mlecznych, jednakże nie wykorzystywana w paszach dla zwierząt. Dane uzyskane podczas doświadczeń prowadzonych na przeżuwaczach, z użyciem metod *in-vivo* i *in-vitro* wskazują, że nizyna może wpływać na fermentację i metanogenezę w żwaczu, w sposób podobny do kokcydiostatyku jonoforowego – monenzyny. W przypadku kurcząt rzeźnych suplementacja diety z użyciem nizyny jak również salinomycyny pozytywnie oddziałuje na wyniki odchowu wywołując ponadto odpowiedź zależną od jej dawki (Józefiak *et al.*, 2013). W literaturze naukowej, dostępne są również prace dotyczące pozytywnego oddziaływania innych bakteriocydu. Przykładowo, badania przeprowadzone na nie patogennym szczepie *S. suis* 94-623 ukazują jego zdolność do produkcji peptydu aktywnego względem *Streptococcus suis* serotyp 2 - istotnego patogenem w produkcji trzody chlewnej. Albuzyne B, syntetyzowana przez *Ruminococcus albus* 7, poprawia wyniki odchowu kurcząt rzeźnych, zwiększając absorpcję jelitową składników pokarmowych i ograniczając populację *Enterococcus* sp. i *Salmonella* sp. (Wang *et al.*, 2011). Wykazano również iż, suplementacja diety indyków bakteriocydnami B602 produkowaną przez *Paenibacillus polymyxa* (NRRL B-30509) oraz OR7 syntetyzowaną przez *Lactobacillus salivarius* (NRRL B-35014) ogranicza koncentrację *Campylobacter jejuni* (Cole *et al.*, 2006).

Podsumowując, bakteriocydy są obecne w żywieniu człowieka od wieków, a wiele szczepów bakterii fermentacji mlekowej znajdujących zastosowanie w fermentowanych produktach mlecznych lub mięsnych, naturalnie je syntetyzuje. Ponadto, obecność tej grupy związków została stwierdzona w przewodzie pokarmowym wielu gatunków zwierząt. Szeroka grupa preparatów probiotycznych używanych w przemyśle paszowym, zawiera w swoim składzie szczepy zdolne do ich produkcji. Mimo tego, dotychczas żadna z bakteriocydu nie została dopuszczona do użytku jako dodatek paszowy na terenie Unii Europejskiej.

Stosowanie antybiotykowych stymulatorów wzrostu zostało zabronione na terenie UE. Użycie antybiotyków leczniczych powoduje coraz więcej obaw związanych z rozwojem antybiotykooporności. Konsekwencje jakie może ona mieć dla zdrowia człowieka, powodują coraz większy nacisk na rozwój alternatywnych metod kontroli i zapobiegania infekcjom bakteryjnym przewodu pokarmowego. Z powyższych względów, użycie bakteriocydu jako

czynników poprawiających wyniki odchowu oraz bezpieczeństwo sanitarne, może stać się istotnym zagadnieniem, a komercyjne użycie preparatów zawierających oczyszczone bakteriocyny wydają się kwestią czasu.

Piśmiennictwo

- Choct M 2009. Managing gut health through nutrition. *British poultry science* 50, 9-15.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF and Chikindas ML 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology* 71, 1-20.
- Cole K, Farnell M, Donoghue A, Stern N, Svetoch E, Eruslanov B, Volodina L, Kovalev Y, Perelygin V and Mitsevich E 2006. Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in turkey poults. *Poultry science* 85, 1570-1575.
- Diep DB, Skaugen M, Salehian Z, Holo H and Nes IF 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2384-2389.
- Gálvez A, Abriouel H, López RL and Omar NB 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology* 120, 51-70.
- Gálvez A, López RL, Abriouel H, Valdivia E and Omar NB 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical reviews in biotechnology* 28, 125-152.
- Hécharde Y and Sahl H-G 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84, 545-557.
- Jack RW, Tagg JR and Ray B 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews* 59, 171-200.
- Józefiak D and Sip A 2013. Bacteriocins In Poultry Nutrition—A Review/Bakteriocyny w żywieniu drobiu—artykuł przeglądowy. *Annals of Animal Science* 13, 449-462.
- Józefiak D, Sip A, Rawski M, Steiner T and Rutkowski A 2011. The dose response effects of liquid and lyophilized *Carnobacterium divergens* AS7 bacteriocin on the nutrient retention and performance of broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences* 516, 49.
- Józefiak D, Kierończyk B, Juśkiewicz J, Zduńczyk Z, Rawski M, Długosz J, Sip A and Højberg O 2013. Dietary nisin modulates the gastrointestinal microbial ecology and enhances growth performance of the broiler chickens. *PloS one* 8, e85347.
- Klaenhammer TR 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews* 12, 39-85.
- Mani S, Boelsterli UA and Redinbo MR 2014. Understanding and Modulating Mammalian-Microbial Communication for Improved Human Health. *Annual review of pharmacology and toxicology* 54, 559-580.
- Montville T, Winkowski K and Ludescher R 1995. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal* 5, 797-814.
- Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V and Holo H 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 113-128.
- Wang HT, Yu C, Hsieh YH, Chen SW, Chen BJ and Chen CY 2011. Effects of albusin B (a bacteriocin) of *Ruminococcus albus* 7 expressed by yeast on growth performance and intestinal absorption of broiler chickens—its potential role as an alternative to feed antibiotics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 2338-2343.

BACTERIOCINS IN ANIMAL NUTRITION

Damian Józefiak, Bartosz Kierończyk, Mateusz Rawski

Poznań University of Life Sciences, Department of Animal Nutrition and Feed Management,
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań, e-mail: damjo@up.poznan.pl

Key words: bacteriocins, nutrition, GIT microflora

Bacteriocins properties and classification

Bacteriocins are extracellular proteinaceous compounds synthesized by many bacterial species found in different environments. These peptides are classified with respect to their chemical properties, genetic determinants, modes of action and scopes of antimicrobial activity (Klaenhammer, 1993, Jack *et al.*, 1995, Józefiak and Sip, 2013). Bacteriocins are stable in many organic solvents, polymers and detergent solutions and have molecular weights of a few to several dozen kDa. Bacteria capable to produce bacteriocins protect themselves against the toxicity of their own peptides by the expression of specific immunity proteins, which are generally encoded in the bacteriocin operon. Therefore, for many bacterial species bacteriocins are important tools in the process of the colonization of the different environments, including gastro-intestinal tract (GIT). However, it should be stated that due to their proteinaceous nature, bacteriocins are sensitive to proteolytic enzymes. Therefore, most of them get inactivated after being treated with digestive enzymes as pepsin, trypsin, proteinase K and pronase E. Finally most bacteriocins are pH-stable in the range of 3.0 to 9.0. Moreover, at 1 atmosphere pressure they remain active after exposure to 121°C for a few min (Montville *et al.*, 1995). Those futures should be considered as very useful in animal nutrition and feed manufacturing. Specifically that even after partial digestion in upper segments of the GIT, some bacteriocins can modify microbiom of the ileum (Józefiak *et al.*, 2011, Józefiak *et al.*, 2013)

Many bacteria species found in food and animal GIT can synthesize bacteriocins (Józefiak and Sip, 2013). These include lactic acid bacteria (LAB), which are commonly used in food and feed industry and have GRAS status G Regarded As Safe, 21 CFR 184.1538). Bacteriocins produced by LAB have been organized into four classes: I, II, III, IV (Klaenhammer, 1993, Nes *et al.*, 1996, Héchar and Sahl, 2002, Diep *et al.*, 2007). Class I includes lantibiotics, i.e. thermostable, membrane-active peptides, of molecular mass under 5 kDa, containing lanthionine in their structure. Class II comprises non-lantibiotics, thermostable and also membrane-active peptides, of molecular mass under 13 kDa. The characteristic trait of class II bacteriocins is a Gly-Gly sequence present in the precursory peptide, which is recognized by site-specific proteases cutting off a leader peptide from an active bacteriocin. Class II comprises 4 sub-classes: IIa – pediocin-like bacteriocins, a.k.a. cystibiotics, IIb – dipeptide bacteriocins, IIc – sec-dependent bacteriocins, and IId – bacteriocins differing from all the other bacteriocins class II. Class III consists of thermolabile bacteriocins of molecular mass above 30 kDa having no membrane damaging properties. Bacteriocins which form protein-lipid or protein-carbohydrate complexes have been included into class IV (Józefiak and Sip, 2013). While most of the LABs are capable to produce bacteriocins and usually members of this family are taken for probiotic production. It should be stressed out that it is crucial to specify the properties of probiotics in terms of bacteriocins production. However even though, that in available literature are many papers on probiotics usage in different animal species, much less information is given on their mode action and possible involvement of the bacteriocins.

For today, it is well established that bacteriocins have either bactericidal or bacteriostatic activity. Their mode of action is based on binding to specific receptors located on the surface of microorganisms. These receptors facilitate the transport of bacteriocins and other compounds through cell membranes. Therefore, bacteriocins may cause: cell membrane poration, cell lysis as well as disruption or inhibition of DNA, RNA and proteins synthesis (Diep *et al.*, 2007). Irrespective of the type and producing strain, bacteriocins are highly specific in their action and this future distinguishes those peptides from most antibiotics. Therefore their activity is much narrower than that of antibiotics; since bacteriocins usually are antagonistic against a few bacterial groups, usually closely related to the bacteriocin-producers themselves. Moreover, some bacteriocins toxic to food-borne pathogens are

often inactive towards microorganisms beneficial for human and animal organisms, i.e. probiotics (Cleveland *et al.*, 2001, Gálvez *et al.*, 2007, Gálvez *et al.*, 2008). This feature is reverse to the scope of activity of most antibiotics. Finally, they are digested into simple, non-harmful and well-metabolized compounds and are non-cytotoxic and non-carcinogenic for humans and animals (Cleveland *et al.*, 2001).

Bacteriocins in animal nutrition

Human and animal GIT microbiome is the key factor for health (Choct, 2009, Mani *et al.*, 2014). Apart from effects on well-being and performance of the host, some microbiota species from the pig or chicken GIT cause disease in humans. Poultry is considered to be an important reservoir of zoonotic bacteria like *Campylobacter jejuni* or *Salmonella* sp. Thus, gut health of farm animals is an important point in food chain quality and safety.

Moreover, in recent decades an important factor in livestock production is public opinion. Which demands welfare, reduction of in-feed antibiotics as well as sustainable production systems. Therefore the question could be posed, what is the potential role of the bacteriocins in modern animal nutrition? Surprisingly for today, according to EU directive 1831, no bacteriocin preparations are registered as a feed additive. In contrast in human nutrition, nisin is approved with the assigned E-number E234 (EEC, 1983). In USA it has been granted GRAS (GRN 000065) status by the United States Food and Drug Administration. Therefore, nisin is commonly used feed preservative, and can be found in different dairy products but not in animal feed. Data from *in vivo* and *in vitro* studies with ruminants, indicates that nisin can influence rumen fermentation and methanogenesis and nisin has been reported to exert effects similar to the ionophore monensin (Józefiak *et al.*, 2013). In broiler chickens like salinomycin, nisin supplementation improved growth performance in a dose-dependent manner (Józefiak and Sip, 2013). In the available literature there are also other reports showing positive effects of many other bacteriocins (Józefiak and Sip, 2013). For instance recent work conducted on non-pathogenic strain of *S. suis* 94-623 indicates its capability to produce bacteriocin active against important pig pathogen - *Streptococcus suis* serotype 2. Albusin B (bacteriocin) of *Ruminococcus albus* 7 expressed by yeast, has been shown to increase intestinal nutrient absorption, decrease the population of *Enterococcus* sp. and *Salmonella* sp., and improve the growth performance of broiler chickens (Wang *et al.*, 2011). Moreover reduction of *Campylobacter jejuni* has also been demonstrated in turkey poults after dietary addition of bacteriocin B602 from *Paenibacillus polymyxa* (NRRL B-30509) and bacteriocin OR7 from *Lactobacillus salivarius* NRRL B-35014 (Cole *et al.*, 2006).

In conclusion bacteriocins are present in human food for ages, while many of the LAB strains found in fermented dairy products or meat are naturally producing those peptides. Moreover presence of the bacteriocins is well documented in GIT of different animal species. Finally many probiotic preparations, which are commonly used in the feed industry, are composed out of bacteriocin producing strains. However till today pure bacteriocins preparations are not allowed to use as feed additive in EU.

The use of antibiotic growth promoters is forbidden in EU member countries, in-feed therapeutic antibiotics raise more and more fears in regard to the apparition of bacterial resistances, which can ultimately affect humans, studies aiming to develop alternative methods for the prevention and control food-borne pathogens are important. Therefore application of the bacteriocins as potential factors to improve performance and health of the animal production could be an important issue and maybe soon pure bacteriocins preparations will be available for commercial use.