



Charakterystyka listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa bakterii fermentacji mlekowej

Anna Sip, Michał Więckowicz, Maria Krasowska

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Characterization of antilisterial class IIa bacteriocins produced by lactic acid bacteria

Summary

In the paper class IIa bacteriocins were described and the microorganisms capable of their synthesis were cited. Physicochemical properties and biological activity of class IIa bacteriocins were characterized in detail with attention paid to similarities in their structure. The mechanism of bactericidal action of that class of bacteriocins and genetic background of their biosynthesis were also elucidated.

Key words:

antilisterial bacteriocins, lactic acid bacteria, class IIa bacteriocins.

1. Bakteriocyny bakterii fermentacji mlekowej i ich aktywność względem *Listeria monocytogenes*

Bakteriocyny są substancjami białkowymi o masie cząsteczkowej od kilku do kilkudziesięciu kDa, zbudowanymi przeciętnie z dwudziestu do kilkuset aminokwasów (1,2). Związki te są syntezowane przez rybosomy w nieaktywnej formie prekursorowej. Cząsteczki bakteriocyn są zróżnicowane pod względem właściwości fizykochemicznych, aktywności przeciwdrobnoustrojowej, struktury (zwłaszcza drugorzędowej), sposobu działania oraz mechanizmów potranslacyjnej modyfikacji cząsteczek i ich sekcji (3).

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

Większość bakteriocyn ulega inaktywacji w wyniku działania pepsyny, trypsyny, proteinazy K i pronazy E. Bakteriocyny będące kompleksami białkowo-węglowodanowymi są również wrażliwe na działanie enzymów amylolitycznych, natomiast zbudowane z części białkowej i lipidowej, na obróbkę enzymami lipolitycznymi. Większość bakteriocyn jest stabilna w środowisku o pH od 2,0 do 8,0 i odznacza się wysoką termoopornością, wytrzymując co najmniej 15-minutowe ogrzewanie w temperaturze 100°C oraz kilkuminutowe autoklawowanie. Odporność bakteriocyn na działanie podwyższonej temperatury zależy od stopnia ich oczyszczenia, kwasowości środowiska oraz siły jonowej (4,5).

Bakteriocyny wykazują dużą specyficzność działania, która w wielu przypadkach może być porównywalna z antybiotykami. Związki te jednak charakteryzują się dużo węższym zakresem aktywności przeciwdrobnoustrojowej i działają zwykle jedynie na kilka grup drobnoustrojów, najczęściej blisko spokrewnionych ze swoimi producentami (6). Bakteriocyny, w odróżnieniu od antybiotyków i chemicznych konserwantów żywności, są całkowicie bezpieczne dla organizmu człowieka. Nie zakłócają naturalnej równowagi mikroflory ekosystemu jelitowego, są niecytotoksyczne i niekancerogenne (7). Bakteriocyny aktywne względem drobnoustrojów chorobotwórczych są często nieaktywne w stosunku do mikroorganizmów wykorzystywanych do produkcji żywności fermentowanej oraz drobnoustrojów probiotycznych. W związku z tym bakteriocyny i zdolne do ich syntezy drobnoustroje, jak się wydaje, są idealnym narzędziem do eliminowania z żywności określonych grup drobnoustrojów, zwłaszcza chorobotwórczych (7-10). Za możliwością takiej aplikacji przemawia również fakt, że bakteriocyny spełniają większość wymagań stawianych dobrym dodatkiem do żywności. Związki te nie modyfikują bowiem właściwości organoleptycznych żywności, działają efektywnie w niewielkich stężeniach oraz są stabilne w szerokim zakresie pH i temperatury (11-13).

Zdolność do syntezy bakteriocyn wykazuje wiele szczepów bakterii fermentacji mlekowej wykorzystywanych przemysłowo i zaliczanych do organizmów bezpiecznych (GRAS) (14,15). Bakteriocyny bakterii fermentacji mlekowej są dzielone na cztery klasy: I, II, III i IV (4,16). Podstawowymi kryteriami klasyfikacji bakteriocyn tych mikroorganizmów jest struktura, zakres aktywności, właściwości fizyczne, biochemiczne, determinanty genetyczne oraz mechanizm działania (tab. 1).

Do klasy I bakteriocyn LAB zaliczane są lantyny, czyli termostabilne, membranowo-aktywne peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 5 kDa, zawierające w swoim składzie lantioninę i 3-metylolantioninę. Klasę II tworzą nielantyny, termostabilne, również membranowo-aktywne peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 13 kDa. Ich charakterystyczną cechą jest sekwencja Gly-Gly w prekursorze bakteriocyny, rozpoznawana przez miejscowospecyficzne proteazy odcinające peptyd liderowy od aktywnej bakteriocyny. W skład klasy II wchodzi cztery podklasy: IIa – bakteriocyny pediocynopodobne, zwane również cystybiotykami, IIb – bakteriocyny dipeptydowe, IIc – bakteriocyny *sec*-zależne oraz IId – bakteriocyny o właściwościach odbiegających od innych przedstawicieli bakteriocyn klasy II. Klasę III

stanowią z kolei termolabilne bakteriocyny o masie cząsteczkowej powyżej 30 kDa, które nie uszkodzają błony komórkowej. Do klasy IV zaliczono natomiast bakteriocyny będące kompleksami białkowo-lipidowymi lub białkowo-węglowodanowymi. Dokładniejszą charakterystykę poszczególnych klas bakteriocyn LAB przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Klasyfikacja bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej (4,16)

Klasa	Struktura chemiczna	Odporność na działanie temperatury	Masa cząsteczkowa (kDa)	Spektrum aktywności	Wspólne cechy
I	peptydy	+	< 5	średnie do szerokiego	obecność lantioniny i 3-metylolantioniny, uszkodzenie błony komórkowej
II	peptydy	+	< 13	wąskie do średniego	brak lantioniny obecność sekwencji Gly-Gly w prekursorze bakteriocynu, uszkodzenie błony komórkowej
IIa	peptydy	+	3,4-5,0	wąskie do średniego	obecność 2 lub więcej cząsteczek cysteiny, wspólny motyw 5-aminokwasowy
IIb	dipeptydy	+	< 13	wąskie do średniego	powstają w wyniku połączenia dwóch cząsteczek bakteriocyn, z których żadna oddzielnie nie wykazuje aktywności
IIc	peptydy	+	< 13	wąskie do średniego	są wydzielane z komórek za pomocą białek sekrecyjnych <i>sec</i>
IId	peptydy lub dipeptydy	+	< 13	średnie	właściwości odmienne od tych, jakie posiadają bakteriocyny IIa, IIb i IIc
III	peptydy	-	> 30	wąskie	brak lantioniny, nie uszkodzają błony komórkowej
IV	kompleksy białkowo-węglowodanowe i/lub -lipidowe	+	> 2,5	średnie	brak lantioniny, złożona struktura

Silną bakteriobójczą aktywność względem chorobotwórczych bakterii *L. monocytogenes* wykazują niektóre bakteriocyny bakterii fermentacji mlekowej klasy I (np. nizyna), klasy IV oraz wszystkie bakteriocyny klasy IIa (17-19).

2. Bakteriocyny bakterii fermentacji mlekowej klasy IIa

Bakteriocyny klasy IIa w literaturze są często nazywane bakteriocynami pediocynopodobnymi od nazwy pierwszych zidentyfikowanych ich przedstawicieli, czyli pediocyny ACh i PA-1. Czasami określa się je również mianem cystybiotyków z uwagi

na obecność wewnątrz łańcuchów polipeptydowych co najmniej dwóch cząsteczek cysteiny połączonych wiązaniem disiarczkowym. Wspólną i jednocześnie najbardziej charakterystyczną cechą bakteriocyn klasy IIa jest aktywność względem bakterii z rodzaju *Listeria*. Ze względu na nią bakteriocyny klasy IIa są także nazywane bakteriocynami listeriobójczymi (ang. *antilisterial bacteriocins*) (19-21).

2.1. Producenci bakteriocyn klasy IIa

Bakteriocyny klasy IIa są produkowane przez niektóre szczepy bakterii fermentacji mlekowej z rodzajów: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* oraz *Lactococcus* (19,22). Najwięcej szczepów zdolnych do syntezy bakteriocyn klasy IIa jest przedstawicielami gatunków: *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecium* oraz *Pediococcus acidilactici*. Wszystkie LAB zdolne do syntezy bakteriocyn klasy IIa, jak dotąd, wyizolowano ze świeżych lub fermentowanych, najczęściej w sposób naturalny, produktów mięsnych, rybnych, mlecznych i warzywnych. Najwięcej producentów tej klasy bakteriocyn wykryto w produktach mięsnych, głównie w fermentowanych wędlinach regionalnych (23-31), surowym mięsie (32-34) oraz mięsie pakowanym próżniowo lub w atmosferze modyfikowanej (35,36). Aktywne względem rodzaju *Listeria* bakterie, których źródłem są produkty mięsne, mogą być przedstawicielami różnych rodzajów LAB (tab. 2). Aktywność listeriobójczą, za którą są odpowiedzialne bakteriocyny klasy IIa rzadziej wykazują bakterie występujących w innych produktach. Z produktów rybnych udało się wyizolować, jak dotąd, jedynie listeriobójcze karnobakterie (37,38), z produktów mlecznych aktywne względem bakterii z rodzaju *Listeria* – *Lactobacillus plantarum* (39), *Leuconostoc mesenteroides* (40) oraz enterokoki i laktokoki (22,41,42), a z produktów warzywnych – produkujące bakteriocyny klasy IIa pediocoki i enterokoki (43,44) (tab. 2).

Tabela 2

Producenci najlepiej opisanych w literaturze bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej klasy IIa i ich pochodzenie (22-44)

Producent	Źródło izolacji	Bakteriocyna
1	2	3
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Lactobacillus curvarius</i> LTH1174	fermentowane wędliny	kurwacyna A
<i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92	sery miękkie pochodzące z Francji	pediocyna AcH
<i>Lactobacillus sakei</i> Lb106	surowe mięso	sakacyna A
<i>Lactobacillus sakei</i> Lb674	mięso	sakacyna P
<i>Lactobacillus sakei</i> M1401	zakwas piekarski	bawarycyna A
<i>Lactobacillus sakei</i> MN	mięso	bawarycyna MN

1	2	3
Leuconostoc		
<i>Leuconostoc carnosum</i> Ta11a	mięso pakowane próżniowo wyprodukowane w Republice Południowej Afryki	leukocyna Ta11a
<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL187	mięso pakowane próżniowo wyprodukowane w Kanadzie	leukocyna A
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105	mleko kozie uzyskane we Francji	mesenterycyna Y105
Pediococcus		
<i>Pediococcus acidilactici</i> H	fermentowane wędliny	pediocyna AcH
<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1.0	fermentowane wędliny	pediocyna PA-1
<i>Pediococcus acidilactici</i> SJ-1	naturalnie fermentowane wędliny pochodzące z Izraela	pediocyna SJ
<i>Pediococcus acidilactici</i> HA-6111-2	tradycyjne portugalskie fermentowane kielbasy Alheras	BacHA-6111-2
<i>Pediococcus acidilactici</i> HA-5692-3	tradycyjne portugalskie fermentowane kielbasy Alheras	BacHA-5692-3
<i>Pediococcus parvulus</i> 133	tradycyjne meksykańskie surowe fermentowane kielbasy Chorizo	nienazwana pediocyna
<i>Pediococcus parvulus</i> ATO34/ATO77	cykorja	pediocyna AcH/PA-1
Enterococcus		
<i>Enterococcus faecium</i> CTC492/T136/MMT21/P21/WHE 81	hiszpańskie fermentowane suche kielbasy, tunezyjski ser rigouta, ser Munster	enterocyna A
<i>Enterococcus faecium</i> P13/AA13/G16	hiszpańskie fermentowane suche kielbasy	enterocyna P
<i>Enterococcus mundtii</i> ATO6	cykorja	mundticyna
Carnobacterium		
<i>Carnobacterium divergens</i> V41	wnętrznoci ryb	diwercyna V41
<i>Carnobacterium divergens</i> M35	wędzone małże	divergicyna M35
<i>Carnobacterium piscicola</i> V1	ryby	piscikocyna V1a
<i>Carnobacterium piscicola</i> V1	ryby	piscikocyna V1b
<i>Carnobacterium piscicola</i> JG126	zepsuta szynka	piscikolina 126
<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B	świeża wieprzowina pakowana w atmosferze modyfikowanej	karnobakteriocyna B2
<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B	świeża wieprzowina pakowana w atmosferze modyfikowanej	karnobakteriocyna BM1
Lactococcus		
<i>Lactococcus lactis</i>	tunezyjskie produkty mleczne	laktokokcyna MMFII

Bakteriocynami o identycznych sekwencjach są: leukocyna A i leukocyna Ta11a; piscikocyna V1a i piscikolina 126; pediocyna AcH, pediocyna PA-1 i pediocyna SJ-1, piscikocyna V1b i karnobakteriocyna BM1; sakacyna A i kurwacyna B2.

W nazewnictwie bakteriocyn klasy IIa występuje wiele rozbieżności. Często bowiem bakteriocynom o tej samej strukturze pierwszorzędowej przypisane są różne nazwy. Przyczyną różnic w nazewnictwie identycznych bakteriocyn jest fakt, że ich producentami może być kilka różnych, zarówno blisko spokrewnionych jak i niespokrewnionych ze sobą, grup bakterii (19,20). Początkowo zdolność do syntezy określonych bakteriocyn przypisywano konkretnym (pojedynczym) szczepom i od ich

nazw (rodzajowych lub gatunkowych z adnotacją identyfikującą szczep producenta) tworzą nazwy bakteriocyn. Sądzą również, że bakterie pozyskane z odmiennych źródeł produkują różne bakteriocyny. W dokładnych badaniach nad strukturą bakteriocyn klasy IIa wykazano jednak, że różne szczepy bakterii fermentacji mlekowej, często nawet niespokrewnionych ze sobą, mogą produkować tę samą bakteriocynę (19,20,45,46). Mimo to, nadal wiele identycznych bakteriocyn klasy IIa jest opisywanych w literaturze pod różnymi nazwami.

Z uwagi na brak jednolitego nazewnictwa bakteriocyn klasy IIa zgłębianie wiedzy na ich temat jest utrudnione. Przykładowo, identyczne właściwości i strukturę ma karnobakteriocyna BM1 syntezowana przez szczep *C. piscicola* LV17B wyizolowany z wieprzowiny (47) oraz piscikocyna 126, której producentem jest szczep *C. piscicola* JG126 pozyskany z szynki (48). Identycznymi bakteriocynami klasy IIa mającymi różnych, ale blisko spokrewnionych ze sobą producentów, okazały się pediocyny PA-1 (23) AcH (24) oraz SJ (25). Zdolne do ich syntezy szczepy *P. acidilactici* PAC1.0, H i SJ-1 wyizolowano z różnych fermentowanych wędlin. Pediocyny oznaczane w literaturze jako AcH i PA-1 mogą być także produkowane przez bakterie należące do różnych rodzajów, takich jak *Lb. plantarum* WHE92, naturalnie występujące w serach miękkich (39) oraz dwa szczepy bakterii *Pediococcus parvulus*, których środowiskiem bytowania są produkty warzywne (43). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że koniugacyjny transfer plazmidowych genów pediocyn jest przyczyną zróżnicowania w obrębie ich producentów (49). Identyczne bakteriocyny klasy IIa mogą być także produkowane przez bakterie należące do różnych gatunków. Przykładem takich bakteriocyn jest sakacyna A (producent *Lb. sakei*) (32) i kurwacyna A (producent *Lactobacillus curvatus*) (26), a także bakteriocyny produkowane przez bakterie z rodzaju *Leuconostoc*, tj. leukocyna Ta11a (producent *Ln. carnosum*) (36) i leukocyna A (producent *Leuconostoc gelidum*) (35). Różne gatunki *Leuconostoc* mogą jednak także produkować bakteriocyny o bardzo zbliżonej strukturze. Przykładem takich bakteriocyn jest leukocyna A i mesenterycyna Y105 (40) (tab. 2 i 3).

Tabela 3

Właściwości fizykochemiczne najlepiej scharakteryzowanych bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej klasy IIa (20,38,45)

Bakteriocyna	Masa cząsteczkowa (Da)	Liczba aminokwasów	pI	Liczba wiązań S-S	Ładunek	Udział aminokwasów (%)			
						niepolarnych	polarnych	kwasowych	zasadowych
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
leukocyna A	3390	37	8,8	1	+4	30	54	13	3
leukocyna Ta11a	3390	37	8,8	1	+4	30	54	13	3
mesenterycyna Y105	3870	37	8,8	1	+4	30	54	13	3
mundticyna	4287	43	9,7	1	+4	33	53	12	2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mundticyna	4287	43	9,7	1	+4	33	53	12	2
piscikocyna VIa	4416	44	9,3	1	+3	32	57	9	2
piscikolina 126	4416	44	9,3	1	+3	32	57	9	2
bawarcyna A	4091	41	9,3	1	+3	27	51	10	2
sakacyna P	4434	43	8,8	1	+4	30	56	12	2
pediocyna AcH	4623	44	8,6	2	+6	25	57	16	2
pediocyna PA-1	4623	44	8,6	1	+6	25	57	16	2
pediocyna SJ-1	4623	44	8,6	1	+6	25	57	16	2
bawarcyna MN	4769	42	9,3	1	+3	33	52	10	2
diwercyna V41	4513	43	8,8	2	+3	30	58	9	3
enterocyna A	4832	47	9,1	2	+4	30	56	12	2
enterocyna P	4630	44	8,1	1	+2	36	50	9	5
piscikocyna VIb	4526	43	9,0	1	+3	37	46	12	5
karnobakteriocyna BM1	4526	43	9,0	1	+3	37	46	12	5
diwergicyna M35	4519	43	8,6	2	+3	33	B	B	B
sakacyna A	4308	41	9,3	1	+3	34	54	10	2
kurwacyna A	4308	41	9,3	1	+3	34	54	10	2
karnobakteriocyna B2	4967	48	10,0	1	+5	31	56	11	2

Zacienieniem zaznaczono identyczne bakteriocyny opisywane w literaturze pod różnymi nazwami.

W literaturze znaleźć można także informacje wskazujące na to, że bakteriocyny klasy IIa o podobnych właściwościach mogą być wytwarzane przez różne szczepy tego samego gatunku (31). Niekiedy także jedna bakteriocyna jest produkowana przez kilka szczepów o odmiennym pochodzeniu (np. enterocyna A – producenci *E. faecium* CTC492, T136, MMT21, P21, WHE 81) (50) (tab. 2).

Najczęściej jednak różne szczepy bakterii należących do tego samego gatunku produkują bakteriocyny klasy IIa o niskim stopniu homologii, natomiast bakteriocyny produkowane przez bakterie należące do różnych gatunków, wykazują wysoki stopień podobieństwa struktury i właściwości (19,20,45,51) (tab. 2,3 i 4).

Tabela 4

Sekwencja aminokwasowa N-końcowych fragmentów cząsteczek wybranych bakteriocyn klasy IIa

Bakteriocyna	Sekwencja aminokwasowa (struktura pierwszorzędowa)	Literatura
1	2	3
leukocyna A/Ta11a	KYYGNGYHCTKSGCSYNWGEA	(35)
mesenterycyzna Y105	KYYGNGYHCTKSGCSYNWGEA	(58)
mundticyna	KYYGNGVSCNKKGCSYDWGKA	(44)

1	2	3
piscikolina 126/piscikocyna V1a	<u>K</u> Y <u>Y</u> NGVSCNKN <u>G</u> CTVDWSKA	(48)
pediocyna AcH/PA-1	KY <u>Y</u> NGVTCGRHS <u>C</u> SVDWGKA	(59)
sakacyna P	KY <u>Y</u> NGVHCGRHS <u>C</u> TVDWGTA	(26)
diwercyna V41	KY <u>Y</u> NG <u>Y</u> YCNSK <u>K</u> CWYDWGQA	(60)
enterocyna A	KY <u>Y</u> NGVYCTKN <u>K</u> CTVDWAQA	(27)
enterocyna P	RSY <u>Y</u> NGVYCNNSK <u>C</u> WYNWGEA	(28)
karnobakteriocyna BM1/piscikocyna V1b	AISY <u>Y</u> NGVYCNKE <u>K</u> CWYNKAENKO	(61)
diwercyna M35	TKY <u>Y</u> NGVYCNNSK <u>K</u> CWYDWGTA	(38)
sakacyna A/kurwacyna A	ARSY <u>Y</u> NGVYCNNSK <u>C</u> WYNRGEA	(34)
karnobakteriocyna B2	VNY <u>Y</u> NGVSCSKTK <u>C</u> SYNWGQA	(61)

Podkreśleniem zaznaczono charakterystyczny, zachowawczy, N-końcowy motyw aminokwasowy.

Niektóre szczepy bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej, np. *C. piscicola* V1 (37) oraz *C. piscicola* LV17B (47), wytwarzają jednocześnie dwie listeriobójcze bakteriocyny o zróżnicowanej strukturze i właściwościach fizykochemicznych, ale o zbliżonym lub identycznym zakresie aktywności (tab. 2 i 3). Z danych literaturowych wynika również, że wśród producentów bakteriocyn klasy IIa są także bakterie zdolne do syntezy innych klas bakteriocyn. Przykładowo, bakterie *Enterococcus faecium* CTC492 wytwarzają jednocześnie enterocynę A, bakteriocynę należącą do klasy IIa oraz enterocynę B zaliczaną do klasy IIb (16,36).

Do niedawna sądzono, że zdolność do syntezy bakteriocyn klasy IIa posiadają jedynie bakterie fermentacji mlekowej. Na tej podstawie niektórzy autorzy sugerowali nawet, że transfer genów bakteriocyn klasy IIa zachodzi jedynie w obrębie LAB (20,45). Wyniki prac skryningowych dowiodły jednak, że w środowisku naturalnym także inne grupy bakterii mogą produkować bakteriocyny o właściwościach typowych dla bakteriocyn klasy IIa. Przykładowo, cechą tą obdarzone są bakterie *Bacillus coagulans* L₄ wytwarzające koagulinę (52) oraz *Bifidobacterium* sp. produkujące bificynę B (53).

2.2. Struktura, właściwości fizykochemiczne, biosynteza i zakres aktywności bakteriocyn klasy IIa

Do klasy tej należą peptydy o masie cząsteczkowej od 3,4 do 5 kDa zbudowane z 37-48 aminokwasów. Wszystkie bakteriocyny klasy IIa mają dodatni ładunek (od +2 do +6) i punkt izoelektryczny w wysokim pH (pIa 8,1-10) (19,45,48). W ich łańcuchach polipeptydowych występują zwykle dwie reszty cysteiny, które umożliwiają tworzenie wiązań disiarczkowych i powstanie określonej struktury drugorzędowej. Reszty te oddalone są od siebie o kilka aminokwasów i znajdują się w zacho-

wawczej pozycji (najczęściej 9 i 14) N-końcowego fragmentu cząsteczki bakteriocyny. Reszty cysteiny są połączone ze sobą wiązaniem disiarczkowym, w rezultacie czego w cząsteczkach bakteriocyn klasy IIa powstają zwykle 6-składnikowe struktury przy końcach aminowych, uznawane za konserwatywne dla bakteriocyn omawianej klasy (22,51,54). Niektóre jednak bakteriocyny klasy IIa (np. diwercyna V41, diwergicyna M35, enterocyna A, pediocyna AcH/PA-1/SJ-1) zawierają dodatkową parę cząsteczek cysteiny i drugie wiązanie S-S, najczęściej w C-końcowym rejonie cząsteczki (tab. 3) (38,45,55). Obecność wiązań disiarczkowych jest krytyczna dla aktywności bakteriocyn, zwłaszcza tych, które zawierają dwa wiązania tego typu. Wiązania S-S stabilizują strukturę drugorzędową cząsteczek bakteriocyn i prawdopodobnie mają również wpływ na ich aktywność biologiczną. W przeprowadzonych badaniach wykazano bowiem, że redukcja reszt cysteiny, a tym samym pozbawienie bakteriocyn wiązań disiarczkowych wiąże się z utratą przez nie listeriobójczej aktywności. Utlenienie zredukowanych form bakteriocyn prowadzi natomiast do ponownego pojawienia się aktywności (51).

W łańcuchach polipeptydowych cystybiotyków dominują aminokwasy polarne z ładunkiem dodatnim oraz aminokwasy niepolarne (tab. 3). Wśród tych ostatnich największy udział mają aminokwasy o niewielkiej masie cząsteczkowej, np. glicyna. Taki skład aminokwasowy zapewnia tym peptydom dużą swobodę konformacyjną (56).

Bakteriocyny zaliczane do klasy IIa wykazują wysoki stopień zgodności sekwencji aminokwasowych. W badaniach porównawczych wykazano, że posiadają one od 26,8 (np. sakacyna A i bawarcyna A/sakacyna P) do 80,5% (np. sakacyna A i enterocyna P; diwercyna V41 i enterocyna A; diwercyna V41 i diwergicyna M35) identycznych sekwencji aminokwasowych (20,45,51). Wyjątek stanowią mesenterycyna Y105 i leukocyna A, które różnią się jedynie dwoma aminokwasami w pozycjach 22 i 25 (20). Prawdopodobnie zaledwie kilkoma aminokwasami różnią się także dwie inne bakteriocyny – pediocyna AcH (PA-1/SJ-1) oraz pediocyna produkowana przez *P. parvulus* 133. Sekwencja aminokwasowa ostatniej wymienionej bakteriocyny nie została jeszcze dokładnie ustalona, ale na podstawie wyników przeprowadzonych do tej pory badań wskazuje się, że jest ona zbieżna z sekwencją pediocyny AcH. Obie pediocyny różnią się jednak pH dla punktu izoelektrycznego co sugeruje, że ich sekwencja aminokwasowa nie jest w 100% homologiczna (30). Stopień zgodności sekwencji aminokwasowych końców aminowych cząsteczek bakteriocyn klasy IIa jest szczególnie wysoki. Ustalono, że sekwencja aminokwasowa N-końcowych fragmentów tych bakteriocyn jest przynajmniej w 70, a w przypadku niektórych bakteriocyn nawet w 90% homologiczna (51). Wszystkie bakteriocyny klasy IIa zawierają ponadto w swej strukturze pierwszorzędowej charakterystyczny, zachowawczy, N-końcowy motyw aminokwasowy YGNGVXCXXXXCXV (tab. 4). Motyw ten, m. in. determinuje ich aktywność biologiczną (19,55,57). Region C-końcowy jest bardziej zróżnicowany, ale i on zawiera pewne stałe motywy aminokwasowe. Ze względu na podobieństwa w C-końcowej części cząsteczek, bakteriocyny klasy IIa łączone są w 4 podgrupy. Motywy w regionach C-końcowych cząsteczek o wysokim stopniu

zgodności posiada jednak zaledwie kilka bakteriocyn klasy IIa, np. diwercyna V41, diwergicyna M35, bawarcyna MN oraz enterocyna A (19-21,38,46,57).

W badaniach nad strukturą cząsteczek bakteriocyn klasy IIa znajdujących się w roztworach wodnych wykazano, że w środowisku tym tworzą one strukturę kłębaka statystycznego (tzw. *random coil*), natomiast nie tworzą struktur drugo- i trzeciorzędowych (20). Struktury te powstają natomiast w środowisku bezwodnym. Konformacje drugorzędowe obu końców bakteriocyn klasy IIa są odmienne. Koniec aminowy tworzy s-kształtną trójniciową antyrównoległą β -harmonijkę. Obecność dwóch reszt cysteiny w obrębie zachowawczego motywu na końcu aminowym umożliwia powstanie struktury „spinki do włosów” (tzw. *hairpin*), stabilizowanej mostkami disiarczkowymi. W efekcie, fragmenty N-końcowe bakteriocyn listeriobójczych wykazują charakter hydrofilowy. W przeprowadzonych badaniach wykazuje się, że N-końcowa domena wiąże się z białkami błonowymi komórek drobnoustrojów wrażliwych na działanie bakteriocyn klasy IIa. C-końcowy fragment cząsteczek omawianych bakteriocyn przyjmuje natomiast formę α -helisy (konformację alfa-helikálną). W przeciwieństwie do domeny N-końcowej, ma on charakter hydrofobowy, przez co cała cząsteczka bakteriocyny wykazuje charakter amfipatyczny. Fragment C-końcowy jest elementem przezbłonowym cząsteczek bakteriocyn i uczestniczy w tworzeniu por w błonach komórkowych. Oznacza to zatem, że obie domeny odgrywają ważną rolę w działaniu bakteriocyn (3,46,51,55,63).

Bakteriocyny klasy IIa są syntezowane przez rybosomy w postaci nieaktywnych propeptydów zawierających sekwencję właściwej (aktywnej) cząsteczki bakteriocyny oraz sekwencję sygnałową, odpowiedzialną za wydzielenie bakteriocyny z komórki producenta. Sekretę aktywnych cząsteczek bakteriocyn klasy IIa do środowiska zewnętrznego poprzedza odcięcie sekwencji sygnałowej propeptydu. Proces ten warunkuje aktywację cząsteczek bakteriocyn. Sekwencja sygnałowa cząsteczek propeptydów tej klasy bakteriocyn jest zbudowana z 18 do 27 reszt aminokwasowych (20). Na końcu karboksylowym zawiera ona charakterystyczny motyw złożony z dwóch reszt glicyny, rozpoznawany przez kompleks enzymatyczny odpowiedzialny za wydzielanie, który m.in. odcina peptyd sygnałowy od właściwej cząsteczki bakteriocyny. Proces ten zachodzi podczas translokacji propeptydu przez błonę komórkową komórki producenta (64).

Bakteriocyny omawianej klasy są związkami odpornymi na działanie wysokiej temperatury i stabilnymi w szerokim zakresie pH środowiska (29). W środowisku o wysokim stężeniu jonów wodorowych zwiększa się odporność tych bakteriocyn na działanie temperatury. Bakteriocyny klasy IIa, podobnie jak większość bakteriocyn są wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych. Związki te ulegają całkowitej inaktywacji pod wpływem pronazy E i proteinazy K, a niektóre także w wyniku działania α -chymotrypsyny, pepsyny i trypsyny. Bakteriocyny klasy IIa są ponadto odporne na liofilizację, zamrażanie, działanie detergentów, np. Tween 80, SDS, Triton X-100 i/lub EDTA oraz nie tracą aktywności nawet podczas długotrwałego przechowywania w temperaturze -20°C (29,38).

Charakterystyczną cechą bakteriocyn klasy IIa jest bakteriobójcza aktywność względem bakterii z rodzaju *Listeria*, głównie *L. monocytogenes*. Bakteriocyny tej klasy mogą wykazywać aktywność również względem *Clostridium*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* oraz niektórych LAB z rodzaju *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Enterococcus* (20). Niektóre bakteriocyny IIa hamują dodatkowo kiełkowanie spor *Clostridium* (44). Zakres aktywności poszczególnych bakteriocyn jest jednak zróżnicowany. Prawdopodobnie ma to związek ze strukturą tych bakteriocyn. Przemawiają za tym wyniki badań relacji zachodzących pomiędzy np. liczbą wiązań disiarczkowych i ich lokalizacją w łańcuchu polipeptydowym, a zakresem aktywności tych związków (20,55). Bakteriocyny zawierające dodatkowe wiązanie S-S w C-końcowym fragmencie łańcuchów polipeptydowych mają bowiem szerszy zakres aktywności oraz są zwykle bardziej aktywne wobec LAB (45). Mimo że wiele bakteriocyn klasy IIa wykazuje szeroki zakres aktywności i tak jest on węższy od nizyny (bakteriocyny klasy I), innej listeriobójczej bakteriocyny, powszechnie stosowanej do konserwowania żywności. Bakteriocyny klasy IIa są jednak dużo bardziej aktywne w stosunku do chorobotwórczych dla człowieka bakterii *L. monocytogenes* od bakteriocyn innych klas. W syntetyczny sposób właściwości charakterystyczne dla bakteriocyn klasy IIa przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5

Ogólna charakterystyka bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej klasy IIa (19,20,45,46)

Struktura chemiczna	Proste białka
masa cząsteczkowa	od 3,4 do 5 kDa
liczba aminokwasów w cząsteczce	od 37 do 48
charakterystyczny motyw	N-terminalny o następującym składzie: YGNGVX _{aa} C
liczba cząsteczek cysteiny w łańcuchu polipeptydowym	od 1 do 4
stopień homologiczności sekwencji aminokwasowych	26,8-80,5%, wyjątek: mesenterycyna Y105 i leukocyna A, które różnią się jedynie dwoma aminokwasami
charakter dominujących aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym	polarne
punkt izoelektryczny – pI/a	8,1-10,0
ładunek	dodatni od +2 do +6
wrażliwość na działanie enzymów	wszystkie bakteriocyny klasy IIa są wrażliwe na działanie pronazy E i proteinyazy K, a niektóre także na działanie pepsyny, trypsyny, α -chymotrypsyny
wrażliwość na działanie temperatury	wytrzymują co najmniej 15 min ogrzewanie w temp. 100°C
wrażliwość na działanie pH	są stabilne w środowisku o pH od 2,0 do 8,0

Tabela 5 cd.

zakres aktywności	wąski do szerokiego wszystkie bakteriocyny klasy IIa wykazują aktywność względem <i>Listeria</i> , działają one także na inne grupy bakterii np. <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brochothrix</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> oraz niektóre LAB zakres aktywności poszczególnych bakteriocyn różni się
sposób działania	działanie bakteriobójcze
mechanizm działania	porcja membrany cytoplazmatycznej
lokalizacja genów struktury bakteriocyn	plazmidy lub chromosomy
producenci	niektóre szczepy bakterii fermentacji mlekowej z rodzajów <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Enterococcus</i> i <i>Carnobacterium</i>
źródła izolacji szczepów – producentów	produkty żywnościowe, najczęściej mięsne lub mleczne fermentowane produkty regionalne
zastosowanie	konserwowanie żywności – ochrona żywności przed rozwojem <i>Listeria</i> medyczne aplikacje w trakcie badań

Klasę IIa tworzy obecnie ponad 20 bakteriocyn. Prawdopodobnie jednak już niedługo zostaną zaliczone do niej kolejne bakteriocyny. Wielu autorów sugeruje bowiem, że opisywane przez nich substancje białkowe o działaniu przeciwdrobnoustrojowym posiadają właściwości fizykochemiczne oraz zakresy aktywności identyczne z typowymi bakteriocynami klasy IIa (65-67). Brak pełnej informacji o strukturze nowych bakteriocyn uniemożliwia jednak dokonanie ich jednoznacznej kwalifikacji.

2.3. Mechanizm działania bakteriocyn klasy IIa

Bakteriocyny klasy IIa są peptydami o aktywności bakteriobójczej, których mechanizm działania polega na tworzeniu kompleksów poracyjnych na powierzchni komórek określonych grup bakterii. Tworzenie porów w błonie komórkowej powoduje wypływ jonów do środowiska zewnętrznego oraz prowadzi do obniżenia poziomu ATP, co z kolei zaburza równowagę jonową wewnątrz komórki i doprowadza do jej śmierci (5). W wyniku powstania porów w błonie komórkowej następuje obniżenie siły protonomotorycznej, co jest związane ze spadkiem gradientu pH i potencjału błonowego komórki, a także utratą aż do 98,9% wewnątrzkomórkowego ATP (44). Tak drastyczny spadek poziomu ATP uniemożliwia transport aktywny, m.in. aminokwasów, do wnętrza komórki (68). W przypadku działania bakteriocyn klasy IIa, spadek poziomu ATP w uszkodzonych komórkach nie jest związany z jego

wplywem przez pory. Jest on raczej skutkiem wzmożonego zapotrzebowania na energię, które wynika z konieczności utrzymania potencjału błonowego oraz braku substratów do syntezy ATP (20).

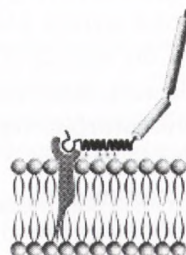
Badania nad mechanizmem działania bakteriocyn klasy IIa były prowadzone przez wielu autorów. Wyniki tych badań sugerują, że cząsteczki bakteriocyn klasy IIa wchodzi w interakcje z powierzchnią komórek bakteryjnych dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym. W oddziaływaniach tych biorą udział cząsteczki anionowych fosfolipidów błonowych, które pełnią rolę „receptora” i zakotwiczą cząsteczkę peptydu na powierzchni błony cytoplazmatycznej (69). Wiązanie cząsteczki bakteriocyny do powierzchni komórki zachodzi prawdopodobnie za pomocą N-końcowej domeny bakteriocyny o hydrofilowym charakterze. Ustalono bowiem, że domena N-końcowa bakteriocyn klasy IIa oddziałuje elektrostatycznie, w preferencyjny sposób, z fragmentami błony komórkowej bogatymi w fosfolipidy o charakterze anionowym. Ich obecność jest charakterystyczna dla bakterii gramdodatnich, czyli bakterii w obrębie których znajdują się bakterie wrażliwe na działanie bakteriocyn klasy IIa (70,71). Po rozpoznaniu i zakotwiczeniu domeny N-końcowej przez cząsteczkę receptorową, dochodzi do stabilizacji peptydu na powierzchni błony cytoplazmatycznej dzięki oddziaływaniom hydrofobowym oraz do reorientacji cząsteczki bakteriocyny, co z kolei prowadzi do wytworzenia porów w błonie komórki bakteryjnej. Do pełnego uformowania kompleksu poracyjnego niezbędne jest jednak związanie z powierzchnią komórki docelowej wielu cząsteczek bakteriocyny (72).

Niektórzy autorzy sugerują także, że istotnym etapem w tworzeniu kompleksu poracyjnego są oddziaływania hydrofobowe między powierzchnią komórki, a fragmentem cząsteczki bakteriocyny zlokalizowanym bliżej końca karboksylowego peptydu (56). Prawdopodobnie ten region cząsteczki bakteriocyny jest odpowiedzialny za specyficzność jej wiązania na powierzchni komórki. Sam fragment C-końcowy cząsteczki bakteriocyny, dzięki swoim hydrofobowym właściwościom, bierze udział w penetracji błony cytoplazmatycznej komórki wrażliwej i tworzeniu w niej porów. Mechanizm działania bakteriocyn klasy IIa w obrazowy sposób przedstawiono na rysunku.

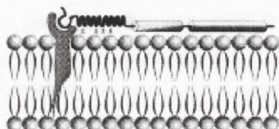
Aktywność przeciwdrobnoustrojowa bakteriocyn klasy IIa, a co za tym idzie skuteczność ich listeriobójczego działania, zależy od wielu czynników. Do najważniejszych z nich należy czas ekspozycji, stężenie bakteriocyny, stan fizjologiczny komórek docelowych oraz warunki środowiska zewnętrznego. Wykazano również dodatnią korelację między składem lipidowym błony cytoplazmatycznej a stopniem powinowactwa, np. pediocyny PA-1 do komórek bakteryjnych (73). Na stopień powinowactwa cząsteczki bakteriocyny do powierzchni komórek wpływa również pH środowiska. Parametr ten moduluje bowiem ładunek powierzchniowy dodatnio naładowanej cząsteczki bakteriocyny, a zatem wpływa na jej zdolność do oddziaływania z ujemnie naładowanymi cząsteczkami fosfolipidów błony komórkowej wrażliwych bakterii.



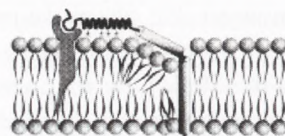
1. Zakotwiczenie cząsteczki bakteriocyny na powierzchni błony cytoplazmatycznej wrażliwej komórki.



2. Oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy cząsteczką bakteriocyny i hydrofilowymi fragmentami fosfolipidów prowadzące do związania peptydu z powierzchnią komórki docelowej.



3. Stabilizacja cząsteczki bakteriocyny na powierzchni komórki dzięki oddziaływaniom hydrofobowym.



4. Reorientacja fragmentu hydrofobowego cząsteczki bakteriocyny i penetracja membrany cytoplazmatycznej.



5. Agregacja większej liczby cząsteczek bakteriocyn na powierzchni komórki prowadząca do powstania kompleksu poracyjnego.

Rys. Mechanizm działania bakteriocyn klasy IIa (20).

2.4. Genetyczne podstawy biosyntezy bakteriocyn klasy IIa

Za syntezę bakteriocyn klasy IIa są odpowiedzialne geny plazmidowe lub chromosomalne. Geny związane z produkcją tej klasy bakteriocyn, niezależnie od lokalizacji, są zorganizowane w postaci operonów (74). Tworzą je zarówno geny struktury bakteriocyn, jak i geny kodujące inne produkty związane z powstawaniem, dojrzewaniem i transportem aktywnej cząsteczki bakteriocyny, czyli białka kompleksu transportującego oraz białka autooporności (4). Na podstawie analizy *loci* genów wybranych bakteriocyn klasy IIa stwierdzono, że operony złożone z genów kodujących bakteriocyny klasy IIa mają szereg wspólnych cech, a mianowicie po genie kodującym strukturę bakteriocyny znajduje się gen kodujący białko odporności na

działanie własnej bakteriocyny (tzw. gen autooporności), gen kodujący białka systemu transportującego ABC (ang. *ATP Binding Casette*) oraz białka umożliwiającego wydzielanie bakteriocyny poza komórkę (20). Gen białka autooporności jest konserwatywnie umiejscowiony za genem propeptydu bakteriocyny. Oba wymienione geny ulegają transkrypcji jednocześnie (3). Geny kodujące niektóre bakteriocyny klasy IIa, np. enterocynę B są jednak zorganizowane w odmienny sposób, a mianowicie mogą być one zlokalizowane w różnych miejscach w obrębie genomu (75).

Regulacja poziomu syntezy bakteriocyn klasy IIa może odbywać się na poziomie transkrypcji na bazie oddziaływania QS (tzw. *Quorum Sensing*). Zjawisko QS jest szeroko rozpowszechnionym wśród mikroorganizmów sposobem komunikacji i monitorowania stanu ilościowego populacji drobnoustrojów (76). Proces ten polega na utrzymywaniu w środowisku zewnątrzkomórkowym drobnoustrojów niewielkiego, lecz stałego poziomu stężenia specyficznych substancji sygnałowych. Wzrost liczebności populacji mikroorganizmów pociąga za sobą wzrost stężenia substancji sygnałowych, co z kolei indukuje szereg procesów wewnątrzkomórkowych, w tym syntezę bakteriocyn (77). W takim przypadku, obok operonów związanych z syntezą propeptydu bakteriocyny, w genomie bakterii bakteriocynogennych istnieje operon zawierający geny kodujące produkty związane z przekazywaniem sygnału i indukcją procesu transkrypcji genów bakteriocyn. Do produktów tego tzw. trójskładnikowego systemu indukcji ekspresji genów bakteriocyn należą: gen kodujący propeptyd czynnika indukującego HPK (kinazę histydynową) tzw. IF (ang. *Induction Factor*), gen struktury HPK oraz gen regulatora odpowiedzi wewnątrzkomórkowej RR (ang. *Response Regulator*), będącego czynnikiem transkrypcyjnym (78). Mechanizm regulacji transkrypcji genów bakteriocyn polega na tym, że czynnik IF jest transportowany przez białka systemu ABC na zewnątrz komórki wraz z cząsteczkami bakteriocyn. W momencie transportu, czynnik IF ulega aktywacji w wyniku odcięcia krótkiej sekwencji liderowej. Po przekroczeniu pewnej wartości progowej stężenia czynnika IF w środowisku zewnątrzkomórkowym, czynnik ten wiąże się z przezbłonowo ułożonym receptorem HPK. Proces ten skutkuje autofosforylacją HPK. Następnie, kinaza histydynowa katalizuje reakcję fosforylacji czynnika transkrypcyjnego RR, który po związaniu się z sekwencją promotorową genu kodującego propeptyd bakteriocyny, indukuje proces jego transkrypcji (79). Najprawdopodobniej to właśnie system trójskładnikowy IF – HPK – RR jest odpowiedzialny za regulowanie poziomu ekspresji większości bakteriocyn klasy IIa (80).

Oprócz oddziaływań QS, na poziom ekspresji genów kodujących bakteriocyny klasy IIa wpływ mają również takie czynniki zewnątrzkomórkowe jak: temperatura, siła jonowa oraz pH środowiska (77).

2.5. Kierunki praktycznego wykorzystania aktywności bakteriocyn klasy IIa

Silna aktywność listeriobójcza oraz właściwości fizykochemiczne czynią bakteriocyny klasy IIa atrakcyjnymi konserwantami żywności narażonej na zakażenia chorobotwórczymi dla człowieka bakteriami *L. monocytogenes* (18). Ze względu na to, że bakteriocyny klasy IIa często wykazują także aktywność względem innych niepożądanych w żywności mikroorganizmów, mogą one znaleźć zastosowanie również jako czynniki ograniczające ich rozwój i w konsekwencji tego przyczynić się do poprawy bezpieczeństwa mikrobiologicznego wielu artykułów konsumpcyjnych.

W ostatnich latach bakteriocyny klasy IIa wzbudziły także zainteresowanie kręgów medycznych. Okazało się bowiem, że enterocyna CRL 35 ma także działanie antywirusowe (81), a pediocyna 126 w warunkach *in vivo* wykazuje aktywność względem bakterii z rodzaju *Listeria* (82). Olbrzymie nadzieje wiąże się również z możliwością wykorzystania bakteriocyn w leczeniu i profilaktyce gruźlicy. Do tego celu przydatne mogą okazać się układy złożone z kilku bakteriocyn. Dotąd ustalono, że kombinacja enterocyny P, kurwacyny A, mesenterycyny Y105 i bawarcyny A silnie inhibuje wzrost *B. cereus* oraz *Mycobacterium smegmatis* (modelowego organizmu do badań nad gruźlicą) (45). Odkrycie to otwiera nowe możliwości aplikacji tych związków, wytyczając tym samym nowe kierunki badań nad bakteriocynami klasy IIa.

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

Literatura

1. Tagg J. R., Adnan S. D., Wamna-Maker L. W., (1976), *Bacterial. Rev.*, 40, 722-756.
2. Klaenhamer T. R., (1988), *Biochimie*, 70, 337-349.
3. Eijsink V. G. H., Axelsson L., Diep B. D., Haevarstein L. S., Holo H., Nes I. F., (2002), *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 639-654.
4. Klaenhammer T. R., (1993), *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 39-86.
5. Jack R. W., Tagg J. R., Ray B., (1995), *Microbiol. Rev.*, 59, 171-200.
6. Montville T. J., Winkowski K., Ludescher R. D., (1995), *Int. Dairy J.*, 5, 797-814.
7. Galvez A., Abriouel H., Lopez R. L., Omar N. B., (2007), *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 51-70.
8. Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F., Chkindas M. L., (2001), *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 1-20.
9. Chen H., Hoover D. G., (2003), *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2, 82-100.
10. O'Sullivan R., Ross R. P., Hill C., (2002), *Biochimie*, 84, 593-604.
11. Barby-Smith F. M., (1992), *Trends Food Sci. Technol.*, 3, 133-137.
12. Daeschel M. A., (1993), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Eds. Hoover D. H., Steenson L. R., Academic Press Inc, New York, 3, 63-91.
13. Schillinger U., Geisen R., Holzapfel W. H., (1996), *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 158-164.
14. Marrug J. D., (1991), *Food Biotechnol.*, 5, 305-312.
15. Abee T., van Schaik W., Siezen R. J., (2004), *Trends Biotechnol.*, 22, 653-659.
16. Oscariz J. C., Pisabarro A. G., (2001), *Int. J. Microbiol.*, 4, 13-19.
17. Hansen J. N., (1994), *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34, 69-93.
18. Muriana P. M., (1996), *J. Food Protect. Supplement*, 54-63.
19. Ennahar S., Sonomoto K., Ishizaki A., (1999), *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 705-716.

20. Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A., (2000), *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 85-106.
21. Fimland G., Niessen-Meyer J., Johnsen L., (2005), *J. Pept. Sci.*, 11, 688-696.
22. Ferchichi M., Fathallah M., Mansuelle P., Rochat H., Sabatier J. M., Mania M., Mabrouk K., (2001), *Biochem. Biophys. Research*, 289, 13-18.
23. Gonzalez C. F., Kunka B. C., (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2534-2538.
24. Bhunia A. K., Johnson M. C., Ray B., (1988), *J. Appl. Bacteriol.*, 65, 261-268.
25. Schved F., Lalazar A., Henis Y., Juven B. J., (1993), *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 67-77.
26. Tichaczek P. S., Nissen-Meyer J., Nes I. F., Vogel R. F., Hammes W. P., (1993), *Sys. Appl. Microbiol.*, 12, 460-468.
27. Aymerich T., Holo H., Havarstein L. S., Hugas M., Garriga M., Nes I. F., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1676-1682.
28. Cintas L. M., Casaus P., Havarstein L. S., Hernandez P. E., Nes F., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4321-4330.
29. Herranz C., Casaus P., Mukhopadhyay S., Martinez J. M., Rodriguez J. M., Nes I. F., Hernandez P. E., Cintas L. M., (2001), *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 18, 115-131.
30. Schneider R., Fernandez F. J., Aguilar M. B., Guerrero-Legarreta I., Alpuche-Solis A., Ponce-Alquicira E., (2006), *Food Control*, 17, 909-915.
31. Albano H., Todorov S. D., van Reenen C. A., Hogg T., Dicks L. M. T., Teixeira P., (2007), *Int. J. Food Microbiol.*, 116, 239-247.
32. Schillinger U., Lucke F.-K., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 8, 1901-1906.
33. Lewus C. B., Kaiser A., Montville T. J., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1683-1688.
34. Holck A., Axelsson L., Birkeland S. E., Aukrust T., Blom H., (1992), *J. Gen. Microbiol.*, 138, 2715-2720.
35. Hastings J. W., Stiles M. E., (1991), *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 127-134.
36. Felix J. V., Papatheanopoulos M. A., Smith A. A., Holy A., (1994), *Curr. Microbiol.*, 29, 207-212.
37. Pilet M. F., Dusset X., Barre R., Novel G., Desmazaud M., Piard J. Ch., (1995), *J. Food Protect.*, 58, 256-262.
38. Tahiri I., Desbienes M., Benech R., Kheadar E., Lacroix C., Thibault S., Ouellet D., Fliss I., (2004), *Int. J. Food Microbiol.*, 97, 123-136.
39. Ennahar S., Aoude-Werner D., Sorokinde O., van Dorsselear A., Bringel F., Hubert J. C., Hasselmann C., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4381-4387.
40. Hechard Y., Derijard B., Letellier F., Cenatiempo Y. J., (1992), *Gen. Microbiol.*, 138, 2725-2731.
41. Ennahar S., Asou Y., Zendo T., Sonomoto K., Ishizaki A., (2001), *Int. J. Food Microbiol.*, 70, 291-301.
42. Ghrairi T., Frere J., Berjeaud J. M., Mania M., (2008), *Food Control*, 19, 162-169.
43. Bennik M. H. J., Smid E. J., Gorris L. G. M., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2074-2076.
44. Bennik M. H. J., Vanloo B., Basseur R., Gorris L. G. M., Smid E. J., (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, 1373, 47-58.
45. Richard Ch., Canon R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prevost H., Drider D., (2006), *Food Microbiol.*, 23, 175-183.
46. Fimland G., Pirneskoski J., Kaewsrichan J., Jutila A., Kristiansen P. E., Kinnunen P. K. J., Nissen-Mayer J., (2006), *Biochim. Biophys. Acta*, 1764, 1132-1140.
47. Ahn C., Stiles M. E., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2503-2510.
48. Jack R. W., Wan J., Gordon J., Harkmark K., Davidson B. E., Hiller A. J., Wettenhall R. E. H., Hickey M. W., Coventry M. J., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2987-2903.
49. Ray B., Johnson M. C., Ray B., (1989), *J. Industr. Microbiol.*, 4, 163-166.
50. Ghrairi T., Frère J. M., Berjeaud J. M., Mania M., (2008), *Food Control*, 19, 162-169.
51. Ferchichi M., Frere J., Mabrouk K., Manai M., (2001), *FEMS Microbiol. Letters*, 205, 49-55.
52. le Marrec C., Hyronimus B., Bressollier P., Verneuil B., Urdaci M. C., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5213-5220.
53. Torue R., Kheadar E., Lacroix C., Moroni O., Fliss T., (2003), *J. Appl. Microbiol.*, 95, 1058-1069.
54. Fimland G., Johnsen L., Axelsson L., Brurberg M. B., Nes I. F., Eijnsik V. G., Nissen-Meyer J., (1990), *J. Bacteriol.*, 182, 2643-2648.
55. Eijnsink V. G., Skeie M., Middelhoven P. H., Brurberg M. B., Nes I. F., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3275-3281.

56. Kaiser A. L., Montville T. J., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4529-4535.
57. Fimland G., Eijnsik V. G., Nissen-Meyer J., (1992), *Biochem.*, 41, 9508-9515.
58. Fremaux C., Hechard Y., Cenatiempo Y., (1995), *Microbiology*, 141, 1637-1645.
59. Lozano J. C., Nissen Meyer J., Sletten K., Pelaz C., Nes I. F., (1992), *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1985-1990.
60. Metivier A., Pilet M. F., Dousset X., Sorokine O., Anglade P., Zagorec M., Piard M. C., Marion D., Cenatiempo Y., Fermaux C., (1998), *Microbiology*, 144, 2837-2844.
61. Quardi L. N. N., Sailer M., Roy K. L., Vederas J. C., Stiles M. E., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 12204-12211.
62. Uteng M., Hauge H. H., Marwick P. R., Fimland G., Mantzilas D., Nissen Meyer J., Muhle-Goll C., (2003), *Biochem.*, 42, 11417-11426.
63. Montville T. J., Chen Y., (1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 511-519.
64. Todorov S. D., Nyati H., Meincken M., Dicks L. M. T., (2007), *Food Control*, 18, 656-664.
65. Belgacem Z. B., Ferchichi M., Prevost H., Dousset X., Manai M., (2008), *Meat Sci.*, 78, 513-521.
66. Kang Z., Wei Z., Guorong L., Jinglan Z., Yunqing D., (2008), *Food Control*, 19, 817-822.
67. Guorong L., Yanni L., Pinglan L., Kang Z., Jinglan Z., (2008), *Food Control*, 19, 353-359.
68. Abee T., (1995), *FEMS Microbiol. Lett.*, 129, 1-10.
69. Fimland G., Blingsmo O. R., Sletten K., Jung G., Nes I. F., Nissen Meyer J., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3313-3318.
70. Moll G. N., Konings W. N., Driessen A. J. M., (1999), *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 185-198.
71. Bhugaloo-Vial P., Dousset X., Metivier A., Sorokine O., Anglade P., Boyaval P., Marion D., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4410-4416.
72. Chen Y., Montville T. J., (1995), *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 684-690.
73. Drider D., Fimland G., Hechard Y., McMullen L. M., Prevost H., (2006), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70, 564-582.
74. Kotelnikova E. A., Gelfand M. S., (2002), *Genetika*, 38, 758-772.
75. Franz C. M. A. P., Worobo R. W., Quadri L. E. N., Schillinger U., Holzapfel W. H., Vederas J. C., Stiles M. E., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2170-2178.
76. Miller M. B., Bassler B. L., (2001), *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, 165-199.
77. West A. H., Stock A. M., (2001), *Trends Biochem. Sci.*, 26, 369-376.
78. Diep D. B., Axelsson L., Grefli C., Nes I. F., (2000), *Microbiology*, 146, 2155-2160.
79. Nilsen T., Nes I. F., Holo H., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 1848-1854.
80. Huehne K., Axelsson L., Holck A., Kroeckel L., (1996), *Microbiology*, 142, 1437-1448.
81. Wachsman M. B., Castilla V., de Ruiz Holgado A. P., de Torres R. A., Sesma F., Coto C. E., (2003), *Antiviral. Res.*, 58, 17-24.
82. Ingham A., Ford M., Moore R. J., Tizard M., (2003), *J. Antimicrob. Chemother.*, 51, 1365-1371.