



Bakteriocyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Daniela Gwiazdowska¹, Krystyna Trojanowska²

¹Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Akademia Ekonomiczna, Poznań

²Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Bacteriocins – properties and antimicrobial activity

Summary

Bacteriocins are heterogeneous group of ribosomally synthesized proteins or peptides produced by different bacteria that kill or inhibit growth of other bacteria. The interest in bacteriocins results from their potential application as biopreservatives in food to inhibit the growth of spoilage or pathogen bacteria. In this paper, identification of these metabolites and their physical and biochemical properties, including spectrum of activity, terms of size, amino acid sequence, modes of action and immunity mechanisms are presented.

Key words:

bacteriocins, properties, antimicrobial activity, structure, mode of action, biopreservatives.

1. Wprowadzenie

Zjawisko antagonistycznego oddziaływania mikroorganizmów, zapoczątkowane odkryciem penicyliny, doprowadziło do poznania szeregu substancji przeciwdrobnoustrojowych, w tym bakteriocyn. Według Klaenhammera (1) 99% bakterii posiada zdolność do wytwarzania co najmniej jednej bakteriocyny. Zdolność tę zaobserwowano najpierw u bakterii gramujemnych, a dopiero później u bakterii gramodatnich (1,2).

Zainteresowanie bakteriocynami wynika z potencjalnego zastosowania tych metabolitów, jak również mikroorganizmów bakteriocynogennych jako naturalnych konserwantów żywności (3).

Adres do korespondencji

Daniela Gwiazdowska,
Katedra Biochemii
i Mikrobiologii,
Akademia Ekonomiczna,
al. Niepodległości 10,
60-967 Poznań.

Na podstawie dokonanej izolacji bakteriocyn z żywności dowodzi się, że wraz z różnorodnymi produktami, człowiek spożywa je nieświadomie od lat, a co za tym idzie, są to bezpieczne, nietoksyczne związki, równie efektywne jak substancje chemiczne (4).

Bakteriocyny to białkowe metabolity wytwarzane przez bakterie gramdodatnie i gramujemne wykazujące działanie przeciwdrobnoustrojowe. Pod względem funkcjonalnym należą do grupy związków antymikrobiologicznych, do których zaliczane są tioniny, wytwarzane przez rośliny (5) oraz produkowane przez zwierzęta defensyny, magaininy i cekropiny (6). Związki te wykazują liczne podobieństwa strukturalne do bakteriocyn, takie jak: niska masa cząsteczkowa, termostabilność i hydrofobowość.

Bakteriocyny stanowią grupę związków o zróżnicowanych właściwościach biochemicznych, masie cząsteczkowej, mechanizmie działania, spektrum aktywności oraz lokalizacji i sekwencji genu kodującego aktywne białko (7). Według definicji Tagga i in. (2) są to substancje bakteriobójcze w stosunku do mikroorganizmów spokrewnionych z producentem określonej bakteriocyny. Bliższa charakterystyka wielu bakteriocyn ujawniła antybakteryjną aktywność wobec mikroorganizmów należących do innych rodzajów niż producent, w tym wobec organizmów patogenych jak *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* czy *Clostridium* spp. (8).

W badaniach przeprowadzonych na poziomie molekularnym wykazano, że bakteriocyny są rybosomalnie syntetyzowanymi peptydami lub białkami (1), generalnie wydzielanymi na zewnątrz komórki, chociaż część z nich może pozostać związana z biomasą (7). Geny kodujące zdolność do syntezy bakteriocyny zlokalizowane są w DNA plazmidowym lub chromosomalnym (9). Mikroorganizmy wytwarzające bakteriocyny wykazują jednocześnie na nie odporność. Wiąże się to z budową większości operonów bakteriocyn, zawierających geny kodujące aktywne białko, kodujące odporność na nie, a także geny odpowiedzialne za transport bakteriocyny z komórki i niekiedy, geny kodujące enzymy uczestniczące w potranslacyjnej modyfikacji bakteriocyn.

Do najlepiej poznanych i najszerzej badanych bakteriocyn należą bakteriocyny syntetyzowane przez bakterie fermentacji mlekowej. Aż do odkrycia pierwszej bakteriocyny – nizyny, syntetyzowanej przez *Lactococcus lactis*, antybakteryjne właściwości bakterii mlekowych przypisywano ich zdolności do produkcji kwasów organicznych i nadtlenu wodoru (4).

Rozwój badań doprowadził w ostatnich latach do poznania nowych bakteriocyn, wytwarzanych także przez inne rodzaje bakterii. Wiele prac dotyczy struktury cząsteczki, sekwencji nukleotydowej genu oraz mechanizmu działania bakteriocyn. Uważa się, że idealna substancja antymikrobiologiczna, potencjalny biokonserwant żywności, powinna charakteryzować się szerokim zakresem aktywności, obejmującym mikroorganizmy patogene, właściwościami fizykochemicznymi warunkującymi odporność na wysokie temperatury i zmiany pH oraz niską masą cząsteczkową, ułatwiającą dyfuzję w produktach półpłynnych (7).

Celem opracowania jest charakterystyka bakteriocyn z uwzględnieniem właściwości mających najistotniejsze znaczenie dla ich praktycznego zastosowania.

2. Klasyfikacja bakteriocyn

Klasyfikacja bakteriocyn opiera się na zróżnicowaniu struktury chemicznej, masy cząsteczkowej, wrażliwości na działanie enzymów, obecności modyfikowanych aminokwasów oraz mechanizmie działania.

2.1. Bakteriocyny bakterii gramdodatnich

W klasyfikacji bakteriocyn bakterii gramdodatnich (tab. 1), zaproponowanej przez Klaenhammera (1) uwzględnia się cztery główne klasy, w obrębie których tworzone są podklasy:

Tabela 1

Klasyfikacja bakteriocyn bakterii gramdodatnich (7,8,11)

Klasa bakteriocyn	Bakteriocyna	Producent	Literatura
1	2	3	4
I – lantynyotyki	nizyna A	<i>Lactococcus lactis</i>	(28)
	nizyna Z	<i>Lactococcus lactis</i>	(28)
	subtilina	<i>Bacillus subtilis</i>	(29)
	epidermina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(30)
	gallidermina	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	(30)
	mutacyna B-Ny266	<i>Streptococcus mutans</i> Ny266	(31)
II – bakteriocyny nielantynyotkowe	II a – bakteriocyny pediocynopodobne		
	pediocyna AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i> H	(32)
	leukocyna A-UAL 187	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL187	(33)
	mesenterocyna Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105	(34)
	acidocyna A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> TK9201	(35)
	bawarycyna A	<i>Lactobacillus bavaricus</i> M1401	(36)
	kurwacyna A	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174	(37)
	diwercyna V41	<i>Carnobacterium divergens</i> V41	(38)
	II b – bakteriocyny dwupeptydowe		
	laktokokcyna M (LcnM i LcnN)	<i>Lactococcus cremoris</i> 9B4	(16)
	laktacyna F (LafA i LafX)	<i>Lactobacillus jonhsonii</i> VP111088	(18)
	plantarycyna S (Pls α i Pls β)	<i>Lactobacillus plantarum</i> LCPO10	(19)
	leukocyna H (α i β)	<i>Leuconostoc</i> sp. MF215B	(39)
	termofilina 13 (ThmA/ThmB)	<i>Streptococcus thermophilus</i> SPI13	(20)

1	2	3	4
II – bakteriocyny nielantybiotykowe	II c – bakteriocyny sec-zależne		
	acidocyna B diwergicyna A enterocyna P laktokokcyzna 972	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46 <i>Carnobacterium divergens</i> LV13 <i>Enterococcus faecium</i> P13 <i>Lactococcus lactis</i> IPLA972	(40) (22) (11) (23)
	II d – inne bakteriocyny		
	diacetyna B gaserycyna B3 piscikolina 61 enterocyna B enterocyny L50 cereina 7	<i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> UL720 <i>Lactobacillus gasseri</i> HCM2124 <i>Carnobacterium piscicola</i> LV61 <i>Enterococcus faecium</i> T136 <i>Enterococcus faecium</i> L50 <i>Bacillus cereus</i> Bc7	(41) (42) (43) (15) (11) (54)
III – bakteriocyny wysokocząsteczkowe	helwetycyna J kaseicyzna 80	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481 <i>Lactobacillus casei</i> B80	(21) (24)
IV – kompleksy białkowo-lipidowe i białkowo-węglowodanowe	glikoproteiny leucocyna S laktocyna 27 enterocyna ON-157 lipidoproteiny mesenterocyna 52	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> LP27 <i>Enterococcus faecium</i> NIAI 157 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	(25) (26) (45) (27)

Klasa I – lantybiotyki – termostabilne policykliczne peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 5 kDa, zawierające nietypowe aminokwasy, takie jak lantionina. Lantybiotyki podzielono na dwie grupy: lantybiotyki typu A i typu B, różnicowane na podstawie właściwości strukturalnych i funkcjonalnych. Lantybiotyki typu A to wydłużone cząsteczki działające poprzez permeabilizację błony cytoplazmatycznej wrażliwych komórek, podczas gdy lantybiotyki typu B są cząsteczkami globularnymi o różnicowanym sposobie działania. Wszystkie lantybiotyki typu B są syntetyzowane przez bakterie gramdodatnie o wysokim udziale par G+C, stąd też nie są wytwarzane przez bakterie fermentacji mlekowej (10). Najlepiej poznaną bakteriocyną, należącą do lantybiotyków jest nizyna, produkowana przez szczepy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, izolowane z mleka i produktów warzywnych oraz przez *L. lactis* BB24, izolowany z fermentowanych hiszpańskich kiełbasek. Nizyna wykazuje bakteriobójczą aktywność skierowaną przeciwko licznym bakteriom gramdodatnim, m.in. przeciwko *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes* (11), zapobiega rozwojowi przetrwalników i hamuje rozwój komórek wegetatywnych rodzajów *Bacillus* i *Clostridium* (12).

Klasa II – bakteriocyny nielantybiotykowe. Większość bakteriocyn należących do tej klasy to małe (< 10 kDa), termostabilne białka. Bakteriocyny te mają charakter kationowy lub amfifilowy, niszczą komórki organizmów wrażliwych przez permeabilizację ściany komórkowej (9,13). Zakres ich aktywności obejmuje głównie bakterie gramdodatnie o niskiej zawartości par G+C, takie jak bakterie fermentacji

mlekowej oraz bakterie należące do rodzajów *Listeria*, *Enterococcus* i *Clostridium* (14). Klasa bakteriocynów nielantibiotykowych podzielona jest na 4 podklasy:

II a – tzw. bakteriocyny pediocynopodobne, o silnej aktywności wobec *Listeria* spp. Jest to najczęściej badana grupa bakteriocynów ze względu na ich silną aktywność antybakteryjną oraz właściwości fizykochemiczne, predysponujące je do praktycznego wykorzystania. Bakteriocyny zaliczane do klasy IIa wykazują wysoki stopień zgodności sekwencji (38-80% identycznych sekwencji aminokwasowych), szczególnie wyraźnej w N-terminalnym regionie cząsteczki. Region C-terminalny jest bardziej hydrofobowy i zróżnicowany, ale również zawiera pewne stałe pozycje aminokwasowe (15).

II b – bakteriocyny dipeptydowe – do uzyskania pełnej aktywności antimikrobiologicznej wymagane jest komplementarne działanie obu peptydów. Wśród bakteriocynów dipeptydowych można wyodrębnić bakteriocyny, których aktywność wymaga kombinacji obu peptydów, ponieważ osobno żaden z nich nie posiada aktywności antimikrobiologicznej jak laktokokcyna M (16) i laktokokcyna G (17) oraz bakteriocyny, w których jeden lub oba peptydy posiadają pewną aktywność, ale kombinacja obu znacznie tę aktywność zwiększa, np. laktacyna F (18), plantarycyna S (19) czy termofilina 13 (20).

II c – bakteriocyny *sec*-zależne. Bakteriocyny należące do tej podklasy są wydzielane za pomocą białek *sec*, w odróżnieniu od lantibiotyków i większości bakteriocynów nielantibiotykowych, syntetyzowanych w postaci prepeptydu z peptydem sygnałnym, odcinanym równocześnie z sekrecją bakteriocyny z komórki przez ABC-transportery (21). Przykładem bakteriocynów zaliczanych do tej grupy są diwergicyna A (22) i laktokokcyna 972 (23).

II d – podklasa ta, zaproponowana niedawno, obejmuje bakteriocyny, które odbiegają budową i mechanizmem sekrecji i działania od bakteriocynów zaklasyfikowanych do podklas II a-II c. Przykładem są enterocyny L50 (EntL50A i EntL50B), wytwarzane przez *Enterococcus faecium* L50 (21,11). System EntL50 przypomina bakteriocyny dipeptydowe, ponieważ oba peptydy działają synergistycznie, jednak sekwencja tych peptydów nie wykazuje podobieństwa do bakteriocynów z podklas II a-II c, a ponadto są wydzielane z komórki bez udziału peptydu sygnałnego (11). Podklasa II d obejmuje także bakteriocyny aktywowane przez grupy tiolowe jak laktokokcyna B (16).

Klasa III – bakteriocyny o dużej masie cząsteczkowej, wytwarzane przez rodzaje *Lactobacillus* (24) i *Enterococcus* (21). W przeciwieństwie do bakteriocynów z klas I i II, są inaktywowane termicznie (60-100°C przez 10-15 minut) i nie działają na komórki wrażliwe poprzez uszkodzenie błony (21).

Klasa IV – obejmuje bakteriocyny, które do uzyskania pełnej aktywności antimikrobiologicznej wymagają obecności części lipidowej lub węglowodanowej w cząsteczce. Przykładem są glikoproteiny: leukocyna S (25) i laktocyna 27 (26), lipoproteina mesenterocyna 52 (27) oraz glikolipoproteina fermentocyna (21).

2.2. Bakteriocyny bakterii gramujemnych

Bakterie gramujemne również wykazują zdolność do syntezy bakteriocyn. Wiele bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* wytwarza bakteriocyny, klasyfikowane jako kolicyny i mikrocyyny (tab. 2). Charakterystyczne dla bakteriocyn bakterii gramujemnych jest to, że zarówno producent, jak i szczepy wrażliwe należą do tej samej rodziny, a przede wszystkim do tego samego gatunku (46).

Tabela 2

Przykłady kolicyn i mikrocyyn

Grupa bakteriocyn	Bakteriocyna	Producent	literatura
kolicyny	kolicyna B	<i>Escherichia coli</i>	(51)
	kolicyna U	<i>Escherichia coli</i>	(46)
	kolicyna E2	<i>Escherichia coli</i>	(52)
	kolicyna E8	<i>Escherichia coli</i>	(53)
	kolicyna M	<i>Escherichia coli</i>	(54)
mikrocyyny	mikrocyyna B17	<i>Escherichia coli</i>	(55)
	mikrocyyna J25	<i>Escherichia coli</i>	(56)
	mikrocyyna H47	<i>Escherichia coli</i>	(57)
	mikrocyyna E492	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(48)

Kolicyny są syntetyzowane przez więcej niż połowę szczepów *Escherichia coli*, a także przez bakterie z rodzajów *Shigella* i *Serratia*. Bakteriocyny innych rodzajów rodziny *Enterobacteriaceae* określane są odmiennymi nazwami, np. pestycyny – bakteriocyny wytwarzane przez *Yersinia pestis* czy marcescyny – bakteriocyny syntetyzowane przez *Serratia marcescens* (46).

Kolicyny wykazują aktywność antymikrobiologiczną w stosunku do blisko spokrewnionych szczepów bakterii, które posiadają receptor wiążący kolicyny na powierzchni komórek i nie wytwarzają białek odporności inaktywujących kolicyny (47). Są to białka o masie cząsteczkowej od 25 do 80 kDa, których synteza może być indukowana promieniami UV lub mitomycyną C. Wszystkie kolicyny kodowane są w plazmidach Col. Grupa genów kolicyny składa się z genu kodującego toksyczne białko, genu kodującego odporność oraz u większości kolicyn, genu kodującego białko ułatwiające eksport kolicyny z komórki i powodujące jej lizę (46). Synteza kolicyn jest regulowana przez kilka mechanizmów. Podstawowym mechanizmem jest system SOS, który stanowi część systemu kontroli ekspresji genów, naprawiającego uszkodzenia DNA. W warunkach standardowych synteza kolicyn jest wyłączona u większości komórek w populacji i uruchamiana głównie w warunkach stresowych (47). Bakteriobójcze oddziaływanie kolicyn na komórki wrażliwe odbywa się najczęściej poprzez formowanie kanałów jonowych w błonie cytoplazmatycznej, co powo-

duże depolaryzację błony. Sporadycznie kolicyny mogą degradować lub hamować syntezę peptydoglikanów w ścianie komórkowej (46).

Mikrocyny są niskocząsteczkowymi peptydami syntetyzowanymi przez bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, antagonistyczne aktywnymi wobec blisko spokrewnionych szczepów. Wszystkie znane szczepy wytwarzające mikrocyny z wyjątkiem jednego szczepu *Klebsiella pneumoniae* (48) należą do gatunku *Escherichia coli* (49).

W oparciu na zróżnicowanej strukturze, mechanizmie działania i kryteriach genetycznych, mikrocyny podzielono na dwie klasy. Pierwsza klasa obejmuje peptydy o masie molekularnej poniżej 5 kDa, podlegające modyfikacji potranslacyjnej i atakujące struktury wewnątrzkomórkowe. Druga klasa to polipeptydy o masie cząsteczkowej od 7 do 10 kDa, nie modyfikowane potranslacyjnie i działające antagonistycznie poprzez uszkodzenie błony komórkowej (49).

W przeciwieństwie do kolicyn, synteza mikrocyn nie jest letalna dla producenta i nie podlega regulacji przez system SOS (50). Mikrocyny są wydzielane do pożywki podczas późnej fazy logarytmicznej wzrostu, z wyjątkiem mikrocyny Mcc E492, która jest produkowana we wczesnej fazie logarytmicznej (48). Związki te wykazują pewne cechy wspólne z niskocząsteczkowymi bakteriocynami syntetyzowanymi przez bakterie gramdodatnie, takie jak termostabilność, hydrofobowość i odporność na ekstremalne warunki.

3. Wielkość i struktura cząsteczki

Bakteriocyny są grupą związków zróżnicowanych pod względem wielkości cząsteczki i jej struktury. Skład aminokwasowy i struktura cząsteczki bakteriocyny decyduje o jej aktywności, sposobie działania, a także jej stabilności. Przykładowo, lantibiotyki zawierają nietypowe, modyfikowane potranslacyjnie aminokwasy takie jak α,β -didehydroalaninę, α,β -didehydrobutyrynę, *meso*-lantioninę i β -metylo-lantioninę. W literaturze znaleźć można także informacje o konwersji seryny do D-alaniny, jaką stwierdzono w leukocynie S (10) i laktycynie 3147 (58). Znaczenie biologiczne modyfikowanych aminokwasów i D-alaniny nie zostało dokładnie poznane, jednak uważa się, że zwiększają one stabilność lantibiotyków w wysokich temperaturach oraz tolerancję na niskie pH, mogą także wpływać na odporność bakteriocyn na enzymy proteolityczne oraz ich aktywność przeciwdrobnoustrojową (59,58).

W strukturze bakteriocyn nielantibiotykowych nie występują aminokwasy modyfikowane potranslacyjnie. W cząsteczkach niektórych bakteriocyn stwierdzono natomiast obecność cysteiny tworzącej mostki disiarczkowe (15). Klaenhammer (1) wyróżnił trzy grupy bakteriocyn różniące się zawartością cysteiny w cząsteczce:

1) cystybiotyki zawierające co najmniej dwie reszty cysteinowe w cząsteczce, tworzące mostki disiarczkowe, jak pediocyna AcH (32), enterocyna A (60), diwercyna V41 (38);

2) tiolobiotyki posiadające jedną resztę cysteinową, jak laktokokcyne B (16);

3) bakteriocyny nie zawierające cysteiny: laktokokcyna A, M i G (17).

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że mostki disiarczkowe są istotnym determinantem sposobu działania bakteriocyny oraz odgrywają rolę w zwiększeniu aktywności w niskich i wysokich temperaturach (61). Obecność co najmniej jednego mostka disiarczkowego stwierdzono np. w cereinie 7, wytwarzanej przez *Bacillus cereus* Bc7 (44), czemu przypisuje się jej stabilność w obecności rozpuszczalników organicznych, takich jak: aceton, chloroform, acetonitryl, etanol, butanol i metanol.

Obecność aktywnego biologicznie, peptydowego komponentu, w strukturze bakteriocyn sprawia, że są one inaktywowane przez co najmniej jeden enzym proteolityczny (tab. 3), a zazwyczaj przez kilka różnych enzymów, w tym pochodzenia trzustkowego (trypsyna, chymotrypsyna) i żołądkowego (pepsyna). Wrażliwość na enzymy trawienne stanowi bardzo interesującą cechę z punktu widzenia zastosowania bakteriocyn w żywności, ponieważ oznacza to, że w przewodzie pokarmowym człowieka nastąpi ich trawienie do aminokwasów. Tym samym związki te są bezpieczne dla konsumenta (7).

Tabela 3

Właściwości wybranych bakteriocyn

Bakteriocyna (producent)	Masa cząsteczkowa (metoda oznaczania wielkości)	Czynniki nie powodujące inaktywacji bakteriocyn	Enzymy inaktywujące	Literatura
1	2	3	4	5
laktostrepcyna 5 (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 202)	> 20 kDa (SDS-PAGE)	121°C, 10 minut pH < 5,0	trypsyna, pronaza, lipaza A	(63)
pediocyna Ach (<i>Pediococcus acidilactici</i> H)	2,7 kDa (SDS-PAGE)	121°C, 15 minut pH 2,5-9,0 6M mocznik	trypsyna, ficyna, papaina, proteinaza K, chymotrypsyna	(32)
pediocyna PA-1 (<i>Pediococcus acidilactici</i> PA 1.0)	4,6 kDa (sekwencja nukleotydowa)	80-100°C, 10 minut pH 4-7 lipaza, fosfolipaza, lizozym, DNaza, RNaza	pepsyna, papaina, chymotrypsyna, proteaza	(71)
leukocyna A (<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL 187)	3,9 kDa (sekwencja nukleotydowa)	62°C, 15 minut pH 2-3 lipaza, mocznik, chloroform	proteaza, chymotrypsyna, trypsyna, papaina, pepsyna	(33)
karnocyna (<i>Leuconostoc carnosum</i> LA44A)	2,5-6 kDa (SDS-PAGE)	100°C, 15 minut pH 2-10	chymotrypsyna, trypsyna, amylaza	(72)
plantarycyna A (<i>Lactobacillus plantarum</i> C-11)	> 8 kDa (dializa)	100°C, 30 minut pH 4-6,5	proteaza	(73)
brewicyna (<i>Lactobacillus brevis</i> 37)	> 10 kDa (ultrafiltracja)	121°C, 60 minut pH 1-11	pronaza E, trypsyna	(24)

1	2	3	4	5
propionicyna PLG –1 (<i>Propionibacterium thoenii</i> P-127)	9,328 kDa (sekwencjonowanie aminokwasów)	85°C, 15 minut pH 3,0-9,0 lipaza, lizozym, fosfolipaza C	proteaza, pepsyna, pronaza E, trypsyna, chymotrypsyna	(69)
propionicyna T1 (<i>Propionibacterium thoenii</i> 419 i LMG2792)	7,130 kDa (sekwencja nukleotydowa)	100°C, 15 minut pH <2,5	proteinaza K,	(74)
jenseniina G (<i>Propionibacterium jensenii</i> P 126)	>12 kDa (dializa)	100°C, 15 minut pH 3,0-11,0 0,5% SDS, 4M mocznik	proteinaza K, pronaza E, chymotrypsyna, typ 14 proteazy	(75)
enterocyjna ON-157 (<i>Enterococcus faecium</i> NIAI 157)	około 2,5 kDa (SDS-PAGE)	100°C, 30 minut (pH 4-5) 30°C, 60 minut (pH 2-7)	chymotrypsyna, pepsyna, α -amylaza	(45)
cereina 7 (<i>Bacillus cereus</i> Bc7)	3-10 kDa (ultrafiltracja)	100°C, 15 minut pH 2,0-9,0 lizozym, fosfolipaza C, α -amylaza aceton, etanol, butanol, acetonitryl, metanol chloroform, 2-propanol	trypsyna, chymotrypsyna, pronaza E, proteinaza K	(44)

Niektóre bakteriocynty, mające w swoim składzie komponent lipidowy lub węglowodanowy, są również inaktywowane przez enzymy lipolityczne i amylolityczne. Przykładowo enterocyjna ON-157 i karnocyjna U-149 są inaktywowane przez α -amylazę (45), a laktostrepcyna 5 przez lipazę (62). Z kolei plantarycyjna S jest inaktywowana przez enzymy glikolityczne, lipolityczne i fosfolipolityczne (19).

4. Stabilność bakteriocyn

Większość bakteriocyn wykazuje dużą termostabilność, jednak cecha ta zależy od kilku czynników, takich jak stopień oczyszczenia bakteriocyny, obecność składników ochronnych w środowisku i pH. Bakteriocynty obecne w bezkomórkowych ekstraktach mogą wytrzymać ogrzewanie w temperaturze 100-121°C (21), ale ich termostabilność znacznie spada w preparatach częściowo oczyszczonych lub oczyszczonych do postaci homogennej.

Zależność między stopniem oczyszczenia bakteriocyny a jej stabilnością w wysokich temperaturach potwierdzono dla laktacyny B (63) i sakacyny P (37). Nie jest to jednak zasada dotycząca wszystkich bakteriocyn. Oczyszczona nizyna pozostaje aktywna nawet po jej ogrzaniu w 100°C przez 10 minut w pH 2,0 (28). Z kolei inne

bakteriocyny jak: kaseicyna 80 (24) i helwetycyna J (21) są ekstremalnie termowrażliwe, nawet kiedy ogrzewane są w stanie nieoczyszczonym.

Większość niskocząsteczkowych bakteriocyn wykazuje charakter kationowy, przy czym, jak się wydaje, jest to cecha typowa zarówno dla lantybiotyków jak i bakteriocyn nielantybiotykowych. Typową dla większości bakteriocyn cechą jest obecność regionów hydrofobowych i/lub hydrofilowych (9,13). Bakteriocyny te są generalnie aktywne w środowisku o pH kwaśnym lub fizjologicznym (21).

Zarówno charakter kationowy, jak i hydrofobowość odgrywają istotną rolę w adsorpcji bakteriocyny do komórek organizmów wrażliwych. Bakteriocyną o odmiennym charakterze jest np. jensenina P, która należy do tzw. kwaśnych bakteriocyn i posiada punkt izoelektryczny pomiędzy pH 3,0 a 3,5 (65).

Bakteriocyny wykazują zwykle stabilność w stosunkowo szerokim zakresie pH. Jednak zakres pH, w jakim aktywność antymikrobiologiczna bakteriocyn pozostaje na najwyższym poziomie jest różny dla różnych bakteriocyn. Generalnie aktywność bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej pozostaje stabilna w kwaśnym i neutralnym pH. Laktostrepcyny są stabilne w pH od 4,5 do 5,0 i odwracalnie inaktywowane przy pH 7,0 i 8,0 (62). Podobne rezultaty uzyskano dla plantarycyny C (64) i leukocyny A-UAL-87 (33). Stabilność aktywności niziny jest najwyższa przy pH 2,0, a wraz ze wzrostem pH spada (62). W przeciwieństwie do wymienionych, inne bakteriocyny bakterii gramdodatnich są stabilne w szerokim zakresie pH, z reguły w granicach 3,0-9,0 (21). Niektóre bakteriocyny wykazują także tolerancje na bardziej ekstremalne wartości pH (z zakresu 1,0-2,0 oraz 10,0-11,0) jak acidocyna B (66), czy bawarycyna A (36).

Z punktu widzenia ewentualnego zastosowania ważnym aspektem jest również stabilność bakteriocyn w obecności rozpuszczalników organicznych, surfaktantów i czynników redukujących stosowanych w stężeniu od kilku do kilkudziesięciu procent. Helwetycyna V-1829 jest odporna na działanie detergentów niejonowych, takich jak: Tween 20, Tween 80, Triton X-100, a także mocznika i 0,2% 2-merkaptoetanolu, ale traci aktywność pod wpływem SDS-u (68). Z kolei pediocyna N5p wytwarzana przez *Pediococcus pentosaceum* N5p nie traci aktywności w 10% roztworze etanolu przy niskim pH, nie jest również inaktywowana przez SO₂ przy stężeniu 40-80 mg/l (67). Cereina 7, wytwarzana przez *Bacillus cereus* Bc7, jest także stabilna w 50% roztworach rozpuszczalników organicznych, ale bardzo wrażliwa na związki redukujące, szczególnie 2-merkaptoetanol, co może wskazywać na obecność mostków disiarczkowych w jej cząsteczce (44).

Bakteriocyny, jako cząsteczki o niskiej masie cząsteczkowej i hydrofobowym charakterze, wykazują tendencję do łączenia się w duże agregaty. Przykładowo, propionicyna PLG-1 występuje w postaci zagregowanych cząstek o masie powyżej 100 kDa oraz małych cząsteczek o masie około 10 kDa (69). Laktacyna B oraz helwetycyna J mają tendencję do tworzenia makrocząsteczkowych kompleksów z lipidowymi i węglowodanowymi komponentami pożywek hodowlanych (63).

Zagregowane cząsteczki ulegają dysocjacji pod wpływem związków organicznych, takich jak detergenty lub alkohole. Tym samym można uzyskać wzrost aktyw-

ności antybakteryjnej poprzez zwiększenie liczby cząsteczek aktywnych lub odślonięcie centrów aktywnych (70,44). Przykładowo, traktowanie laktacyny F Nonidem P40 oraz SDS powoduje wzrost aktywności blisko 400% (70). Pod wpływem surfaktantu Tritonu X100 wzrasta aktywność antybakteryjna cereiny 7, najprawdopodobniej w wyniku dezagregacji większych cząsteczek (44). Zdolność do rozbijania agregatów bakteriocyn posiada również mocznik. Barefoot i Klaenhammer (63) wykazali, że skutecznie dezagreguje on makrocząsteczki laktacyny B, powodując jednoczesny 200-krotny wzrost aktywności tej bakteriocyny.

5. Specyficzność przeciwdrobnoustrojowa bakteriocyn

Według Tagga i in. (2), bakteriocyny to białkowe metabolity o działaniu antagonistycznym wobec blisko spokrewnionych bakterii. Teoria ta odpowiada działaniu większości bakteriocyn, jednak coraz dokładniejsza charakterystyka tych metabolitów potwierdza, że wiele bakteriocyn może hamować rozwój bakterii, należących do innych gatunków niż organizm producenta.

Heterogeniczność bakteriocyn sprawia, że czasami trudno jest dokładnie określić spektrum aktywności danej bakteriocyny, bowiem w obrębie danego gatunku jedne szczepy mogą być wrażliwe na określoną bakteriocynę, podczas gdy inne są na nią odporne, a czasami w populacji bakterii wrażliwego szczepu może pojawić się kilka komórek wykazujących odporność na bakteriocynę. Na podstawie badań wykazuje się także, że dany szczep może być wrażliwy na określoną bakteriocynę, ale odporny na bakteriocyny podobnego typu oraz, że odporność przetrwalników zanika w chwili wykiełkowania komórek (8).

Duże zróżnicowanie spektrum przeciwdrobnoustrojowego bakteriocyn pozwala wyróżnić trzy grupy bakteriocyn:

1) wykazujące wąski zakres aktywności, ograniczone do szczepów wewnątrz tego samego gatunku, co organizm producenta, jak laktokokcyna A (76), kazeicyna 80 (24) bądź do gatunków tego samego rodzaju, jak laktocyna 27 (26), laktacyna B (63) czy laktostrepcyna 5 (62);

2) o umiarkowanym zakresie aktywności, hamujące również inne gatunki bakterii, w tym mikroorganizmy patogenne takie jak: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* czy *Clostridium botulinum*. Przykładem jest laktocyna 481, która jest bakteriobójcza wobec większości bakterii z rodzaju *Lactococcus*, niektórych bakterii z rodzajów: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Clostridium*, w tym wobec *Clostridium butyricum* (7). Podobne działanie wykazuje leukocyna A, która oprócz hamowania większości bakterii mlekowych, hamuje rozwój pojedynczych szczepów należących do *Enterococcus faecalis* i *Listeria monocytogenes* (33). Do tej grupy zaliczyć można również laktacynę F (70) i plantarycynę C (64).

3) wykazujące szeroki zakres inhibicji, obejmujące bakterie gramdodatnie i gramujemne, a nawet grzyby. Do bakteriocyn o szerokim zakresie aktywności antago-

nistycznej należy nizyna, która hamuje rozwój bakterii z rodzaju *Lactococcus*, gatunku *Staphylococcus aureus* oraz przetrwalników bakterii z rodzaju *Clostridium* i *Bacillus* (28). Szeroką specyficzność przeciwdrobnoustrojową wykazują pediocyna AcH i pediocyna PA-1 (32,71). Pediocyna AcH, poza antybakteryjnym oddziaływaniem wobec bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Lactococcus*, jest bakteriobójcza wobec *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* i *Pseudomonas putida* (32). Z kolei pediocyna PA-1 jest aktywna wobec szczepów z rodzaju *Pediococcus*, *Lactobacillus* oraz wobec *Leuconostoc mesenteroides* i *Listeria monocytogenes* (71). Do grupy tej należy także propionicyna PLG-1, która hamuje rozwój niektórych bakterii gramododatnich, gramujemnych oraz grzybów, co stanowi wyjątek wśród bakteriocyn (68).

W aspekcie praktycznego wykorzystania bakteriocyn najbardziej interesującą grupą są bakteriocyny o szerokim zakresie aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

6. Mechanizm działania bakteriocyn

Oddziaływanie bakteriocyn na bakterie wrażliwe może mieć charakter bakteriobójczy bądź bakteriostatyczny. Na rodzaj oddziaływania wpływ mają takie czynniki, jak: dawka bakteriocyny, stopień jej oczyszczenia, faza wzrostu komórek wrażliwych, a także warunki środowiskowe (pH, temperatura itp.), obecność czynników wspomagających przerwanie ciągłości ściany komórkowej (21).

Większość bakteriocyn wykazuje bakteriobójcze działanie na wrażliwe mikroorganizmy, powodując gwałtowne zmniejszenie populacji bakterii nawet w ciągu kilku minut od chwili kontaktu. Niektóre bakteriocyny, jak laktocyna 27 (26), leukocyna S (25), leukocyna UAL187 (33) wykazują z kolei działanie bakteriostatyczne. Oddziaływanie jednej bakteriocyny może być także różne wobec poszczególnych mikroorganizmów, np. jensenina G wykazuje działanie bakteriobójcze wobec *Lactobacillus delbrueckii*, ale bakteriostatyczne wobec *Propionibacterium acidipropionici* (75).

Tabela 4

Zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych bakteriocyn

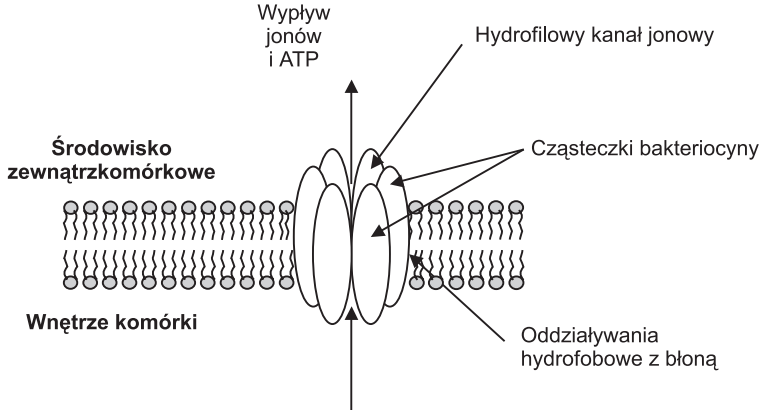
Bakteriocyna (Producent)	Mikroorganizmy wrażliwe	Literatura
1	2	3
nizyna (różne szczepy <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	<i>Lactococcus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i>	(28)
laktostrepocyna (nie wytwarzające nizyny szczepy <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>cremoris</i> , <i>diacetylactis</i>)	<i>Lactococcus</i> spp.: grupa A, C, G <i>Streptococcus</i> spp., <i>Bacillus cereus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. citrovorum</i> , <i>Lb. paracitrovorum</i>	(62)
pediocyna AcH (<i>Pediococcus acidilactici</i> H)	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	(32)

1	2	3
pediocyna A (<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61)	<i>Pediococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium botulinum</i>	(71)
leukonocyna S (<i>Leuconostoc paramesenteroides</i> OX)	<i>Lactobacillus sake</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>	(25)
sakacyna P (<i>Lactobacillus sake</i> LTH673)	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Carnobacterium</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Brochothrix thermosphacia</i>	(37)
laktacyna F (<i>Lactobacillus acidophilus</i> 11088)	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i>	(32)
propionocyna PLG-1 (<i>Propionibacterium thoenii</i> P127)	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Aspergillus wentii</i> , <i>Apiotricum curvatum</i> , <i>Fusarium tridinctum</i> , <i>Phialophora gregata</i> , <i>Saccharomyces</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Scopulariopsis</i> sp., <i>Trichoderma reesi</i>	(69)
enterocyna CCM 4231 (<i>Enterococcus faecium</i> CCM 4231)	<i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria</i> spp.	(77)
nukacyna ISK-1 (<i>Staphylococcus warneri</i> ISK-1)	<i>Pediococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	(78)

Tabela 5

Mechanizm działania wybranych bakteriocyn

Bakteriocyna	Producent	Mechanizm działania	Literatura
diplokokcyna	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 346	zahamowanie syntezy DNA, RNA, ograniczenie syntezy białek	(81)
laktostrepcyna 5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 202	wyciek jonów, zakłócenie transportu urydyny, zahamowanie syntezy DNA, RNA i białek	(62)
nizyna	szczepy <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	zaburzenie potencjału membranowego wyciek aminokwasów i kationów	(28)
pediocyna Ach	<i>Pediococcus acidilactici</i> H	zahamowanie syntezy ATP, osłabienie systemów transportu	(71)
laktocyna 27	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	wyływ jonów potasowych, napływ jonów sodowych	(26)
leukonocyna S	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> OX	obniżenie siły protonomotorycznej	(25)
bawarycyna MN	<i>Lactobacillus bavaricus</i> MN	zakłócenie potencjału membranowego, wpływ karboksyfluoresceiny	(80)
mezenterocyna Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	zakłócenie potencjału membranowego, wyciek aminokwasów	(34)
plantarycyna EF	<i>Lactobacillus plantarum</i>	zakłócenie potencjału membranowego, zakłócenie gradientu pH, wyciek kationów	(13)
laktokokcyna G	<i>Lactococcus lactis</i> LMG2081	zakłócenie potencjału membranowego, zahamowanie syntezy ATP	(17)
plantarycyna JK	<i>Lactobacillus plantarum</i>	zakłócenie potencjału membranowego, zakłócenie gradientu pH, wyciek anionów	(13)



Rys. Schemat działania bakteriocynów tworzących kanały jonowe w błonie cytoplazmatycznej.

Pierwszy kontakt bakteriocyny z komórką wrażliwą odbywa się za pomocą oddziaływań elektrostatycznych dodatnio naładowanej, hydrofobowej cząsteczki inhibitora z naładowanymi ujemnie fosfolipidami w błonie komórki wrażliwej (79). Najczęściej bakteriocyny powodują destabilizację i permeabilizację błony komórkowej (8). Podstawowym mechanizmem jest tworzenie przejściowych kompleksów porcyjnych i kanałów jonowych (rys.) w błonie (12), poprzedzone niespecyficzną interakcją bakteriocyny z anionowymi polimerami, takimi jak kwas teichoowy i lipoteichoowy, na powierzchni komórki wrażliwej (32,8). Niektóre bakteriocyny, głównie nie-lantybiotykowe, np. laktokokcyna A wymagają specyficznych receptorów w błonie komórkowej, inne, jak pediocyna PA-1, mezenterocyna Y105 czy termofilina 13 nie wymagają obecności receptorów (8,20,79).

Powstawanie porów, a tym samym utrata ciągłości budowy błony komórkowej powoduje bierny wypływ jonów potasowych i fosforanowych, aminokwasów i ATP. Następuje zaburzenie siły protonomotorycznej, albo co najmniej jednej z jej składowych (potencjału membranowego lub gradientu pH) (59,8,13). Niski poziom ATP i niedobór jonów i kofaktorów w komórce hamuje syntezę makromolekuł, takich jak DNA, RNA, białka i polisacharydy. Jednocześnie niemożliwy staje się aktywny transport składników odżywczych, komórki nie mogą się dalej rozwijać i umierają.

Bakteriobójcze oddziaływanie bakteriocynów może niekiedy wywoływać lizę komórki, jak ma to miejsce w przypadku plantarycyny C (64) czy nizyny A (28). Wiązanie tych bakteriocynów z kwasami: teichoowym, lipoteichoowym czy teichuronowym, obecnymi w ścianie komórkowej, prowadzi do uwolnienia, a następnie aktywacji enzymów autolitycznych, związanych z tymi polimerami za pomocą oddziaływań elektrostatycznych (8).

Sposób działania poszczególnych bakteriocynów na wrażliwe mikroorganizmy jest zróżnicowany. Przykładowo, nizyna, podobnie jak większość lantybiotyków, powoduje permeabilizację błony komórkowej oraz wyciek wewnątrzkomórkowych skład-

ników, takich jak sole mineralne i aminokwasy. Utrata tych substancji powoduje zakłócenie siły protonomotorycznej i zaburzenie procesów biosyntezy. Nizyna może także hamować syntezę ściany komórkowej (13) oraz indukować lizę komórek bakterii *Staphylococcus* uwalniając enzymy hydrolizujące ścianę komórkową. Mersacydyna i aktagardyna zakłócają syntezę ściany komórkowej, hamując biosyntezę peptydoglikanu na poziomie transglikozylacji, natomiast synteza DNA, RNA i białek przebiega bez zakłóceń.

Bakteriocyny nielantybiotykowe charakteryzują się węższym zakresem aktywności niż lantybiotyki, a ich oddziaływanie wobec wrażliwych mikroorganizmów indukuje głównie permeabilizację błony i wyciek składników z komórki (14). Pediocyna PA-1 i pediocyna AcH zakłócają potencjał membranowy, co powoduje wypływ aminokwasów i innych niskocząsteczkowych składników z wnętrza komórki oraz karboksyfluoresceiny z liposomów (32). Bawarycyna MN zakłóca zarówno potencjał membranowy, jak i gradient pH i powoduje wypływ karboksyfluoresceiny (80). Z kolei laktokokcyna G, bakteriocyna dipeptydowa, powoduje zakłócenie potencjału membranowego i indukuje wyciek aminokwasów takich jak alanina czy leucyna oraz znaczne obniżenie zawartości wewnątrzkomórkowego ATP (13).

7. Perspektywy

Bakteriocyny stanowią alternatywę dla stosowania chemicznych konserwantów żywności, jako bezpieczne, naturalne substancje antybakteryjne i antygrzybowe. Jednak zastosowanie bakteriocyn jako biokonserwantów na skalę przemysłową wymaga poznania omówionych cech takich jak: struktura, mechanizm działania czy stabilność, a także ich legalizacji jako dodatków do żywności. Jedynie nizyna uzyskała, jak dotąd, status GRAS (*generally recognized as safe*) i jest stosowana w około pięćdziesięciu krajach jako konserwant, m.in. produktów mięsnych i mlecznych (3,77).

Obecnie przeprowadzanych jest wiele eksperymentów dotyczących produkcji bakteriocyn *in situ*, zarówno w systemach modelowych jak i w żywności. Większość z nich dotyczy bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie fermentacji mlekowej i ich aktywności przeciwko *Listeria monocytogenes*, najczęściej w produktach mięsnych. Dodatek bakteriocyn jako biokonserwantów jest testowany także w produktach mlecznych i warzywnych.

Aktywność kultur bakteriocynogennych i bakteriocyn w żywności często jest niższa niż w badaniach *in vitro*, gdyż ściśle zależy od różnych czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych, takich jak siła jonowa, pH, temperatura i typ atakowanego mikroorganizmu. Na efektywność ich działania może mieć także wpływ rodzaj zastosowanych równolegle metod konserwacji, dlatego ocena mikrobiologicznego działania bakteriocyny wymaga dokładnych testów w systemach żywnościowych (3).

Literatura

1. Klaenhamer T. R., (1993), *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 39-86.
2. Tagg J., Dajani A. S., Wannamer L. W., (1976), *Bacteriol. Rev.*, 40, 722-756.
3. Schillinger U., Geisen R., Holzapfel W. H., (1996), *Trends Food Sci.*, 7, 158-164.
4. Cleveland J., Montville T., Nes I. F., Chikindas M., (2001), *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 1-20.
5. Broekaert W. F., Terras F. R., Cammue B. A., Osborn R. W., (1997), *Plant Physiol.*, 108, 1353-1358.
6. Lehrer R. I., Lichtenstein A. K., Ganz T., (1993), *Ann. Rev. Immunol.*, 11, 105-128.
7. Piard J. C., Desmazeaud M., (1992), *Lait*, 72, 113-142.
8. Jack R. W., Tagg J. R., Ray B., (1995), *Microbiol. Rev.*, 59, 171-200.
9. Nes I. F., Tagg J. R., (1996), *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 89-97.
10. Skaugen M., Cintas L. M., Nes I. F., (2001), in: Wood B. J. B., Warner P., *Genetics of lactic acid bacteria*, vol. III. Gaithersburg, MD, Aspen Publishers. Inc.
11. Cintas L. M., Casaus P., Fernandez M. F., Hernandez P. E., (1998), *Food Microbiol.*, 15, 289-298.
12. Abee T., Krockel L., Hill C., (1995), *Int. J. Microbiol.*, 28, 169-185.
13. Moll G. N., Konings W. N., Driessen A. J., (1999), *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 185-191.
14. Hechard Y., Sahl H. G., (2002), *Biochimie*, 84, 545-557.
15. Casaus M. P., Nilsen T., Cintas L. M., Nes I. F., Hernandez P. E., Holo H., (1997), *Microbiol.*, 143, 2287-2294.
16. Venema K., Abee T., Haandrikman A. J., Leenhouts K. J., Kok J., Konings W. N., Venema G., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1041-1048.
17. Nissen-Meyer J., Holo H., Havarstein L. S., Sletten K., Nes I. F., (1992), *J. Bacteriol.*, 174, 22-27.
18. Alisson G., Fremaux C., Ahn C., Klaenhammer T. R., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 2235-2241.
19. Jiménez-Díaz R., Ruiz-Barba J. L., Cathart D. P., Holo H., Nes I. F., Sletten K. H., Warner P. J., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4459-4463.
20. Marciset O., Jeronimus-Stratinh M. C., Mollet B., Poolman B., (1997), *J. Biological Chem.*, 272, 14277-14284.
21. Cintas L. M., Casaus P., Herranz C., Nes I. F., Hernandez P. E., (2001), *Food Sci. Tech. Int.*, 7 (4), 281-305.
22. Worobo R. W., van Belkum M. J., Sailer M., Roy K. L., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 3134-3149.
23. Martinez B., Fernandez M., Suarez J. E., Rodriguez A., (1999), *Microbiol.*, 145, 3155-3161.
24. Rammelsberg M., Radler F., (1990), *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 177-184.
25. Lewus C. B., Sun S., Montville T. J., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 1683-1688.
26. Upreti G. C., (1994), in: deVuyst L., Vandamme E. J., *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, London Blackie Academic & Professionals, 331-335.
27. Sudirman I., Mathieu F., Benoit V., Lefebvre G., (1994), *Current Microbiol.*, 28, 155-159.
28. deVuyst L., Vandamme E. J., (1994), in: deVuyst L., Vandamme E. J., *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, London, Blackie Academic & Professional., 151-221.
29. Klein C., Kaletta C., Entian K. D., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 296-303.
30. Kellner R., Jung G., Horner T., Zahner H., Schnell N., Entian K. D., Gutz F., (1988), *Europ. J. Biochem.*, 177, 53-59.
31. Mota-Meira M., Lacroix C., LaPointe G., Lavoie M., (1997), *FEBS Lett.*, 410, 275-279.
32. Bhunia A. K., Johnson M. C., Ray B., Kalchayanad (1991), *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 25-30.
33. Hastings J. W., Sailer M., Johnson K., Roy K. L., Vederas I. C., Stiles M. E., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 7491-7500.
34. Hechard Y., Derijard B., Letellier F., Cenatiempo Y., (1992), *J. Gen. Microbiol.*, 138, 2725-2731.
35. Kanatani K., Oshimura M., Sano K., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1061-1067.
36. Larsen A. G., Vogesen F. K., Josephsen J., (1993), *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 113-122.
37. Tichaczek P. S., Nissen-Meyer J., Nes I. F., Vogel R. F., Hammes W. P., (1992), *System. Appl. Microbiol.*, 15, 460-468.
38. Métivier A., Pilet M. F., Douset X., Rorokine O., Anglade P., Zagorec M., Piard J. C., Marion D., Cenatiempo Y., Fremaux C., (1998), *Microbiol.*, 144, 2837-2844.

39. Blom H., Katla T., Holck A., Sletten K., Axelsson L., Holo H., (1999), *Current Microbiol.*, 39, 43-48.
40. Leer J. R., van der Vossen J. M. B. M., van Gieze M., van Nort J. M., Pouwels P. H., (1995), *Microbiol.*, 141, 1629-1635.
41. Ali D., Lacroix C., Thuault D., Bourgeois C. M., Simard R. D., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, 832-841.
42. Tahara T., Yoshioka S., Utsymi R., Kanatani K., (1997), *FEMS Microbiol. Lett.*, 148, 97-100.
43. Holck A., Axelsson L., Schillinger U., (1994), *Current Microbiol.*, 29, 63-68.
44. Oscáriz J. C., Pisabarro A. G., (2000), *J. Appl. Microbiol.*, 89, 361-369.
45. Ohmomo S., Murata S., Katayama N., Nitisinprasart S., Kobayashi M., Nakajima T., Yajima M., Nakanishi K., (2000), *J. Appl. Microbiol.*, 88, 81-89.
46. Šmarda J., Šmajš D., (1998), *Folia Microbiol.*, 43 (6), 563-582.
47. Braun V., Patzer S. I., Hantke K., (2002), *Biochimie*, 84, 365-380.
48. Lorenzo V., Pugsley A. P., (1984), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27, 666-669.
49. Pons A. M., Lanneluc I., Cottencau G., Sable S., (2002), *Biochimie*, 84, 531-537.
50. Kolter R., Moreno F., (1992), *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 141-163.
51. Schramm E., Mende J., Braun V., Kamp R. M., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 3350-3357.
52. Cole S. T., Saint-Joanis B., Pugsley A. P., (1985), *Mol. Gen. Genet.*, 198, 465-472.
53. Toba M., Masaki H., Ohta T., (1988), *J. Bacteriol.*, 170, 3237-3242.
54. Ölschläger T., Braun V., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 4765-4769.
55. Baquero F., Moreno F., (1984), *FEMS Microbiol. Lett.*, 23, 117-124.
56. Salomon R. A., Farias R. N., (1992), *J. Bacteriol.*, 174, 7428-7435.
57. Rodríguez E., Gaggero M., Lavina M., (1999), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 2176-2182.
58. Ryan M. P., Jack R. W., Josten M., Sahl H. G., Jung G., Ross R. P., Hill C., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 37544-37550.
59. Sahl H. G., Jack R. W., Bierbaum G., (1995), *Eur. J. Biochem.*, 230, 827-853.
60. Eijsink V. G. H., Skeie M., Middlehoven P. H., Brurberg M. B., Nes I. F., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3275-3281.
61. Fimland G., Johnsen L., Axelsson L., Brurberg M. B., Nes I. F., Eijsink V. G. H., Nissen-Meyer J., (2000), *J. Bacteriol.*, 182 (9), 2643-2648.
62. Zajdel J. K., Cegłowski P., Dobrzański W. T., (1985), *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 969-974.
63. Barefoot S. F., Klaenhamer T. R., (1984), *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, 26, 328-334.
64. González B., Arca P., Mayo B., Suárez J. E., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2158-2163.
65. Ratnam P., Barefoot S., Prince L., Bodine A., McCaskill L. H., (1999), *Lait.*, 79, 125-136.
66. Ten Brink B., Minekus M., van der Vossen J. M., Leer R. J., Huis in't Veld J. H., (1994), *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 140-148.
67. Vaughan E., Daly C., Fitzgerald G. F., (1992), *J. Appl. Bacteriol.*, 73, 299-308.
68. Strasser de Saad A. M., Pasteris S. E., Manca de Madra M. C., (1995), *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 473-476.
69. Lyon W., Glatz B., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 1, 83-88.
70. Muriana P. M., Klaenhammer T. R., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 114-121.
71. Lozano J. C., Meyer J., Sletten K., Pelaz C., Nes I. F., (1992), *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1985-1990.
72. van Laack R. L. J. M., Schilinger U., Holzapfel H., (1992), *Int. J. Food Microbiol.*, 16, 183-195.
73. Daeschel M. A., McKenney M. C., McDonald L. C., (1990), *Food Microbiol.*, 7, 91-98.
74. Faye T., Lansgrud T., Nes I. F., Holo H., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 4230-4236.
75. Grinstead D. A., Barefoot S. F., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 1, 215-220.
76. Holo H., Nilssen O., Nes I. F., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 3879-3887.
77. Lauková A., Mareková M., Javorský P., (1993), *Let. Appl. Microbiol.*, 16, 257-260.
78. Sashihara T., Dan M., Kimura H., Matsusaki A., Sonomoto K., Ishizaki A., (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 496-501.
79. Chen Y., Shapira R., Einstein M., Montville T. J., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 524-531.
80. Kaiser A. L., Montville T. J., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 84, 715-721.