



Zastosowanie bakteriocyn klasy IIa bakterii fermentacji mlekowej

Anna Sip, Maria Krasowska, Michał Więckowicz

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Application of class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria

Summary

In the paper issues related to the occurrence of human pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* were described. First, the properties of that microorganism were characterized and the threats relevant to its presence in food were emphasized. In the further sections of the paper the attention was paid to the need for evaluation of effective methods to inactivate *Listeria* and therefore the possibility of the practical use of class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. The role played by the class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria in the protection of food products against *Listeria* and as a consequence in listeriosis prevention was detailed. Other practical application of biological activity revealed by this class of bacteriocins were also highlighted.

Key words:

bacteriocins, *Listeria monocytogenes*, lactic acid bacteria, antilisterial activity, class IIa bacteriocins, biopreservation.

Adres do korespondencji

Anna Sip,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy,
ul. Wojska Polskiego 48,
60-627 Poznań;
e-mail:
aniasip@up.poznan.pl

biotechnologia

3 (86) 129–147 2009

1. Bakterie *Listeria monocytogenes* i zagrożenia związane z ich występowaniem w żywności

W ostatnich latach olbrzymi niepokój wzbudzają informacje o rosnącej liczbie infekcji wywoływanych przez chorobotwórcze dla człowieka bakterie *Listeria monocytogenes*. Bakterie te powszechnie występują w środowisku naturalnym. Ich obecność stwierdza się w wodzie, glebie, na powierzchni roślin, a także w organizmach zwierząt zarówno dzikich (ptaków, gryzoni i małych ssaków), jak i hodowlanych (bydła, owiec, zwierząt futerkowych

i drobiu) (1-3). *L. monocytogenes* bytują również w pochwie, układzie oddechowym i przewodzie pokarmowym ludzi (4,5). Często są także izolowane z powierzchni produkcyjnych i pomieszczeń zakładów przemysłu spożywczego. W rezultacie pierwotnych i/lub wtórnych zakażeń bakterie *Listeria* przedostają się do wielu produktów żywnościowych (6-8), które są jednocześnie dla człowieka głównym źródłem choroby nazywanej listeriozą (9,10). Dla zdrowego dorosłego człowieka do wywołania listeriozy potrzebna jest duża liczba komórek *Listeria*, często dochodząca do poziomu 10^9 jtk/g (11,12), jednak dla osób z grupy podwyższonego ryzyka obecność nawet 100 komórek *Listeria* w 1 gramie żywności może być przyczyną poważnych problemów zdrowotnych (5,13). Do grupy podwyższonego ryzyka należą kobiety ciężarne, dzieci, diabetycy, alergicy, alkoholicy, osoby z marskością wątroby, ludzie starsi oraz ludzie o obniżonej odporności immunologicznej, zwłaszcza nosiciele wirusa HIV, osoby po chemioterapii i przeszczepach (4,5,9,14). Mimo że *L. monocytogenes* powszechnie występuje w żywności częstotliwość wywoływanych przez nią listerioz, w porównaniu z innymi chorobami bakteryjnymi przenoszonymi drogą pokarmową, jest niewielka. W krajach rozwiniętych zwykle w populacji liczącej milion osób, rocznie odnotowuje się od 2 do 8 przypadków tej choroby (15). Dla porównania, częstotliwość występowania salmonelloz jest 500 razy większa. *L. monocytogenes* stanowi jednak znacznie większe zagrożenie w porównaniu z innymi drobnoustrojami chorobotwórczymi przenoszonymi przez żywność. Listeriozy w grupie bakteryjnych chorób pokarmowych mają bowiem jeden z najwyższych współczynników śmiertelności. Przekracza on zwykle 20% (10,16). W badaniach przeprowadzonych na zlecenie Amerykańskiego Centrum Badania Chorób, w pełni potwierdzono zagrożenia związane ze spożywaniem produktów zakażonych *L. monocytogenes*, gdyż wskazano, że listeriozy stanowią obecnie aż 27,6% wszystkich przypadków śmiertelnych wywoływanych przez drobnoustroje chorobotwórcze przenoszone przez żywność (16).

Spośród szesnastu opisanych w literaturze serotypów *L. monocytogenes* najwięcej śmiertelnych dla człowieka zachorowań o charakterze epidemicznym wywołują serotypy 4b (64%), 1/2a (15%), 1/2b (10%) i 1/2c (4%). Pozostałe serotypy są najczęściej przyczyną zachorowań sporadycznych o łagodnym przebiegu (17).

Według danych epidemiologicznych w ciągu ostatnich 10 lat wyraźnie zwiększyła się liczba osób podatnych na zakażenia *Listeria*. W konsekwencji tego wzrosła również liczba listerioz, zwłaszcza okresu ciąży, i związanych z nią poronień, uszkodzeń płodów, przedwczesnych porodów oraz wielu stanów chorobowych noworodków (zapalenia płuc z niewydolnością oddechową, zapalenia opon mózgowych, wodogłowa, uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego) (4). Listerioza okresu ciąży jest uznawana za najcięższą formę kliniczną tej choroby. Może mieć ona postać infekcji wewnątrzmacicznych lub okołoporodowych. Źródłem obu listerioz jest matka, będąca najczęściej bezobjawową nosicielką. Z organizmu matki bakterie *Listeria* mogą przedostawać się przez łożysko do płodu lub, jeśli występują w pochwie, infekować noworodka w trakcie porodu (10,17). W przypadku osób dorosłych, konse-

kwencją zakażeń *L. monocytogenes* może być listerioza ośrodkowego układu nerwowego, przewlekła listerioza narządowa oraz listerioza typu posocznicy. Do najczęstszych objawów klinicznych wymienionych typów listerioz należy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie żołądka i jelit, zapalenie stawów oraz posocznica (10). Częstotliwość występowania listerioz jest prawdopodobnie dużo wyższa od podawanej w literaturze. Wiele listerioz nie zostaje bowiem zdiagnozowanych gdyż towarzyszą im jedynie łagodne objawy grypopodobne (18). W takich nieinwazyjnych przypadkach obecność *L. monocytogenes* nie jest rutynowo badana.

Szacuje się, że 95% listerioz jest konsekwencją spożywania żywności zakażonej *L. monocytogenes*. Pozostałe 5% to przypadki listerioz stwierdzane głównie u weterynarzy oraz pracowników farm mających bezpośredni kontakt ze zwierzętami zakażonymi *L. monocytogenes*. U wymienionych osób transmisja komórek chorobotwórczych bakterii *Listeria* następuje zwykle przez uszkodzoną skórę (3,9).

Produktami żywnościowymi będącymi najczęściej źródłem *L. monocytogenes* są produkty minimalnie przetworzone (żywność typu *ready-to-eat*) oraz produkty przetworzone o dużej zawartości wody, wytworzone z surowców o niskiej jakości mikrobiologicznej i przechowywane w nieodpowiednich warunkach (19,20). Dobrym środowiskiem dla rozwoju *Listeria* jest mleko oraz wyroby mleczarskie, zwłaszcza sery twarogowe oraz sery dojrzewające produkowane z mleka niepasteryzowanego (np. Parmezan), mięso oraz wyroby mięsne, przede wszystkim plasterkowane wędliny, pasztety oraz wyroby garmażeryjne (21,22). Bogatym rezerwuarem *L. monocytogenes* są także ryby, produkty morskie oraz sałatki i surówki warzywne (23) (tab. 1).

Tabela 1

Występowanie *Listeria monocytogenes* w produktach żywnościowych (19-23)

Rodzaj produktów	Liczba zakażonych produktów (%)
1	2
produkty mleczne	
mleko surowe	4,1
mleko pasteryzowane	0,4
sery półmiękkie	1,6
sery miękkie	5,9
twarogi	6,3
sery twarde	1,4
lody	0,3
mleczne napoje fermentowane	1,3
produkty mięsne	
mięso surowe	9,2
mięso mielone	25

1	2
tuszki drobiowe	60
wątróbki drobiowe	55
żołądki drobiowe	65
produkty rybne	
ryby surowe	17,1
ryby wędzone	18,2
przetwory rybne	9,8
owoce morza	12,8
produkty owocowo-warzywne	
owoce	11,8
warzywa	3,6
surówki warzywne	3,8

W związku z powszechnością występowania *L. monocytogenes* w żywności oraz związanymi z tym zagrożeniami, w USA już w 1991 r. wprowadzono nakaz kontroli artykułów konsumpcyjnych pod kątem obecności tych bakterii. Przyjęto jednocześnie bardzo rygorystyczne wytyczne mówiące o tym, że produkty minimalnie przetworzone powinny być pozbawione żywych komórek *L. monocytogenes* (ang. *zero tolerance for Listeria in ready-to-eat products*). W grudniu 2007 r., po uwzględnieniu wyników wieloletnich badań epidemiologicznych, FDA przedstawiła propozycje zmian wytycznych dotyczących *Listeria*. Zmiany te miałyby obejmować odrębny sposób kwalifikowania produktów sprzyjających i niesprzyjających rozwojowi *Listeria*. W przypadku produktów niesprzyjających rozwojowi *Listeria*, czyli produktów o $\text{pH} < 4,4$, aktywności wody poniżej 0,92 oraz produktów zawierających naturalne substancje przeciwdrobnoustrojowe, zaproponowano by dozwolony poziom ich zakażenia tymi bakteriami wynosił 100 komórek/g. W przypadku produktów sprzyjających rozwojowi *L. monocytogenes*, drobnoustrój ten nie powinien znajdować się w 25 gramach. Wszystkie natomiast produkty, zawierające więcej niż 100 komórek *L. monocytogenes* w 1 gramie według przedłożonej propozycji należałoby uznawać za niezdatne do spożycia i bezzwłocznie zniszczyć, nie tylko z uwagi na możliwość ich negatywnego oddziaływania na organizm konsumentów, ale również by nie doprowadzić do przedostania się tych mikroorganizmów do środowiska naturalnego i ich niekontrolowanego rozwoju (24). Aspekt związany z koniecznością ograniczenia możliwości rozprzestrzeniania się *L. monocytogenes* nie jest, jak dotąd, uwzględniony w żadnych regulacjach prawnych.

W krajach europejskich brak jest natomiast jednolitych przepisów określających dopuszczalny poziom zakażenia żywności bakteriami *L. monocytogenes*. W większości krajów Unii Europejskiej produkty minimalnie przetworzone przeznaczone dla dzieci oraz produkty wykorzystywane do celów medycznych uznaje się za bezpiecz-

ne z mikrobiologicznego punktu widzenia jeżeli w 25 gramach brak jest bakterii *L. monocytogenes*. W przypadku pozostałej żywności minimalnie przetworzonej oraz żywności poddawanej obróbce termicznej bezpośrednio przed spożyciem, dopuszcza się obecność do 100 żywych komórek *L. monocytogenes* w 1 gramie produktu (brak *L. monocytogenes* w 0,01g), pod warunkiem, że ilość ta nie zwiększa się w trakcie przechowywania (25). Podobne przepisy obowiązują także w Kanadzie. Według wielu autorów przepisy te są jednak zbyt liberalne i nie gwarantują pełnego bezpieczeństwa konsumentów, zwłaszcza kobiet w ciąży.

Rygorystyczne regulacje prawne dotyczące występowania *L. monocytogenes* w żywności są niezbędne nie tylko z uwagi na to, że bakterie te mają silne właściwości chorobotwórcze, ale również ze względu na ich zdolność do wzrostu w zakresie temperatur od -1,5 do 45°C, w środowisku o pH od 4,2 do 9,6, produktach o aktywności wody do 0,92 i stężeniu NaCl dochodzącym nawet do 20% (26). Szczególnie niebezpieczna jest zdolność *Listeria* do wzrostu w niskiej temperaturze, a zatem w czasie przechowywania chłodniczego. W niskiej temperaturze wzrasta także odporność *L. monocytogenes* na zasolenie i zakwaszenie środowiska (27). Bakterie te przeżywają ponadto w środowisku o pH dochodzącym do 3,3, a_w do 0,83, w temperaturze do -18°C oraz przy stężeniu NaCl do 30% (tab. 2). Są one także odporne na zamrażanie, suszenie i namnażają się w żywności przechowywanej nawet w opakowaniach próżniowych (10).

Tabela 2

Charakterystyka bakterii *Listeria monocytogenes* (3,4,8,9)

Najważniejsze właściwości fizjologiczne i biochemiczne	
morfolożia komórek	pałeczki G(+)
wzrost w warunkach tlenowych	+
wzrost w warunkach beztlenowych	+
wytwarzanie przetrwalników	-
wytwarzanie otoczek	-
rzęski	+
zdolność ruchu w temp. 25°C	+
wytwarzanie katalazy	+
wytwarzanie H ₂ S	+
hemoliza	β
test CAMP	+
hydroliza eskuliny	+
hydroliza ramnozy	+
hydroliza ksylozy	-
hydroliza mocznika	-

Tabela 2 cd.

Warunki rozwoju	
temperatura [°C]	-1,5 -45°C; optimum 30-37°C
pH	4,2-9,6; optimum 7,0
aktywność wody	0,90-0,99; optimum >0,97
stężenie NaCl [%]	<0,5-20
Warunki inaktywacji	
ogrzewanie	70°C przez co najmniej 2 min
pH	<3,0
aktywność wody	<0,83
stężenie NaCl [%]	>30
stężenie kwasów organicznych [%]	>1
promieniowanie radiacyjne	3kGy
stężenie CO ₂ [%]	>70
Warunki, w których wzrost komórek zostaje zahamowany	
temperatura [°C]	-18
pH	3,3-4,2
aktywność wody	0,90-0,83
stężenie NaCl [%]	30
stężenie kwasów organicznych [%]	>0,1
Czas generacji	
temp. 37°C	1,1 h
temp. 10°C	6,6 h
temp. 4°C	43 h
Właściwości chorobotwórcze	
główne wirulentne serotypy	4b , 1/2a, 1/2b, 1/2c
wywoływana choroba	listerioza
postacie kliniczne listeriozy	listerioza okresu ciąży, przewlekła listerioza narządowa, listerioza ośrodkowego układu nerwowego, listerioza posocznicowa
drogi infekcji	pokarmowa, czasami uszkodzenia skórne
źródła infekcji	głównie żywność, zwłaszcza minimalnie przetworzona, rzadziej ludzie i zwierzęta
osoby najbardziej podatne na infekcje	kobiety w ciąży, osoby starsze, osoby o obniżonej odporności immunologicznej
dawka infekcyjna	dla osób z grupy ryzyka <100 komórek
częstotliwość infekcji	niska; 2-8 przypadków na 1 000 000 osób rocznie
współczynnik zgonów	powyżej 20%

Odporność bakterii *L. monocytogenes* na działanie wymienionych czynników fizykochemicznych sprawia, że niszczenie ich komórek klasycznymi metodami takimi jak: zamrażanie, solenie, suszenie, zakwaszanie, czy utrwalanie chemiczne, jest bardzo trudne. Często zabiegi jakim rutynowo poddawana jest żywność są niewystarczające by w pełni zabezpieczyć ją przed rozwojem chorobotwórczych *Listeria*. Olbrzymi problem stanowi ponadto możliwość przedostawania się komórek *Listeria* do żywności w trakcie procesu produkcyjnego. Z danych literaturowych wynika, że do wtórnych zakażeń żywności tymi bakteriami dochodzi głównie podczas plasterkowania, szatkowania, rozdrabniania i filetowania. Komórki *Listeria* mają bowiem silne właściwości adhezyjne i łatwo przylegają do powierzchni produkcyjnych maszyn i urządzeń stosowanych w przemyśle spożywczym tworząc na nich często grube biofilmy, trudne do usunięcia za pomocą dostępnych w obrocie handlowym środków myjących i dezynfekcyjnych (8,28,29).

W związku z tym, że obecność chorobotwórczych dla człowieka bakterii *L. monocytogenes* stwierdza się nieustannie w żywności, w laboratoriach na całym świecie prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem efektywnych metod inaktywacji tych drobnoustrojów. Wzrost świadomości konsumentów oraz wyraźna zmiana nawyków żywieniowych sprawiają, że największym zainteresowaniem cieszą się obecnie produkty utrwalane metodami naturalnymi. Dlatego też producenci żywności z olbrzymim zainteresowaniem śledzą wyniki badań nad możliwością wykorzystania bakterii fermentacji mlekowej (LAB; ang. *Lactic Acid Bacteria*) do niszczenia *Listeria*. Wiele metabolitów LAB (m. in. kwasy organiczne, H_2O_2 , diacetyl, aldehyd octowy, bakteriocyny) działa bowiem bakteriobójczo względem *L. monocytogenes* (30,31). Spośród nich na szczególną uwagę zasługują bakteriocyny klasy IIa (32,33).

2. Wykorzystanie bakteriocyn klasy IIa i zdolnych do ich syntezy bakterii fermentacji mlekowej do zabezpieczania żywności przed rozwojem *L. monocytogenes*

Bakteriocyny klasy IIa mogą być stosowane do utrwalania żywności narażonej na zakażenia bakteriami *Listeria monocytogenes*. Szczególnie duże nadzieje wiąże się z możliwością wykorzystywania ich do poprawy bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności minimalnie przetworzonej, do której należy wiele produktów mlecznych, mięsnych oraz owocowo-warzywnych (32,34). W badaniach nad aplikacją bakteriocyn klasy IIa wykazano, że związki te w wielu produktach, zwłaszcza w kiełbasach, mięsie mielonym, serach, łososiach wędzonych na zimno oraz owocach morza, trwale lub przejściowo redukują liczebność chorobotwórczych dla człowieka bakterii *L. monocytogenes* (tab. 3). Wysoka odporność bakteriocyn klasy IIa na działanie temperatury oraz stabilność w środowisku o zróżnicowanym pH sprawiają, że związki te są zdolne do antagonistycznego działania na *Listeria* w szerokim zakresie temperatur i są jednocześnie przydatne do ochrony produktów o zróżnicowanym

odczynnie. Produkty te bez wpływu na aktywność bakteriocyn mogą być ponadto poddawane nawet drastycznej obróbce termicznej. Przykładowo, dobrze rozpuszczalna w wodzie mundticyna (57) i bawarycyna A (58) wytrzymują ogrzewanie odpowiednio 15. i 60-minutowe w temperaturze 100°C. Dodatkowo mundticyna zachowuje aktywność w środowisku o pH od 1 do 11 (57), a bawarycyna A w zakresie pH od 1,3 do 9,7 (88).

Tabela 3

Przykłady wykorzystania bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej klasy IIa oraz zdolnych do ich syntezy drobnoustrojów jako czynników zabezpieczających żywność przed rozwojem niepożądanych bakterii

Bakteriocyna	Producent	Utrwalany produkt	Efekt działania	Literatura
1	2	3	4	5
pediocyna PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1.0	kielbasy suche	redukcja liczebności komórek <i>Listeria</i> o co najmniej 1 cykl log (max 1,6)	(35)
		kielbaski drobiowe	redukcja liczebności komórek <i>Listeria</i> o co najmniej 1 cykl log (max 2,6)	(36)
		ser dojrzewający	redukcja liczebności <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> i <i>E. coli</i> O157:H7	(37)
		frankfurterki	hamowanie wzrostu <i>Listeria</i> przez 12 dni (25°C) lub 12 tygodni (4 i 10°C) przechowywania	(38)
pediocyna AcH	<i>Lactobacillus plantarum</i> WHE 92	plasterkowana i pakowana próżniowo gotowana kielbasa	redukcja liczebności <i>Listeria</i> z 2,7 log jtk/g do < 2 log jtk/g w ciągu 6 dni przechowywania w temp. 6°C	(39)
		ser maziowy	usunięcie <i>Listeria</i> (inokulum 7×10 ² jtk/ml solanki) przez surowy ekstrakt bakteriocynny	(40)
		ser Munster	hamowanie <i>Listeria</i> przez bakteriocynę rozpyloną na powierzchni sera	(41)
piscikocyna V1a i V1b	<i>Carnobacterium piscicola</i> V1	łosoś wędzony na zimno pakowany próżniowo	obniżenie liczebności komórek <i>Listeria</i> o ok. 1 cykl log	(42)
piscikolina 126	<i>Carnobacterium piscicola</i> JG126	szynka	trwała redukcja liczebności <i>Listeria</i> z 10 ³ jtk/g do poziomu poniżej wykrywalności	(43)
		ser Camembert	hamowanie wzrostu <i>L. monocytogenes</i> w pierwszym tygodniu dojrzewania sera oraz opóź-	

1	2	3	4	5
			nienie namnażania się <i>Listeria</i> w kolejnych etapach tego procesu	(44)
leukocyna A	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL-187	mięso wołowe pakowane próżniowo	opóźnienie procesów psucia przez <i>L. sakei</i> do 8 tygodni w temp. 2°C	(45)
bawarcyna MN	<i>Lactobacillus sakei</i> MN	kawałki wołowiny	redukcja liczebności <i>Listeria</i> o co najmniej 1 rząd wielkości w temp. 4°C	(46)
sakacyna P	<i>Lactobacillus sakei</i> Lb790	plastry kurczaka pakowane próżniowo	przy dawce 3,5 µg/g – hamowanie wzrostu <i>L. monocytogenes</i> przez 4 tyg. w temp. 10°C	(47)
sakacyna P	<i>Lactobacillus sakei</i> Lb790	łosoś wędzony na zimno pakowany próżniowo	przy dawce 3,5 µg/g – bakteriostatyczne działanie względem <i>L. monocytogenes</i> przez 21 dni w temp. 10°C	(48)
bawarcyna A	<i>Lactobacillus bavaricus</i> MI 401 (obecna nazwa <i>Lb. sakei</i>)	solone krewetki	przedłużenie trwałości z 10 do 16 dni	(49,50)
diwercyna V41	<i>Carnobacterium divergens</i> V41	plastry łososia wędzonego na zimno	długotrwałe zabezpieczenie produktu przechowywanego w warunkach chłodniczych przed rozwojem <i>Listeria</i>	(51,52)
enterocyna A	<i>Enterococcus faecium</i> CTC492	suche kielbasy fermentowane	obniżenie liczebności <i>Listeria</i> o ok 1 cykl log, działanie w połączeniu z enterocyną B	(53)
		przetwory mięsne	redukcja liczebności <i>Listeria innocua</i> w stopniu zależnym od rodzaju mięsa, działanie w połączeniu z enterocyną B	(54)
sakacyna A	<i>Lactobacillus sakei</i> Lb 06	surowe kielbasy wieprzowe	redukcja liczebności <i>Listeria monocytogenes</i> o 1 rząd wielkości w ciągu doby	(55)
		mielone mięso wołowe	hamowanie rozwoju <i>Listeria</i> przez 6 dni w temp. 8°C	(55)
		plasterkowane, pakowane próżniowo kielbasy typu Bologna	ograniczenie wzrostu <i>Listeria</i> przez ponad 3 tygodnie w temp. 7°C	(56)

Bakteriocyny klasy IIa są najczęściej wprowadzane do produktów wymagających zabezpieczenia przed rozwojem *Listeria* w postaci całkowicie lub częściowo oczyszczonych preparatów (32,53,59). Jest to najprostsze rozwiązanie technologiczne, ale niestety nie jest ono preferowane przez producentów żywności minimalnie przetworzonej. Wiąże się ono bowiem z koniecznością uwzględnienia dodatku bakteriocyny w postaci odpowiedniej adnotacji na opakowaniu, co często zniechęca konsumentów do nabycia utrwalonych za pomocą nich produktów (32,59). Stosowanie preparatów bakteriocyn jako dodatków do żywności wymaga poza tym akceptacji prawnej, a zatem musi być poprzedzone wykonaniem kosztownych i czasochłonnych badań toksykologicznych (32). W aspekcie legislacyjnym, sytuację takiej aplikacji często komplikuje również fakt, że bakteriocyny są mylnie utożsamiane z antybiotykami (60,61) – substancjami, których obecność w żywności jest zwykle niedopuszczalna (62). Spośród bakteriocyn klasy IIa, jak dotąd, jako dodatek do żywności zaakceptowana została jedynie pediocyna PA-1. Inne bakteriocyny tej klasy są nadal badane pod kątem praktycznego wykorzystania w utrwalaniu żywności zakażonej *Listeria*. Wyniki tych badań są obiecujące, gdyż wskazują jednoznacznie, że substancje te ograniczają w wielu produktach liczebność *Listeria* o 1 do 3 rzędów wielkości (tab. 3). Najwyższą aktywność wykazują w warunkach chłodniczych, a zatem w warunkach, w których dobrze namnażają się psychrofilne *L. monocytogenes*, będące najczęściej efektem wtórnych zakażeń (32).

Skuteczność działania bakteriocyn w doświadczeniach prowadzonych z zastosowaniem podłoży laboratoryjnych zwykle jest wyraźnie wyższa od tej wykazywanej w żywności. Z tego też względu działanie każdej bakteriocyny musi być przetestowane w określonym – wymagającym utrwalenia produkcie. Wykazano bowiem, że właściwości fizykochemiczne żywności mają silny wpływ na aktywność bakteriocyn (32,59,62). Interakcje zachodzące pomiędzy bakteriocynami, a składnikami żywności, zwykle ograniczają ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. W tym aspekcie należy liczyć się m. in. z możliwością ich precypitacji lub utratą przez nie aktywności, np. na skutek działania proteaz. Efektywność działania bakteriocyn w żywności zależy też od równomierności ich dystrybucji w obrębie produktu (63).

Wykazano również zależność pomiędzy skutecznością działania bakteriocyn klasy IIa, a liczebnością niepożądaną mikroflory w utrwalanych produktach. Przykładowo, bakterie *Lb. plantarum* ALC01, wytwarzające pediocynę Ach, w solance do pielęgnacji serów maziowych zakażonej komórkami *Listeria monocytogenes* na poziomie 2×10^2 jtk/ml powodowały całkowitą inaktywację tego drobnoustroju. W przypadku wyższego zakażenia solanki, wynoszącego 4×10^3 jtk/ml, w następstwie syntezy pediocyny Ach liczebność *Listeria* w serze ulegała redukcji jedynie o 1-2 rzędy wielkości i utrzymywała się na tym poziomie w ciągu całego, 40-dniowego okresu dojrzewania sera (40). Efektywność działania piscikoliny 126 na *Listeria* jest także ujemnie skorelowana z liczebnością komórek tych bakterii. Wykazano, że 512 AU/ml piscikoliny hamowało przez 20 dni w temp. 30°C wzrost *Listeria monocytogenes* w mle-

ku zakażonym na poziomie 10^2 jtk/ml. Zwiększenie stopnia zakażenia *Listeria* ograniczało skuteczność hamującego działania piscikoliny 126 (44).

Efektywność listeriobójczego działania bakteriocyn klasy IIa zależy ponadto od ilości w jakiej związku te są wprowadzane do żywności. Na podstawie wyników badań nad działaniem bakteriocyn w żywności dowodzi się, że stopień ich ochronnego działania można zwiększyć poprzez zwiększenie ich dodatku do żywności, ale jedynie do określonego krytycznego poziomu (49). Po jego przekroczeniu wzrost stężenia bakteriocyn nie skutkuje wzrostem skuteczności ich działania. Przykładowo, podobny efekt redukcji liczebności komórek *Listeria* uzyskano w mleku stosując 4096 i 8192 AU/ml piscikoliny 126 (44).

Bakteriocyny klasy IIa mają wąski zakres aktywności, często ograniczając wzrost lub niszcząc jedynie komórki *L. monocytogenes*. Cecha ta wyraźnie rozszerza możliwości aplikacji tych związków, czyniąc je – w odróżnieniu od chemicznych konserwantów – przydatnymi do zabezpieczania przed *Listeria* również produkty fermentowane i probiotyczne. Większość bakteriocyn klasy IIa nie wywiera bowiem negatywnego wpływu na wzrost i aktywność metaboliczną mikroorganizmów powszechnie stosowanych w przemyśle jako kultury starterowe do otrzymywania żywności fermentowanej. Przykładowo, 2048 AU/g piscikoliny 126 ogranicza rozwój *Listeria* w serze Camembert nie wpływając przy tym na rozwój *S. thermophilus* i *P. candidum* – kultur starterowych stosowanych do wyrobu tego sera (44).

Bakteriocyny klasy IIa mogą wykazywać aktywność również względem innych niż *Listeria* bakterii niepożądanych w żywności. Wiele bakteriocyn tej klasy jest zdolnych do antagonistycznego oddziaływania także na *Clostridium*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* oraz niektóre LAB. Aktywność względem wymienionych bakterii jest jednak zwykle dużo niższa niż wobec *Listeria* i w związku z tym nie odgrywa ona większej roli w procesie utrwalania żywności. Potwierdzają to m.in. obserwacje dokonane przez Mattila i wsp., (39). Autorzy ci badali możliwości wykorzystania pediocyny ACh zaadsorbowanej do inaktywowanych termicznie komórek *Lb. plantarum* WHE 92 w utrwalaniu plasterkowanej gotowanej kiełbasy. Stwierdzili, że preparat ten nie wpływał na namnażanie LAB w kiełbasie, oraz na jej pH i cechy organoleptyczne. Wyraźnie ograniczał on w niej natomiast wzrost chorobotwórczych *Listeria monocytogenes*.

Badacze zajmujący się aplikacją bakteriocyn klasy IIa jako listeriobójczych dodatków do żywności proponują wprowadzanie tych substancji do utrwalanych produktów w formie wolnej lub immobilizowanej (63). Forma immobilizowana jest dużo korzystniejsza, gdyż pozwala na ograniczenie interakcji bakteriocyn ze składnikami żywności i chroni je przed destrukcyjnym działaniem proteaz. Niektórzy autorzy widzą także możliwość wykorzystywania bakteriocyn klasy IIa do tworzenia opakowań aktywnych względem *Listeria* (59).

Alternatywą do bezpośredniego dodatku bakteriocyn klasy IIa do żywności jest wykorzystywanie zdolnych do ich syntezy drobnoustrojów. Rozwiązanie takie budzi olbrzymie zainteresowanie, gdyż szczepy bakteriocynogenne mogą być stosowane

jako kultury starterowe, kultury towarzyszące (53,59,63), albo jako kultury ochronne (zwłaszcza w odniesieniu do żywności niefermentowanej) (53,63). Możliwe jest także wprowadzanie do żywności składnika poddanego uprzednio fermentacji przez bakteriocynogenne bakterie (59).

Właściwości kultur bakteriocynogennych muszą być jednak dostosowane do specyfiki utrwalanych za pomocą nich produktów. Stosowanie bakteriocynogennych drobnoustrojów do ograniczania rozwoju *Listeria* w żywności wymaga również uwzględnienia procesów zachodzących podczas jej wytwarzania. Wiele zabiegów jakim jest poddawana żywność może bowiem mieć negatywny wpływ na wydajność biosyntezy bakteriocyn i/lub destabilizować ich aktywność (63). W przypadku wykorzystywania bakterii zdolnych do syntezy bakteriocyn klasy IIa niezwykle istotne jest wytwarzanie tych samych bakteriocyn przez przedstawicieli różnych szczepów i/lub rodzajów bakterii, izolowanych z odmiennych produktów. Fakt ten daje możliwość dużej elastyczności doboru producentów tych związków. Przykładowo, bakterie *Pediococcus* sp., wytwarzające pediocynę AcH, nie występują naturalnie w produktach mleczarskich i wykazują słabe zdolności adaptacyjne do tego typu środowisk. W mleku i serach dobrze natomiast rozwija się inny producent pediocyny AcH – szczep *Lb. plantarum* WHE 92 (64) i to on jest wykorzystywany do niszczenia *Listeria monocytogenes* w tych produktach.

Pozornie mniej kłopotliwe, zwłaszcza z legislacyjnego punktu widzenia, stosowanie szczepów bakteriocynogennych nie zawsze daje zamierzony efekt ochronny. Przykładowo, całkowitą inaktywację *Listeria* w serze uzyskano po zastosowaniu supernatantu płynu pochodowlanego komórek *Lb. plantarum* ALC01. Znacznie mniej skuteczne działanie odnotowano natomiast w przypadku stosowania biomasy tego szczepu (40). Podobnie, w suchych kiełbasach fermentowanych obserwowano większą skuteczność przeciwlisterijną częściowo oczyszczonych preparatów enterocyn A i B, w porównaniu z działaniem wytwarzającego je *Enterococcus faecium* CTC492. Niski poziom biosyntezy enterocyny A i B w kiełbasach był prawdopodobnie spowodowany obecnością soli, pieprzu i niskiego pH $\leq 5,1$ (53).

3. Bakteriocyny klasy IIa jako element technologii płótków

Bakteriocyny klasy IIa wykazują w żywności umiarkowane działanie przeciwdrobnoustrojowe. Zazwyczaj redukują one trwale lub przejściowo liczebność jedynie *L. monocytogenes* (32). Dlatego też uważa się, że związki te stosowane samodzielnie nie są w stanie uchronić żywności przed zepsuciem i w pełni zabezpieczyć jej przed rozwojem drobnoustrojów chorobotwórczych. Stopień redukcji liczebności *Listeria* w żywności przez bakteriocyny klasy IIa nie jest także często w pełni zadowalający. Z tego też względu bakteriocyny klasy IIa powinny być stosowane w połączeniu z innymi, synergistycznie działającymi w stosunku do nich, czynnikami konserwującymi, czyli winny być stosowane jako jeden z elementów technologii

płatków (ang. *hurdle technology*) (32,49,59,62,65). Wielu autorów podkreśla możliwość wykorzystania bakteriocyn jako tzw. ostatecznej przeszkody (ang. *final hurdle*) na drodze obniżania prawdopodobieństwa rozwoju mikroflory patogennej będącej efektem zakażeń wtórnych (59). Jest to istotne zwłaszcza w przypadku żywności sterylizowanej, w której rozwój tego typu mikroflory nie jest ograniczony antagonizmem ze strony mikroflory rodzimej lub technologicznej produktu (63).

Powszechne stosowanie bakteriocyn w technologii płatków mogłoby przynieść wiele korzyści, przede wszystkim ekonomicznych. Korzyści te mogą być następstwem złagodzenia parametrów termicznej obróbki surowca (63,65), obniżenia ilości stosowanych konserwantów chemicznych (63) oraz redukcji kosztów ponoszonych przez zakład produkcyjny w związku z psuciem się żywności (59,63). Poza aspektem ekonomicznym, mogłoby ono przyczynić się także do zwiększenia atrakcyjności sensorycznej i poprawy bezpieczeństwa zdrowotnego produktów, do utrwalania których dzięki bakteriocynom wykorzystywano by mniejszą ilość związków chemicznych (49). Przykłady możliwości wykorzystania bakteriocyn klasy IIa jako elementu technologii płatków przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4

Efekty uzyskiwane w wyniku stosowania bakteriocyn klasy IIa w połączeniu z innymi czynnikami konserwującymi

Bakteriocyna	Dodatkowe czynniki konserwujące	Efekt	Literatura
1	2	3	4
pediocyna AcH	wysokie ciśnienie hydrostatyczne (345 MPa) i podwyższona temperatura (50°C)	silniejsza redukcja liczebności bakterii <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157: H7, <i>L. sakei</i> , <i>L. mesenteroides</i>	(66)
	wysokie ciśnienie hydrostatyczne (400 MPa, 10 min, 17°C)	trwałe obniżenie liczebności <i>L. monocytogenes</i> poniżej poziomu wykrywalności w modelowych badaniach produktów mięsnych	(67)
	Tween 80 lub kapsułkowanie pediocyny w liposomach	intensyfikacja aktywności listeriobójczej pediocyny	(68)
	diocyan sodu i mleczan sodu	zwiększenie listeriobójczej aktywności bakteriocyny w mięsie wołowym	(69)
nienazwane pediocyny	<i>Lactobacillus casei</i> i <i>Lactobacillus paracasei</i> – producenci kwasów organicznych	niższa o 2,6 i 4,2-4,7 cykle log liczebność <i>Listeria</i> w gotowanej szynce i frankfurtekach pakowanych próżniowo po 28 dniach przechowywania w temp. 5°C	(70)
ALTA™ 2341	promieniowanie radiacyjne ($\geq 2,3$ kGy)	ograniczenie wzrostu <i>L. monocytogenes</i> na powierzchni frankfurterek przez 12 tygodni przechowywania w temp. 4 lub 10°C	(71)
	atmosfera pakowania: próżnia lub 100% CO ₂	wzmocnienie działania przeciwlisteryjnego pediocyny w lososiu wędzonym na zimno	(72)

1	2	3	4
sakacyjna K, enterocyjna A i B	wysokie ciśnienie hydrostatyczne (400 MPa, 10 min, 17°C)	trwale obniżenie liczebności <i>L. monocytogenes</i> poniżej poziomu wykrywalności w modelowych badaniach produktu mięsnego	(67)
mundticyjna	modyfikowana atmosfera (1,5% O ₂ /20% CO ₂ /78,5% N ₂), 8°C	obniżenie o 2 rzędy wielkości liczebności <i>Listeria</i> naniesionej na kielki <i>Vigna radiata</i> uprzednio zanurzone w roztworze bakteriocyjny lub pokryte filmem alginianowym z bakteriocyją	(73)

Bakteriocyjny klasy IIa mogą być stosowane nie tylko w połączeniu z tradycyjnymi metodami konserwowania żywności. Istnieje także możliwość utrwalania żywności za pomocą kilku bakteriocyjny jednocześnie. Przykładowo wykazano, że działanie przeciwdrobnoustrojowe pediocyny AcH stosowanej w połączeniu z nizyną (74) lub laktacyjnami B, F i 481 (75) jest większe niż pojedynczych bakteriocyjny. Podobnie mesenterocyjny 52A (klasa IIa) i 52B (klasa II), wytwarzane przez *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR 52, działają synergistycznie na komórki *Leuconostoc mesenteroides* CIP 103316^T. Czas adaptacji tego szczepu do obu bakteriocyjny jednocześnie obecnych w środowisku jest dłuższy w porównaniu z czasem jego adaptacji do tych samych bakteriocyjny stosowanych pojedynczo. Ustalono ponadto, że obie bakteriocyjny wykazują synergizm działania w stosunku do szczepów, które były wrażliwe na tylko jedną z nich (76).

Na podstawie podanych przykładów wskazuje się, że stosowanie w utrwalaniu żywności więcej niż jednej bakteriocyjny, a zwłaszcza łączenie bakteriocyjny klasy IIa z bakteriocyjnami innych klas, może zwiększać spektrum ich aktywności oraz obniżać prawdopodobieństwo pojawienia się w niej komórek zaadaptowanych do ich obecności. Większą skuteczność działania mieszaniny bakteriocyjny osiąga się przy tym stosując niższe stężenia poszczególnych jej składowych (efekt addycji lub synergizmu) (32,40,63,76)

Konsekwencją łącznego stosowania bakteriocyjny różnych klas może być pojawianie się w żywności bakterii opornych na ich działanie (77). Przykładowo, stwierdzono, że oporne na nizynę izolaty szczepów *Clostridium botulinum* 56A i 169B wykazują także zwiększoną oporność na działanie bakteriocyjny klasy IIa: pediocyny PA-1 i bawarycyny MN (65). Oporność *L. monocytogenes* LSD530 na działanie nizyny, generuje z kolei tolerancję tego szczepu na pediocynę PA-1 i diwergicynę M35, przy czym badane bakteriocyjny klasy IIa dodatkowo generowały oporności krzyżowe wobec siebie (78). Mutanty *E. faecium* oporne na mundticynę wykazywały oporność krzyżową na działanie enterocyjny SE-K4 i nizyny (77). Spontaniczne mutanty *L. monocytogenes* B73, wykazujące oporność krzyżową na działanie bakteriocyjny klasy IIa: sakacyjny A oraz leukocyn: A, B i E izolowano z częstotliwością 10⁻⁴ – 10⁻⁶ (79). Naghmouchi i wsp. (78) podkreślają, że nie można dokładnie przewidzieć, czy i w jakim stopniu

oporność nabyta na działanie jednej bakteriocyny może generować oporność na działanie innych bakteriocyn użytych w biokonserwacji danego produktu lub innych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, np. antybiotyków. Wykazano jednak przejściowy charakter nabywanej oporności na bakteriocyny. Oporność ta zanikała po kilku generacjach od usunięcia bakteriocyny ze środowiska, co świadczy tym samym o wysokim stopniu rewersji bakteriocynoopornych mutantów (80). Deegan i wsp. (59) uspokajają, że przy rozsądnej aplikacji bakteriocyn jako elementu technologii płotków, mało prawdopodobna jest, jak się wydaje, perspektywa masowego pojawiania się w żywności bakterii opornych na ich działanie.

4. Inne możliwości praktycznego wykorzystania aktywności bakteriocyn klasy IIa

Bakteriocyny klasy IIa mogą znaleźć zastosowanie nie tylko jako czynniki zwiększające bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności. W ostatnich latach olbrzymie zainteresowanie badaczy budzi także możliwość wykorzystania tych związków do leczenia chorób ludzi i zwierząt, zwłaszcza tych, które są wywoływane przez antybiotykooporne bakterie (81).

W leczeniu i/lub prewencji listeriozy przydatne mogą okazać się dwie bakteriocyny klasy IIa – piscikolina 126 oraz pediocyna ACh/PA-1. Wykazano, że obie bakteriocyny są nietoksyczne dla myszy (81) i/lub królików (82). Piscikolina 126 podawana myszom zarówno 15 minut przed, jak i 30 minut po wprowadzeniu do ich organizmu *Listeria monocytogenes* w ilości 1×10^4 jtk/ml, redukowała liczebność komórek tego mikroorganizmu docierających do wątroby i śledziony zwierząt. Ustalono, że piscikolina jest zdolna do oddziaływania na *L. monocytogenes* jedynie we wczesnym stadium infekcji, ponieważ jedynie wtedy istnieje szansa na jej bezpośredni kontakt z komórkami *Listeria* znajdującymi się we krwi. Bakteriocyny klasy IIa są natomiast nieprzydatne do niszczenia komórek *Listeria*, które zasiedliły już komórki eukariotyczne lub tkanki organizmów wyższych. Wnikanie tych peptydów do wnętrza komórek eukariotycznych wymagałoby bowiem istnienia na ich powierzchni specyficznych receptorów rozpoznawanych przez bakteriocyny (81).

Bakteriocyny klasy IIa, podobnie jak inne bakteriocyny, są rozkładane w przewodzie pokarmowym. Z tego też względu do niedawna rzadko podejmowano próby podawania ich w postaci doustnych preparatów farmaceutycznych. Le Blay i wsp. (83) zbadali przeciwdrobnoustrojową aktywność bakteriocyn klasy IIa względem mikroflory jelitowej. Wykazali, że bakteriocyny te są aktywne jedynie względem *Listeria*. Nie działają natomiast na mikroorganizmy jelitowe niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. W celu zniwelowania destrukcyjnego wpływu na bakteriocyny proteaz układu trawiennego, badacze ci zaproponowali aplikację bakteriocyn w formie zakapsułkowanej. W takiej formie do organizmu człowieka mogłaby być dostarczana, np. pediocyna PA-1. Dzięki temu mogłaby ona stano-

wić alternatywę dla antybiotyków lub być uzupełnieniem w leczeniu infekcji wywołanych przez *Listeria*. Ten kierunek wykorzystania bakteriocyny jest w pełni uzasadniony, ponieważ w badaniach *in vitro* nie wykazano, jak dotąd, hamującego wpływu pediocyny na żaden z 21 szczepów bakterii jelitowych, zarówno gramujemnych jak i gramododatnich. Na tej podstawie można przypuszczać, że bakteriocyna ta nie będzie wpływała na równowagę mikroflory jelitowej (83). Nie został jednak, jak dotąd, opracowany nośnik bakteriocyn, który działałby na te związki ochronnie w górnych odcinkach przewodu pokarmowego i ulegałby rozkładowi dopiero w jelicie grubym (docelowym miejscu działania bakteriocyn).

Bakteriocyny klasy IIa mogą mieć także inne aplikacje medyczne. Wykryto bowiem, że enterocyna CRL 35 wykazuje działanie przeciwwirusowe w odniesieniu do wirusa herpes simplex typu 1 i 2 (HSV-1 i HSV-2) (84,85). W badaniach *in vitro* prowadzonych z wykorzystaniem linii komórkowej Vero (komórki nabłonkowe nerki małpiej) wykazano, że bakteriocyna ta nie wpływa na pierwsze etapy procesu infekcji: adsorpcję i penetrację, ale hamuje końcową fazę replikacji wirusa (85). Poza tym w obecności enterocyny CRL35, w kulturze komórkowej Vero zainfekowanej szczepami wirusa HSV-1, nie dochodzi do ekspresji genu IE63, prowadzącej do supresji syntezy białek gospodarza na rzecz ekspresji genów wirusowych (114). Ponadto cenną zaletą enterocyny, w aspekcie wykorzystania jej potencjału przeciwwirusowego, jest brak cytotoksycznego oddziaływania na komórki eukariotyczne (84,85).

Olbrzymie nadzieje wiąże się także z możliwością wykorzystania bakteriocyn w leczeniu i profilaktyce gruźlicy. Ustalono, jak dotąd, że enterocyna P, kurwacyna A, mesenterocyna Y105 i bawarcyna A silnie inhibują wzrost *Mycobacterium smegmatis* – organizmu wykorzystywanego w badaniach nad gruźlicą. W związku z tym przypuszcza się, że układ złożony z tych bakteriocyn mógłby znaleźć zastosowanie do ograniczania rozwoju drobnoustrojów wywołujących gruźlicę (86).

Bakteriocyny klasy IIa mogą także okazać się przydatne w akwakulturze, zwłaszcza gdy są stosowane w połączeniu z przeciwdrobnoustrojowymi peptydami pochodzącymi z komórek eukariotycznych. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że pediocyna PA-1, sakacyna P i kurwacyna A wzmacniają aktywność pleurocidyny, peptydu pozyskanego z ryb, względem *E. coli* (87). Fakt ten może być w przyszłości wykorzystany do opracowania preparatów selektywnie eliminujących bakterie gramujemne z organizmów ryb (63).

5. Podsumowanie

Bakteriocyny klasy IIa są jedną z najbardziej aktywnych grup bakteriocyn względem chorobotwórczych dla człowieka bakterii *Listeria monocytogenes*. W porównaniu z innymi bakteriocynami wykazują one jednak wąskie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Fakt ten nie ogranicza jednak możliwości ich praktycznego wykorzystania, a w wielu przypadkach jest nawet ich zaletą. Bakteriocyny klasy IIa,

stosowane zwłaszcza w połączeniu z innymi metodami utrwalania żywności, pozwalają bowiem na selektywną eliminację z żywności niepożądanych bakterii, głównie *Listeria monocytogenes*. Nie wywierają one przy tym negatywnego wpływu na liczebność i aktywność mikroflory istotnej z punktu widzenia technologii, np. starterów stosowanych w produkcji żywności fermentowanej lub drobnoustrojów probiotycznych (32,34).

Większość badań nad możliwością praktycznego wykorzystania bakteriocyn klasy IIa, jak dotąd, dotyczyło pediocyny PA-1/AcH. Skuteczność jej przeciwdrobnoustrojowego, głównie listeriobójczego działania, została potwierdzona w mięsie, serach i sałatkach. Ekonomiczne i zdrowotne korzyści płynące z możliwości aplikacji pediocyny zadecydowały również o tym, że zarówno produkcja jak i zastosowanie tej bakteriocyny zostały opatentowane w Europie i Stanach Zjednoczonych Ameryki (32). W chwili obecnej, w sprzedaży znajdują się już nawet kultury ochronne, w skład których wchodzi bakterie *L. plantarum* ALC01 (Danisco, Niebull, Niemcy) produkujące pediocynę AcH (40). W obrocie handlowym dostępny jest także komercyjny preparat pediocyny PA-1 o nazwie handlowej ALTATM 2341 (Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork, Ireland) (63,88). Zgodnie z deklaracjami, prawdopodobnie już w niedługiej przyszłości nastąpi komercjalizacja piscikoliny 126, kolejnego preparatu bakteriocyny klasy IIa (89). Możliwości zastosowania pozostałych bakteriocyn klasy IIa lub ich producentów w przemyśle spożywczym (32) pozostają nadal w fazie eksperymentalnej. Intensywnie badane są obecnie także medyczne możliwości aplikacji tej klasy bakteriocyn.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego własnego nr 2044/B/P01/2008/35 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Literatura

1. Capta R., Alonso-Calleja C., Moreno B., Garcia-Fernandez M. C., (2001), *Int. J. Food Microbiol.*, 65, 75-82.
2. Baek S. Y., Lim S. Y., Lee D. H., Min K. H., Kim Ch. M., (2001), *J. Food Prot.*, 63, 186-189.
3. Okutani A., Yumiko O., Yamamoto S., Igimi S., (2004), *Int. J. Food Microbiol.*, 93, 131-140.
4. Schlech W. F., (2000), *Clin. Infect. Dis.*, 31, 770-775.
5. Orndorff P. E., Hamrick T. S., Smoak I. W., Havell E. A., (2006), *Vet. Microbiol.*, 114, 1-15.
6. Lunden J., Autio T. J., Korkeala H. J., (2002), *J. Food Protect.*, 65, 1129-1133.
7. Silva M. C. D., Almeida R. C. C., Alves M. A. O., Almeida P. F., (2003), *Int. J. Food Microbiol.*, 81, 241-248.
8. Guðbjornsdottir B., Einarsson H., Thorkelsson G., (2005), *Food Technol. Biotechnol.*, 43, 55-61.
9. Doganay M., (2003), *FEMS Immunol. Medic. Microbiol.*, 35, 173-175.
10. McLaughlin J., Mitchell R. T., Smerdon W. J., Jewell J., (2004), *Int. J. Food Microbiol.*, 92, 15-33.
11. Frye D. M., Zweig R., Sturgeon J., Tormey M., Lecavalier M., Lee I., Lawani L., Mascola L., (2002), *CID*, 35, 943-949.
12. Sim J., Doog D., Finnie L., Wilson M., Graham C., Brett M., Hudson J. A., (2002), *Let. Appl. Microbiol.*, 35, 409-413.
13. Maijala R., Lyytikainen O., Autio T., Aalto T., Haavisto L., Hankanen- Buzalski T., (2001), *Int. J. Food Microbiol.*, 70, 97-109.

14. Tauxe R. V., (2002), *Int. J. Food Microbiol.*, 78, 31-41.
15. Lukinmaa S., Aarnisalo K., Suihko M. L., Siitonen A., (2003), *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1694-1700.
16. CDC, (2000), *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 49, 1129-1130.
17. Schonberg A., Bannerman E., Courtieu A. L., Kiss R., McLaughlin J., Shah S., Wilhelms D., (1996), *Int. J. Food Microbiol.*, 32, 279-287.
18. Hof H., (2001), *Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 20, 369-373.
19. Pingulkar K., Kamat A., Bongirwar D., (2001), *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 52, 15-23.
20. Vitas A. I., Garcia-Jalon V. A., (2004), *Int. J. Food Microbiol.*, 90, 349-356.
21. Farber J. M., Daley E., (1994), *Int. J. Food Microbiol.*, 22, 33-42.
22. Okutani A., Yumiko O., Yamamoto S., Igimi S., (2004), *Int. J. Food Microbiol.*, 93, 131-140.
23. Farber J. M., Daley E. M., Mackie M. T., Limerick B., (2000), *Let. Appl. Microbiol.*, 31, 100-104.
24. FDA, (2007), EC No 1441/2007.
25. Beumer R. R., Hazeleger W. C., (2003), *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 35, 191-197.
26. Gandhi M., Chikindas M. L., (2007), *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 1-15.
27. Margolles A., Mayo B., de los Reyes-Gavilan C. G., (2000), *Food Microbiol.*, 17, 461-467.
28. Norton D. M., Gilmur A., (2001), *J. Appl. Microbiol.*, 33, 320-324.
29. Kalmokoff K. L., Austin J. W., Wan X. D., Sanders G., Banerjee S., Farber J. M., (2001), *J. Appl. Microbiol.*, 91, 725-734.
30. Daeschel M. A., (1989), *Food Technol.*, 1, 164-167.
31. Schillinger U., Geisen R., Holzapfel W. H., (1996), *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 158-164.
32. Ennahar S., Sonomoto K., Ishizaki A., (1999), *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 705-716.
33. Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A., (2000), *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 85-106.
34. Kostrzynska M., Bachand A., (2006), *Can. J. Microbiol.*, 52, 1017-1026.
35. Foegeding P. M., Thomas A. B., Pilkington D. H., Klaenhammer T. R., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 884-890.
36. Baccus-Taylor G., Glass K. A., Luchansky J. B., Maurer A. J., (1993), *Poult. Sci.*, 72, 1772-1778.
37. Rodríguez E., Calzada J., Arqués J. L., Rodríguez J. M., Nunez M., Medina M., (2005), *Int. Dairy J.*, 15, 51-57.
38. Chen C.-M., Sebranek J. G., Dickson J. S., Mendonca A. F., (2004), *J. Food Prot.*, 67, 1855-1865.
39. Mattila K., Saris P., Työppönen S., (2003), *Int. J. Food Microbiol.*, 89, 281-286.
40. Loessner M., Guenther S., Steffan S., Scherer S., (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1854-1857.
41. Ennahar S., Assobhei O., Hasselmann C., (1998), *J. Food Prot.*, 61, 186-191.
42. Duffes F., Feroi F., Boyaval P., Dousset X., (1999), *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 33-42.
43. Jack R. W., Wan J., Gordon J., Harmark K., Davidson B. E., Hillier A. J., Wettenhall R. E. H., Hickey M. W., Coventry M. J., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2897-2903.
44. Wan J., Harmark K., Davidson B. E., Hillier A. J., Gordon J. B., Wilcock A., Hickey M. W., Coventry M. J., (1997), *J. Appl. Microbiol.*, 82, 273-280.
45. Leisner J. J., Greer G. G., Stiles M. E., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2610-2614.
46. Winkowski K., Crandall A. D., Montville T. J., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2552-2557.
47. Katla T., Møretrø T., Sveen I., Aasen I. M., Axelsson L., Rørvik L. M., Naterstad K., (2002), *J. Appl. Microbiol.*, 93, 191-196.
48. Aasen I. M., Markussen S., Møretrø T., Katla T., Axelsson L., Naterstad K., (2003), *Int. J. Food Microbiol.*, 87, 35-43.
49. Einarsson H., Lauzon H. L., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 669-676.
50. Messens W., de Vuyst L., (2002), *Int. J. Food Microbiol.*, 72, 31-43.
51. Richard C., Brillet A., Pilet M. F., Prévost H., Drider D., (2003), *Let. Appl. Microbiol.*, 36, 288-292.
52. Connil N., Plissonneau L., Onno B., Pilet M. F., Prévost H., Dousset X., (2002), *J. Food Prot.*, 65, 333-338.
53. Aymerich T., Artigas M.G., Garriga M., Monfort J. M., Hugas M., (2000), *J. Appl. Microbiol.*, 88, 686-694.
54. Aymerich T., Garriga M., Ylla J., Vallier J., Monfort J.M., Hugas M., (2000), *J. Food Prot.*, 63, 721-726.
55. Schillinger U., Kaya M., Lucke F. K., (1991), *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 473-478.

56. Holzapfel W. H., Geisen R., Schillinger U., (1995), *Int. J. Food Microbiol.*, 24, 343-362.
57. Bennik M. H. J., Vanloo B., Brasseur R., Gorris L. M. G., Smid E. J., (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, 1373, 47-58.
58. Larsen A. G., Vogensen F. K., Josephsen J., (1993), *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 113-122.
59. Deegan L. H., Cotter P. D., Hill C., Ross P., (2006), *Int. Dairy J.*, 16, 1058-1071.
60. Hansen J. N., (1993), *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 535-564.
61. Hurst A., (1981), *Adv. Appl. Microbiol.*, 27, 85-123.
62. Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F., Chikindas M. L., (2001), *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 1-20.
63. Gálvez A., Abriouel H., López R. L., Omar N. B., (2007), *Int. J. Food Microbiol.*, 120, 51-70.
64. Ennahar S., Aoude-Werner D., Sorokine O., van Dorsselaer A., Bringel F., Hubert J. C., Hasselmann C., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4381-4387.
65. Mazzotta A. S., Crandall A. D., Montville T. J., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2654-2659.
66. Kalchayanand N., Sikes A., Dunne C. P., Ray B., (1998), *J. Food Prot.*, 61, 425-431.
67. Garriga M., Aymerich M. T., Costa S., Monfort J. M., Hugas M., (2002), *Food Microbiol.*, 19, 509-518.
68. Degnan A. J., Buyong N., Luchansky J. B., (1993), *Int. J. Food Microbiol.*, 18, 127-138.
69. Uhart M., Ravishankar S., Maks N. D., (2004), *J. Food Prot.*, 67, 2296-2301.
70. Amézquita A., Brashears M. M., (2002), *J. Food Prot.*, 65, 316-325.
71. Chen C.-M., Sebranek J. G., Dickson J. S., Mendonca A. F., (2004), *J. Food Prot.*, 67, 1866-1875.
72. Szabo E. A., Cahill M. E., (1999), *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 373-377.
73. Bennik M. H. J., van Overbeek W., Smid E. J., Gorris L. G. M., (1999), *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 226-232.
74. Hanlin M. B., Kalchayanand N., Ray P., Ray B., (1993), *J. Food Prot.*, 56, 252-255.
75. Mulet-Powell N., Lacoste-Armynot A. M., Viñas M., Simeon de Buochberg M., (1998), *J. Food Prot.*, 61, 1210-1212.
76. Limonet M., Revol-Junelles A.-M., Cailliez-Grimal C., Milliere J.-B., (2004), *Curr. Microbiol.*, 48, 204-207.
77. Sakayori Y., Muramatsu M., Hanada S., Kamagata Y., Kawamoto S., Shima J., (2003), *Microbiol.*, 149, 2901-2908.
78. Naghmouchi K., Kheadr E., Lacroix C., Fliss I., (2007), *Food Microbiol.*, 24, 718-727.
79. Dykes G. A., Hastings J. W., (1998), *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, 5-8.
80. Ennahar S., Deschamps N., Richard J., (2000), *Curr. Microbiol.*, 41, 1-4.
81. Ingham A., Ford M., Moore R. J., Tizard M., (2003), *J. Antimicrob. Chemother.*, 51, 1365-1371.
82. Bhunia A. K., Johnson M.C., Ray B., Belden E. L., (1990), *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 211-215.
83. Le Blay G., Lacroix C., Zihler A., Fliss I., (2007), *Lett. Appl. Microbiol.*, 45, 252-257.
84. Wachsman M. B., Farías M. E., Takeda E., Sesma F., de Ruiz Holgado A. P., de Torres R. A., Coto C. E., (1999), *Int. J. Antimicrob. Agents*, 12, 293-299.
85. Wachsman M. B., Castilla V., de Ruiz Holgado A. P., de Torres R. A., Sesma F., Coto C. E., (2003), *Antivir. Res.*, 58, 17-24.
86. Richard C., Cañon R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prévost H., Drider D., (2006), *Food Microbiol.*, 23, 175-183.
87. Lüders T., Birkemo G. A., Fimland G., Nissen-Meyer J., Nes I. F., (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1797-1799.
88. Settanni L., Corsetti A., (2008), *Int. J. Food Microbiol.*, 121, 123-138.
89. Holton W. C., (2000), *Environ. Health Persp.*, 108, 516-519.