

Anna Słońska*¹, Danuta Klimuszko¹

¹ Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedra Nauk Przedklinicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w marcu 2010 r.

1. Wprowadzenie. 2. Struktura genomu i plazmidy. 3. Bakteriocy ny. 4. Klasyfikacja bakteriocyn y. 5. Organizacja operonu biosyntezy bakteriocyn y. 6. Lokalizacja operonu biosyntezy bakteriocyn y. 7. Biosynteza bakteriocyn y. 8. Mechanizm działania bakteriocyn y. 9. Bakteriocynogenność a właściwości probiotyczne bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. 10. Podsumowanie

Bacteriocins produced by probiotic rods of the genus *Lactobacillus*

Abstract: *Lactobacillus* is a genus of non-spore-forming, non-motile, Gram-positive facultative anaerobic or microaerophilic rods. They are important part of normal human and animal bacterial flora commonly associated with the gastrointestinal tract and genitourinary tract of animals and humans. They are able to produce antimicrobial substances such as bacteriocins, lactic acid and hydrogen peroxide, which have been shown to be beneficial for controlling the overgrowth of other, potentially pathogenic, bacteria. Bacteriocins are low-molecular weight single polypeptides or polypeptide complexes having an antimicrobial activity, synthesized in ribosome and secreted by bacterial cells. Genes encoding bacteriocins have been reported to be present on plasmid or genomic DNA. Lactobacilli are commonly used in the production of probiotics – a live microbial food supplements which beneficially affect the host by improving its intestinal microbial balance. They have found wide application in probiotic products which are used to balance disturbed intestinal microflora and related dysfunctions of the gastrointestinal track.

1. Introduction. 2. Genome structure and plasmids. 3. Bacteriocins. 4. Classification of bacteriocins. 5. Operon organization of bacteriocin genes. 6. Localization of the bacteriocin operons. 7. Biosynthesis of bacteriocins. 8. Mechanism of action of bacteriocins. 9. Bacteriocinogenicity and probiotic properties of *Lactobacillus* sp. 12. Summary

Słowa kluczowe: bakteriocyny, *Lactobacillus* sp., właściwości probiotyczne

Key words: bacteriocins, *Lactobacillus* sp., probiotic properties

1. Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* to Gram-dodatnie, katalazoujemne, niesporujące pałeczki bądź ziarniakopałeczki o wymiarach $0.5\text{--}1.2 \times 1\text{--}10 \mu\text{m}$, beztlenowe lub mikroaerofilne, należące do grupy bakterii fermentacji mlekowej – LAB (Lactic Acid Bacteria) [29, 52]. Rodzaj *Lactobacillus* obejmuje znaczą liczbę gatunków, które wykazują duży stopień zróżnicowania [95]. Obecnie do rodzaju *Lactobacillus* zaliczanych jest 145 gatunków i 27 podgatunków [28, 33]. Na podstawie podobieństwa sekwencji genów 16S rRNA zostało wyodrębnionych pięć grup filogenetycznych: *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. buchneri* i *L. plantarum* [85].

Pałeczki *Lactobacillus* powszechnie występują w wielu środowiskach, tam gdzie dostępny jest węglowodany np.: w szczątkach roślinnych lub psujących się owocach [11, 29]. Stosowane są w procesach fermentacyjnych m.in. jako starterowe kultury bakteryjne do produkcji żywności fermentowanej, takiej jak produkty mleczne, kiszonki, napoje, owoce, warzywa i mięso. Zapewniają właściwy przebieg procesu zakiszania pasz zwierzęcych. Dodatkowo stanowią bardzo

ważny element naturalnej bioty ludzi i zwierząt, kolonizującej ich przewód pokarmowy i układ moczowo-płciowy [29, 77].

Bakterie fermentacji mlekowej są składnikiem probiotyków, czyli preparatów lub produktów żywnościowych zawierających kultury żywych mikroorganizmów, które podane człowiekowi i zwierzętom wywierają korzystny wpływ na organizm gospodarza poprzez poprawę równowagi bioty jelitowej [31]. Szczepy z potwierdzonymi właściwościami probiotycznymi stosowane w komercyjnych produktach żywnościowych należą do gatunków *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* i *L. fermentum* [77].

Pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* uważane są za mikroorganizmy niepatogenne. Pomimo, że posiadają status GRAS (Generalny Recognised As Safe) zanozowane zostały przypadki ich izolacji od pacjentów z obniżoną odpornością, u których wystąpiły zakażenia oportunistyczne, takie jak zapalenie wsierdza, bakteriemia, zakażenia dróg moczowych, zapalenie błon śluzowych macicy, zapalenie opon mózgowych czy głębokie ropnie i ropniaki. Jednak w żadnym z tych przypadków rola bakterii *Lactobacillus* w patogenezie zakażeń nie

* Autor korespondencyjny: Katedra Nauk Przedklinicznych, Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: anex007@op.pl

została potwierdzona. Stwierdzono, że ich obecność w układzie krwionośnym może wynikać z nieprawidłowej higieny jamy ustnej, źle przeprowadzonych zabiegów stomatologicznych, uszkodzenia przewodu pokarmowego lub operacji [2, 14, 41].

Bakterie te, ze względu na fermentacyjny metabolizm, zostały podzielone na 3 grupy. Pierwsza z nich to szczepy obligatoryjnie homofermentatywne, które w wyniku fermentacji cukrów produkują kwas mlekowy. Druga grupa to szczepy fakultatywnie heterofermentatywne, które podczas fermentacji cukrów mogą produkować sam kwas mlekowy lub jeszcze dodatkowo kwas octowy, etanol i dwutlenek węgla. Natomiast trzecia grupa to szczepy obligatoryjnie heterofermentatywne, które fermentują cukry do kwasu mlekowego, kwasu octowego, etanolu i CO₂ [8, 71, 95].

2. Struktura genomu i plazmidy

Najlepiej poznanym przedstawicielem rodzaju *Lactobacillus* jest *L. plantarum* WCFS1, którego genom ma wielkość 3308274 pz, z 3052 otwartymi ramkami odczytu i zawartością par zasad G+C wynoszącą 44,5% [51].

Zastosowanie techniki PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) dostarczyło pierwszych szacunkowych ocen wielkości chromosomalnego DNA u bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [19, 50]. Badania Rouseil'a i wsp. pozwoliły na określenie wielkości genomu szczepów *L. gasseri* i *L. acidophilus*, które odpowiednio wynoszą 1 850 000 pz i 2 000 000 pz [79]. Są to relatywnie małe genomy, jeśli porówna się je z genomami bakterii, takich jak *E. coli* (4 700 000 pz), *Bacillus cereus* (5700000 pz) czy *Salmonella enterica* (4 800 000 pz).

Mniejsze rozmiary genomu bakterii *Lactobacillus*, szczególnie tych występujących w przewodzie pokarmowym, mogą wynikać z ich przystosowania do naturalnych miejsc bytowania, bogatych w składniki odżywcze, w których wiele genów dla szlaków biosyntetycznych stało się niepotrzebnych. Morishita i wsp. wykazali, że takie szczepy *Lactobacillus* mogą nieść mutacje hamujące biosyntezę aminokwasów (te szczepy przestają być prototrofami). Mogły one również wyeliminować ze swojego genomu geny niektórych szlaków biosyntetycznych, jako rezultat ewolucji w środowiskach bogatych w składniki odżywcze [50, 64]. Zmiany w genomach powstające podczas adaptacyjnej ewolucji bakterii w różnych środowiskach, mogą częściowo tłumaczyć heterogeniczność rodzaju i różnorodność w obrębie gatunku [50].

Plazmidy to pozachromosomowe ruchome elementy genetyczne, zdolne do autonomicznej replikacji i stabilnego utrzymywania się w komórce gospodarza, niezawierające genów metabolizmu podstawowego. Mogą

one nieść geny oporności na antybiotyki, geny kodujące bakteriocyny i enzymy szlaków metabolicznych czy geny warunkujące zdolność do koniugacji [101].

Pierwsze plazmidy w komórkach bakterii *Lactobacillus* zostały odkryte u szczepu *Lactobacillus casei* przez Chass'y'ego i wsp. w 1976 roku [17]. W kolejnych latach pojawiło się wiele prac dotyczących plazmidów obecnych w komórkach tych bakterii, wyizolowanych z materiału roślinnego [23], mięsa [3], kiszzonek [39], zakwasu [58, 94] i przewodu pokarmowego [47, 56]. Z badań tych wynika, że wiele gatunków pałeczek *Lactobacillus*, choć nie wszystkie, posiada jeden lub więcej plazmidów (zazwyczaj od 1 do 10) [72, 100]. Jedynie w przypadku szczepów *Lactobacillus plantarum* wykazano obecność plazmidów we wszystkich szczepach, pomimo, że izolowane były z różnych środowisk [39, 48]. Dodatkowo Ruiz-Barba i wsp. odkryli, że szczep *L. plantarum* LPC25 niesie aż 16 plazmidów [81].

Około 38% gatunków należących do rodzaju *Lactobacillus* zawiera plazmidy, których wielkość waha się od 1200 pz do 1690 pz [71, 100]. U większości gatunków występują małe plazmidy o wielkości poniżej 10000 pz. [100]. Duże plazmidy (powyżej 100000 pz) zostały odkryte u szczepów: *L. acidophilus* (pPM68, 110000 pz), *L. gasseri* CNRZ222 (150000 pz), *L. plantarum* (dwa plazmidy: 108000 pz i 169000 pz) [59, 65, 79].

Przeważająca większość plazmidów znalezionych u bakterii *Lactobacillus* to małe plazmidy kryptyczne. Część z nich została zsekwencjonowana i stwierdzono, że kodują one jedynie białka niezbędne do ich replikacji. Należą do nich plazmidy występujące u szczepów: *L. plantarum* (pA1, pLP1, p8014-2, pC30i1, pLB4), *L. pentosus* (p353-2), *L. helveticus* (pLJ1), *L. hilgardii* (pLAB1000) [50, 72].

Istnieją również plazmidy, których obecność warunkuje specyficzne właściwości bakterii. Takie plazmidy niosą ze sobą geny kodujące metabolizm glukozy [57] i innych węglowodanów [18], aminokwasów [87], produkcję N-acetyl-glukozaminy [93], oporność na antybiotyki [6], produkcję bakteriocyn i oporność na bakteriocyny [65] oraz wytwarzanie śluzu [3].

Znaczna większość plazmidów, zlokalizowana w szczepach dzikich, jest segregacyjnie stabilna i hodowla takich szczepów w warunkach laboratoryjnych nie ma widocznego wpływu na obecność tych struktur w komórkach bakterii [72]. Jednym z wyjątków są plazmidy występujące u szczepów należących do rodzaju *Lactobacillus*, na których stabilność ma wpływ wiele czynników, takich jak stosowanie antybiotyków, podłoża, temperatura inkubacji, czy też sposób przechowywania komórek [100].

Badania Sina wykazały, że na stabilność plazmidów mają wpływ warunki hodowli. Przedmiotem

jego badań był szczep *L. plantarum* caTC2, niosący trzy plazmidy (6500, 8500, 10600 pz), który był hodowany na różnych podłożach zawierających 2% glukozy, maltozy lub laktozy, w temperaturze 30°C i 21°C przez 7 dni. Autor stwierdził, że szczep hodowany na podłożu z laktozą w temperaturze 21°C utracił jeden z plazmidów (8500 pz) [89, 90]. Z kolei badania Von Husby i Nes ujawniły, że przechowywanie przez 7 lat szczepu *L. plantarum* DSM1959, mającego sześć plazmidów, spowodowało utratę dwóch z nich (pNI2 i pNI3) oraz pojawienie się jednego nowego (pNI5) [99]. Dodatkowo niektóre cechy przekazywane przez plazmidy, takie jak wykorzystanie maltozy czy galaktozy, mogą być dziedziczone niestabilnie [44, 57].

Względna niestabilność charakteryzująca duże plazmidy nie została stwierdzona w odniesieniu do małych kryptycznych plazmidów. W szczepach *L. plantarum* i *L. pentosus* zostały odkryte takie plazmidy, które nie mogą być wyeliminowane przez hodowlę w subletalnych temperaturach lub w obecności akryflawiny czy nowobiocyny, a więc w warunkach zwykle stosowanych do leczenia większości szczepów z plazmidów [12, 53]. Obecność tych małych plazmidów może dawać szczepom selekcyjną przewagę nad szczepami pozbawionymi tych struktur w warunkach pozalaboratoryjnych, mimo, że nie kodują one genów ważnych dla komórki [72].

3. Bakteriocyny

Bakterie kwasu mlekowego odgrywają zasadniczą rolę w procesach fermentacji żywności. Są one alternatywą dla chemicznych konserwantów spożywczych, od kiedy wiadomo, że ich komórkowe metabolity, takie jak: kwasy organiczne (głównie kwas mlekowy i octowy), nadtlenek wodoru oraz bakteriocyny, hamują wzrost bakterii patogennych i organizmów zanieczyszczających żywność i powodujących jej psucie [20].

Doskonałym przykładem szczepów wytwarzających naturalne konserwanty spożywcze są pałeczki z rodzaju *Lactobacillus*, licznie zasiedlające przewód pokarmowy ludzi i zwierząt. Wprowadzenie bakterii do układu pokarmowego gospodarza, pozwala skutecznie regulować skład bioty jelitowej, stymulować układ odpornościowy i usprawnić perystaltykę jelit.

Bakteriocyny to niskocząsteczkowe związki chemiczne zbudowane z prostych peptydów lub kompleksów polipeptydów, wykazujące właściwości antybakteryjne, zazwyczaj wobec gatunków blisko spokrewnionych z producentem [42]. Produkowane są przez bakterie Gram-dodatnie, takie jak: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* oraz bakterie Gram-ujemne, takie jak: *E. coli*, *Pseudomonas* [11]. Bakterie te są odporne

na wytwarzaną przez siebie bakteriocynę, ponieważ dodatkowo kodują białka blokujące aktywność bakteriocyny we wnętrzu komórki bakterii.

Bakteriocyny produkowane przez pałeczki *Lactobacillus* były obiektem badań w okresie minionych dziesięcioleci. Szczególną uwagę poświęcono tym szczepom *Lactobacillus*, które stosowano do produkcji fermentowanej żywności, głównie produktów z mleka, mięsa i warzyw. Badania Barefoota i Klarenhammery wykazały, że 63% z 52 przebadanych szczepów *L. acidophilus* produkuje bakteriocyny [10]. Wytwarzane przez nie bakteriocyny hamowały rozwój blisko spokrewnionych szczepów *Lactobacillus* (*L. helveticus*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*) oraz *Enterococcus faecalis* [50].

4. Klasyfikacja bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie Gram-dodatnie

Bakteriocyny produkowane przez bakterie Gram-dodatnie po raz pierwszy zostały sklasyfikowane przez Klarenhammery w 1993 roku [49]. Klasyfikacja ta była wielokrotnie modyfikowana i obecnie uwzględnia się cztery główne klasy bakteriocyn, w obrębie których utworzone zostały podklasy [5, 38, 67].

Klasa I obejmuje lantibiotyki, będące temostabilnymi peptydami o masie cząsteczkowej poniżej 5 kDa. Zawierają one w składzie nietypowe aminokwasy, takie jak lantionina lub 3-metylolantionina. Podzielono je na dwa typy. Do typu A należą liniowe peptydy obdarzone dodatnim ładunkiem, o masie cząsteczkowej od 2,164 do 3,488 kDa, których mechanizm działania polega na tworzeniu porów w błonie komórkowej bakterii. Typ B to bakteriocyny o budowie cyklicznej, mające ładunek ujemny lub pozbawione ładunku, o masie cząsteczkowej od 1,959 do 2,041 kDa [42].

Do klasy II należą bakteriocyny nielantibiotykowe, które nie zawierają w swoim składzie lantioniny. Są to termostabilne peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa. Na podstawie różnic w ich budowie wyodrębnione zostały trzy podklasy. Do podklasy IIa zalicza się pedicynopodobne bakteriocyny o silnej aktywności wobec bakterii z rodzaju *Listeria*. Podklasa IIb obejmuje bakteriocyny dipeptydowe, które do uzyskania pełnej aktywności antybakteryjnej wymagają działania kompleksu złożonego z dwóch peptydów. Do podklasy IIc należą bakteriocyny wydzielane na drodze sekrecji typu Sec.

Klasa III skupia bakteriocyny o dużej masie cząsteczkowej (>30 kDa), termolabilne, produkowane głównie przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* [20, 42, 69].

Klasa IV obejmuje bakteriocyny, które do uzyskania pełnej aktywności wymagają obecności części lipidowej lub węglowodanowej w cząsteczce. Istnienie

czwartej klasy zostało stwierdzone w wyniku obserwacji, że aktywność niektórych bakteriocyn jest niszczone przez działanie enzymów glikolitycznych lub lipolitycznych [42, 43, 84].

5. Organizacja operonu biosyntezy bakteriocyn

Geny kodujące produkcję bakteriocyn zorganizowane są w postaci operonowych klastrów. Najprostszy klastr zbudowany jest z co najmniej dwóch genów: genu kodującego białko strukturalne – bakteriocynę oraz genu kodującego białko oporności na nią. Taka budowa operonu, złożonego tylko z dwóch genów, charakterystyczna jest dla bakteriocyn klasy IIc, wydzielanych na drodze sekrecji z udziałem białek Sec, do których należy diwergencyna A, produkowana przez *Carnobacterium divergens* [26, 102].

W większości przypadków, wydzielanie bakteriocyn wymaga specyficznego mechanizmu eksportowego, który podlega wielu czynnikom regulacyjnym, co czyni taki operon dużo bardziej skomplikowanym. Ogólna organizacja genów biosyntezy bakteriocyn klasy IIa i IIb jest bardzo podobna i sprowadza się do układu złożonego z strukturalnego genu kodującego peptyd prekursorowy, genu oporności, genów ABC-transportera (ATP-binding cassette) oraz białka pomocniczego. W niektórych przypadkach, dodatkowo mogą wystąpić geny regulatorowe [26].

Przykładem bakteriocyny pedicynopodobnej, należącej do klasy IIa, jest pediocyna AcH. Zawiera ona N-końcowy peptyd sygnałny złożony z dwóch reszt glicynowych, który jest odcinany równocześnie z sekrecją bakteriocyny z komórki przez ABC-transportery. Operon biosyntezy pediocyny AcH złożony jest z czterech genów: genu kodującego pre-pedicynę (*papA*), genu kodującego białko oporności (*papB*) oraz dwóch genów regulujących mechanizm sekrecji, niezbędnych w czasie translokacji bakteriocyny przez błonę i podczas odcinania peptydu liderowego (*papC* i *papD*) [15].

Sakacyna A, produkowana przez *L. sakei*, jest również pedicynopodobną bakteriocyną, jednakże jej operon wykazuje odmienną budowę. Złożony jest z dwóch części rozdzielonych sekwencją *IS1163* i składa się z sześciu genów kodujących: pre-sakacynę (*sapA*), białko oporności (*saiA*), kinazę histydynową (*sapK*), białko regulatorowe (*sapR*), ABC-transporter (*sapT*) oraz białko transportowe (*sapE*) [7].

Najbardziej skomplikowaną budowę operonu mają lantibiotyki, co wynika z tego, że jako jedyne ulegają całkowitej potranslacyjnej modyfikacji. Operon biosyntezy lantibiotyków zawiera geny kodujące: prepeptyd (*LanA*), białka oporności, chroniące przed działaniem bakteriocyn (*LanI/LanE/LanF/LanG*), białka

transportowe biorące udział w wydzielaniu przez błonę – ABC-transportery (*LanT*), proteinazę odcinającą peptyd liderowy (*LanP*), enzymy odpowiedzialne za modyfikacje (*LanB*, *C/LanM*) oraz białka regulatorowe (*LanK*, *R*) [84].

6. Lokalizacja operonu biosyntezy bakteriocyn

Synteza bakteriocyn zachodzi pod kontrolą genów zlokalizowanych na bakteryjnym chromosomie, na plazmidach lub na transpozonach (zarówno na plazmidzie, jak i w chromosomie).

Chromosomalna lokalizacja operonu została potwierdzona dla bakteriocyn klasy I: mutacyny II i mutacyny III (*Streptococcus mutant*), saliwarycyny A (*Streptococcus salivarius*) oraz klasy II: enterocyny A i B (*Enterococcus faecium*), diwergency V41 (*Carnobacterium divergens*), laktacyjny F (*L. johnsonii*) oraz plantarycyny A i S (*L. plantarum*) [4, 25, 26, 30, 43, 68, 73, 74, 78, 102].

Znacznie częściej operony bakteriocyn zlokalizowane są na plazmidach. Taka lokalizacja sprzyja wewnątrz- i międzygatunkowemu rozpowszechnianiu się genów kodujących bakteriocyny wśród bakterii fermentacji mlekowej. Bakteriocyny kodowane przez geny plazmidowe to: laktycyna 481 i laktycyna 3147 (*L. lactis*), pediocyna PA-1 i pediocyna AcH (*Pediococcus acidilactici*), sakacyna A (*L. sakei*), diwergencyna A (*Carnobacterium divergens*), enterocyna P (*Enterococcus faecium*) i inne [7, 15, 22, 26, 60, 70, 102].

Nietypową lokalizację operonu wykazuje nielantibiotykowa bakteriocyna – karnobakteriocyna BM1, produkowana przez *Carnobacterium piscicola*. Podczas, gdy jej gen strukturalny znajduje się na bakteryjnym chromosomie, jego ekspresja uzależniona jest od obecności plazmidu (61000 pz), który zawiera geny niezbędne do transportu bakteriocyny i geny kodujące białka oporności [26, 75].

7. Biosynteza bakteriocyn

Bakteriocyny syntetyzowane są na rybosomach w postaci prepeptydów, które następnie są przekształcane w dojrzałe peptydy i wydzielane poza komórkę producenta za pomocą odpowiedniego mechanizmu transportowego [66]. Produkcja bakteriocyny związana jest z procesem wzrostu komórek bakterii i najintensywniej zachodzi w czasie fazy wzrostu logarytmicznego [84].

Większość bakteriocyny wyposażonych jest w N-końcowy peptyd sygnałny, który jest odcinany przed lub podczas sekrecji bakteriocyny z komórki. Ogólny szlak biosyntezy bakteriocyn składa się z kilku etapów:

syntezy prepeptydu, odcięcia peptydu sygnałowego oraz transportu zmodyfikowanego prepeptydu lub dojrzałego peptydu przez błonę cytoplazmatyczną. Schemat ten wykazuje pewne różnice, w zależności od klasy bakteriocyny.

Szlak biosyntezy lantybiotyków jest najbardziej skomplikowany. Lantybiotyki różnią się od innych bakteriocyn, ponieważ jako jedyne podlegają całkowitym potranslacyjnym modyfikacjom, które dotyczą reszt seryny, treoniny i cysteiny. Zwykle hydroksyaminokwasy – seryna i treonina (Ser i Thr) ulegają dehydratacji, odpowiednio, do form didehydroalaniny (Dha) i didehydrobutyniny (Dhb). Następnie α,β -nienasycone reszty Dha i Dhb ulegają reakcji substytucji nukleofilowej grup SH z reszty cysteiny, co prowadzi do powstania lantioniny (Lan) i 3-metylolantioniny (MeLan), form charakterystycznych dla lantybiotyków. Dodatkowo lantybiotyki w oparciu o przebieg biosyntezy, zostały podzielone na trzy grupy, które nie mają związku z opisanym wyżej podziałem na typ A i typ B [82, 97].

Do pierwszej grupy należą nizyna, subtilina i epidermina. Biosynteza tych lantybiotyków wymaga obecności dwóch enzymów modyfikacyjnych: enzymu *LanB*, biorącego udział w reakcji dehydratacji oraz enzymu *LanC*, odpowiadającego za powstanie tioeteru [45, 62]. Następnie od zmodyfikowanego prepeptydu zostaje odcięty peptyd sygnałowy (*LanP*), a dojrzały peptyd jest transportowany przez ABC-transporter (*LanT*) poza komórkę [46, 88, 97].

Druga grupa, do której należą laktocyna 481, mutacyna II i saliwarycyna A, to lantybiotyki modyfikowane przez jeden enzym – *LanM*. Modyfikacja ta ma miejsce równocześnie z transportem bakteriocyny przez ABC-transporter [97, 98].

Do trzeciej grupy należy laktocyna S, stafylokokocyna C55 i laktocyna 3147. Ta grupa bakteriocyn również modyfikowana jest przez jeden enzym – *LanM*, jednakże modyfikacja następuje przed ich sekrecją, co odróżnia je od bakteriocyn grupy drugiej [92, 97].

Bakteriocyny należące do klasy II, w odróżnieniu od lantybiotyków, podlegają minimalnej modyfikacji. Syntetyzowane są w postaci prepeptydów z N-końcowym peptydem sygnałowym, zawierającym dwie reszty glicynowe, odcinanych równocześnie z sekrecją bakteriocyny z komórki przez odpowiedni ABC-transporter. Wyjątek stanowią bakteriocyny klasy IIc, które wydzielane są na drodze sekrecji przy udziale białek Sec [40, 84, 102].

Bakteriocyny są cząsteczkami o charakterze kationowym, zawierającymi regiony hydrofobowe lub/i hydrofilowe. Wykazują duże zróżnicowanie pod względem długości łańcucha, sekwencji i składu aminokwasów, potranslacyjnej modyfikacji, sekrecji i aktywności antybakteryjnej. Nie tracą aktywności w środowisku

o niskim pH, co szczególnie dotyczy bakteriocyn klasy I i IIa. González i wsp. wykazali, że plantarocyna C jest stabilna w kwaśnym i neutralnym pH, natomiast inkubacja w warunkach alkalicznego pH powoduje jej odwracalną inaktywację [36]. Ponadto, bakteriocyny należące do wyżej wymienionych klas, wykazują dużą termostabilność przy kwaśnym pH, która obniża się wraz z jego wzrostem. Ze względu na swoją białkową naturę szybko ulegają inaktywacji w wyniku działania proteaz, głównie trypsyny, α -chymotrypsyny oraz pepsyny.

8. Mechanizm działania bakteriocyn

Oddziaływanie bakteriocyn na komórki wrażliwe może mieć charakter bakteriobójczy lub bakteriostatyczny. Większość bakteriocyn wykazuje bakteriobójcze działanie, powodując gwałtowne zmniejszenie populacji bakterii wrażliwych.

Mechanizm działania bakteriocyn polega na destabilizacji błony cytoplazmatycznej wrażliwych bakterii poprzez tworzenie w niej przejściowych kompleksów poracyjnych i kanałów jonowych. Towarzyszy temu bierny wpływ małych cząsteczek, takich jak: jony potasu, magnezu i fosforu, aminokwasy i ATP. W efekcie dochodzi do zaburzenia potencjału membranowego, gradientu pH i zahamowania funkcji pompy protonowej. Niski poziom ATP i niedobór jonów w komórce prowadzi do zahamowania syntezy DNA, RNA, białek i polisacharydów. Zahamowanie aktywnego transportu składników odżywczych powoduje śmierć komórki bakteryjnej [13, 63].

Taki mechanizm działania został zaobserwowany między innymi u *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, bakterii wyizolowanej z brazylijskiej kiełbasy wieprzowej. Wykazano, że bakteria ta potrafi hamować wzrost *Listeria monocytogenes* w pożywkach, systemach spożywczych i w mysim przewodzie pokarmowym. Bakteriocyna produkowana przez ten szczep – sakacyna P, powoduje formowanie porów w błonie komórkowej i rozproszenie protonowej siły motorycznej wrażliwych komórek szczepu *L. monocytogenes* Scott A. Dochodzi również do obniżenia koncentracji wewnątrzkomórkowego ATP oraz do wpływu 5(6)-karboksylfluoresceiny z liposomów [9, 24].

Innym mechanizmem działania bakteriocyn na wrażliwe komórki jest zdolność do wywoływania lizy komórki. Ma to miejsce wówczas, gdy bakteriocyna wchodzi w interakcję z kwasami: teichojowym, lipo-teichojowym lub teichuronowym, będącymi składnikami ściany komórkowej. Dochodzi do uwolnienia i aktywacji związanych z tymi kwasami enzymów autolitycznych, co w efekcie prowadzi do autolizy komórki. Takie działanie ma miejsce w przypadku

plantarycyny C wytwarzanej przez *Lactobacillus plantarum* LL441. W swoich badaniach Gonzalez i wsp. wykazali, że bakteriocyna ta powoduje całkowitą lizę komórek szczepu *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LMG 13551 [36, 42]

Bakteriocyny, takie jak nizyna czy większość lantibiotyków, dodatkowo mogą zaburzać procesy biosyntezy ściany komórkowej. Hamują syntezę peptydoglikanu na poziomie transglikozylacji, przy czym biosynteza DNA, RNA i białek zachodzi bez zakłóceń [34, 63].

9. Bakteriocynogenność a właściwości probiotyczne bakterii z rodzaju *Lactobacillus*

Bakterie należące do rodzaju *Lactobacillus* są bardzo często stosowane w preparatach probiotycznych. Szczepy mające potwierdzone właściwości probiotyczne i stosowane jako probiotyki należą do gatunków: *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. salivarius* i *L. plantarum*. Wszystkie wyżej wymienione gatunki zasiedlają przewód pokarmowy ludzi i zwierząt. Wyjątek stanowią szczepy *L. bulgaricus*, które stosowane są jako starterowe kultury baktericyjne do produkcji żywności fermentowanej [31].

Termin probiotyki, z greckiego *pro bios* – „dla życia”, po raz pierwszy został użyty przez Lilly i Stillwell'a w 1965 roku do opisanie substancji wydzielanych przez jeden mikroorganizm, które pobudzają wzrost drugiego [55, 86]. W miarę rozwoju nauki pojawiające się w literaturze definicje probiotyków były modyfikowane, rozszerzane i uzupełniane o nowe elementy. Aktualnie za probiotyki uważa się preparaty lub produkty żywnościowe zawierające żywe mikroorganizmy, które wywierają korzystny wpływ na organizm gospodarza, poprzez poprawę równowagi bioty jelitowej, a co za tym idzie pozytywnie wpływają na wzrost i rozwój zwierząt [31, 37].

Głównym zadaniem bakterii probiotycznych jest utrzymanie równowagi mikrobiologicznej przewodu pokarmowego, zarówno ilościowej, jak i jakościowej. Bakterie będące składnikiem preparatów probiotycznych powinny cechować się następującymi właściwościami: zdolnością do szybkiego, dynamicznego namnażania się i do kolonizacji przewodu pokarmowego, konkurencyjnością o składniki pokarmowe w stosunku do bioty patogennej, odpornością na niskie pH żołądka i na kwasy żółciowe w jelitach, zdolnością do wytwarzania substancji o właściwościach bakteriostatycznych lub bakteriobójczych, brakiem właściwości patogennych lub toksycznych dla organizmu gospodarza [31].

Mechanizm działania probiotyków, na który składa się wiele czynników, nie został jeszcze dobrze poznany. Na podstawie badań Fullera można stwierdzić, że

oddziaływanie probiotyków następuje poprzez interakcje zachodzące pomiędzy szczepami probiotycznymi i bakteriami patogennymi. Dotyczy to przede wszystkim współzawodnictwa o składniki odżywcze i o miejsce do adhezji. Pałeczki *Lactobacillus* stwarzają niekorzystne środowisko dla bakterii chorobotwórczych, ponieważ produkują związki obniżające pH w przewodzie pokarmowym i działające hamująco na wzrost sąsiadujących bakterii. Między innymi należą do nich opisane wyżej bakteriocyny [31, 37].

Działanie antybakteryjne bakteriocyn najsilniej skierowane jest wobec mikroorganizmów blisko spokrewnionych ze szczepem wytwarzającym określoną bakteriocynę. Definicja ta dotyczy większości bakteriocyn. Jednak najnowsze badania wykazują, że wiele z nich może hamować rozwój bakterii, należących do innych gatunków niż producent.

Ze względu na zakres działania wyróżniono trzy grupy bakteriocyn: 1) o wąskim spektrum aktywności, działające na szczepy wewnątrz tego samego gatunku, 2) wykazujące umiarkowany zakres aktywności, skierowanej również na inne rodzaje bakterii niż producent, w tym wiele organizmów patogennych (np.: *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*), 3) o szerokim zakresie inhibicji, obejmującej bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne oraz spory bakterii przetrwalnikujących [34].

Najlepiej poznaną bakteriocyną należącą do klasy I jest nizyna, produkowana przez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Nizyna charakteryzuje się szerokim zakresem aktywności antybakteryjnej skierowanej zarówno przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, takim jak: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Listeria* i *Mycobacterium*, jak i bakteriom gramujemnym (*E. coli* i *Salmonella*). Zapobiega również tworzeniu przetrwalników i hamuje rozwój komórek vegetatywnych bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Clostridium* [1, 20, 21, 32].

Bakteriocynami wykazującymi wąski zakres aktywności są laktokokcyna A produkowana przez *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* oraz acydocyna J1132 produkowana przez *L. acidophilus* JCM 1132, które hamują rozwój szczepów należących do tego samego gatunku [40, 96].

Na korzystny wpływ pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* składa się nie tylko ich zdolność do wytwarzania bakteriocyn. Bakterie te produkują również inne substancje o działaniu antybakteryjnym, takie jak kwasy organiczne czy nadtlenek wodoru. Antybakteryjny wpływ kwasów organicznych wynika z gwałtownego obniżenia pH w przewodzie pokarmowym, co powoduje inhibicję aktywności biochemicznej mikroorganizmów przez niezdysocjowane cząsteczki kwasu [91]. Natomiast nadtlenek wodoru hamuje roz-

wój i zabija te bakterie, które nie wytwarzają enzymów takich jak katalaza czy peroksydaza [27].

Preparaty probiotyczne zawierające pałeczki *Lactobacillus* wytwarzające bakteriocyny wykazują również działanie antynowotworowe. Mogą hamować wzrost niektórych komórek nowotworowych [76], ograniczać rozwój bakterii syntetyzujących enzymy (np.: β -glukozydazy, β -glukuronidazy, azoreduktazy) katalizujące przemiany związków prokancerogennych do kancerogennych oraz usuwać związki rakotwórcze pochodzące z diety lub tworzone przez bakterie chorobotwórcze w jelitach, poprzez skrócenie czasu pasażu treści pokarmowej przez przewód pokarmowy [16, 31, 35]. Bakterie fermentacji mlekowej zdolne są do hamowania aktywności nitroreduktazy (odpowiedzialnej za syntezę nitrozoamin), jak również do wiązania nitrozoamin i innych substancji mutagennych, takich jak azotobarwniki czy mykotoksyny [31, 35, 80]. Takie działanie antynowotworowe wykazuje plantarycyna A produkowana przez *Lactobacillus plantarum* C11. Badania Sand'a i wsp. prowadzone na rakowych i normalnych komórkach przysadki szczura wykazały, że plantarycyna A powoduje permabilizację błony komórek rakowych, a co za tym idzie ich zniszczenie [83].

Bakterie probiotyczne wspomagają również specyficzne i niespecyficzne mechanizmy obronne człowieka i zwierząt. Badania McCracken'a i współpracowników (1999) wykazały, że codzienne wzbogacenie diety o 10^9 – 10^{12} komórek bakterii probiotycznych już po kilku tygodniach może spowodować wzrost liczby komórek bójczych w surowicy krwi oraz zwiększyć aktywność makrofagów i limfocytów [61]. Dodatkowo, niektóre szczepy mogą indukować wytwarzanie cytokin, immunoglobulin, interferonu α i β (IFN- α , IFN- β) oraz czynnika martwicy nowotworu (TNF- α) [11].

Inne korzystne działania probiotyków potwierdzono w zapobieganiu i łagodzeniu biegunek bakteryjnych i wirusowych, leczeniu nawykowych zaparć i chorób zapalnych jelit, alergiach pokarmowych, nietolerancji laktozy, obniżaniu poziomu cholesterolu we krwi, zakażeniach układu moczowego, profilaktyce osteoporozy oraz leczeniu zaburzeń równowagi bioty jelitowej np. po kuracji antybiotykowej.

10. Podsumowanie

W ostatnich latach bardzo dużo uwagi poświęca się prozdrowotnym właściwościom niektórych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, które tradycyjnie stosowane są do produkcji żywności fermentowanej, tj. serów, jogurtów, fermentowanych kiełbas, kapusty kiszonej, wina czy piwa. Powszechnie wiadomo, że długotrwałe stosowanie antybiotyków prowadzi do zniszczenia naturalnej bioty jelitowej, kumulowania się

w organizmie szkodliwych substancji oraz powstawania antybiotykoopornych szczepów bakterii patogennych. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* mają zdolność do wytwarzania substancji działających antagonistycznie na szereg drobnoustrojów, w tym wiele gatunków chorobotwórczych. Najważniejsze z nich są bakteriocyny, które wytwarzane są przez większość szczepów z rodzaju *Lactobacillus*.

W związku z licznymi zagrożeniami wynikającymi z używania antybiotyków, Parlament Europejski wydał rozporządzenie na mocy którego z dniem 1 stycznia 2006 roku w krajach Unii Europejskiej wprowadzono całkowity zakaz stosowania antybiotyków paszowych w żywieniu zwierząt (Rozporządzenie nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt). Dlatego też alternatywą dla antybiotyków stosowanych jako dodatki do pasz zwierzęcych stały się preparaty probiotyczne, których efekty działania są zbliżone do efektów uzyskanych podczas stosowania antybiotyków jako dodatków paszowych. Jedne i drugie, mimo że ich mechanizm działania jest odmienny, są stymulatorami wzrostu i redukują liczbę bakterii chorobotwórczych. Jednakże w przypadku stosowania probiotyków nie występują efekty uboczne, nie są odkładane szkodliwe substancje, jak również nie istnieje niebezpieczeństwo ich przedawkowania. Dlatego z punktu widzenia zarówno konsumenta, jak i producenta żywności, jest to sposób na otrzymanie bezpiecznej żywności [31, 54].

Piśmiennictwo

1. Abee T., Krockel L., Hill C.: Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 169–185 (1995)
2. Aguirre M., Collins M.D.: Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 95–107 (1993)
3. Ahrné S., Molin G., Stahl S.: Plasmids in *Lactobacillus* isolated from meat and meat products. *Syst. Appl. Microbiol.* **11**, 320–325 (1989)
4. Allison G.E., Fremaux C., Klaenhammer T.R.: Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* **176**, 2235–2241 (1994)
5. Asaduzzaman S.M., Sonomoto K.: Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *J. Biosci. Bioeng.* **107**, 475–487 (2009)
6. Axelsson L.T., Ahrné S.E.I., Andersson M.C., Stahl S.R.: Identification and cloning of a plasmid-encoded erythromycin resistance determinant from *Lactobacillus reuteri*. *Plasmid*, **20**, 171–174 (1988)
7. Axelsson L.T., Holck A.: The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* **177**, 2125–2137 (1995)
8. Baele M., Vaneechoutte M., Verhelst R., Vancanneyt M., Devriese L.A., Haesebrouck F.: Identification of *Lactobacillus*

- species using tDNA-PCR. *J. Microbiol. Methods*, **50**, 263–271 (2002)
9. Bambirra F.H.S., Lima K.G.C., Franco B.D.G.M., Carmona D.C.M., Nardi R.M.D., Barbosa F.H.F., Nicoli J.R.: Protective effect of *Lactobacillus sakei* 2a against experimental challenge with *Listeria monocytogenes* in gnotobiotic mice. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 663–667 (2007)
 10. Barefoot S.F., Klaenhammer T.R.: Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1808–1815 (1983)
 11. Biniek M., Blaszczyk B., Kizerwetter-Świda M.: Badania ukierunkowane w zakresie regularnych gramdodatnich pałeczek, w: red. K. Malicki, M. Biniek: Zarys klinicznej bakteriologii weterynaryjnej. Wyd. SGGW, Warszawa 2004, s. 279–293
 12. Bringel F., Frey L., Hubert J.C.: Characterization, cloning, curing, and distribution in lactic acid bacteria of pLP1, a plasmid from *Lactobacillus plantarum* CCM 1904 and its use in shuttle vector construction. *Plasmid*, **22**, 193–202 (1989)
 13. Brogden K.A.: Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238–250 (2005)
 14. Brouqui P., Raoult D.: Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 177–207 (2001)
 15. Bukhtiyarova M., Yang R., Ray B.: Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3405–3408 (1994)
 16. Burns A.J., Rowland I.R.: Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **1**, 13–24 (2000)
 17. Chassy B.M., Gibson E., Giuffrida A.: Evidence for extrachromosomal elements in *Lactobacillus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1576–1578 (1976)
 18. Chassy B.M., Gibson E., Giuffrida A.: Evidence for plasmid-associated lactose metabolism in *Lactobacillus casei*. *Current Microbiol.* **1**, 141–144 (1978)
 19. Chevallier B., Hubert J.C., Kammerer B.: Determination of chromosome size and number of *rrn* loci in *Lactobacillus plantarum* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **120**, 51–56 (1994)
 20. Chin H.S., Shim J.S., Kim J.M., Yang R., Yoon S.S.: Detection and Antibacterial Activity of A Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Sci. Biotechnol.* **10**, 335–341 (2001)
 21. Cintas L.M., Casaus P., Fernández M.F., Hernández P.E.: Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* **15**, 289–298 (1998)
 22. Cintas L.M., Casaus P., Hlvarstein L.S., Hernández P.E., Nes I.F.: Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4321–4330 (1997)
 23. Daeschel M.A., Andersson R.E., Fleming H.P.: Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 357–367 (1987)
 24. de Carvalho K.G., Bambirra F.H.S., Kruger M.F., Barbosa M.S., Oliveira J.S., Santos A.M.C., Nicoli J.R., Bemquerer M.P., de Miranda A., Salvucci E.J., Sesma F.J.M., Franco B.D.G.M.: Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 381–390 (2010)
 25. Diep D.B., Håvarstein L.S., Nissen-Meyer J., Nes I.F.: The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 160–166 (1994)
 26. Dimov S., Ivanova N., Harizanova N.: Genetics of bacteriocins biosynthesis by lactic acid bacteria. *Biotechnol. & Bio-technol. Eq.* **19**, 4–10 (2005)
 27. Eschenbach D.A., Davick P.R., Williams B.L., Klebanoff S.J., Young-Smith K., Critchlow C.M., Holmes K.K.: Prevalence of Hydrogen Peroxide-Producing *Lactobacillus* Species in Normal Women and Women with Bacterial Vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 251–256 (1989)
 28. Euzéby J.P.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Lactobacillus*. Copyright © J.P. Euzéby. Internet: <http://www.bacterio.cict.fr/> (2008)
 29. Felis G.E., Dellaglio F.: Taxonomy of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* **8**, 44–61 (2007)
 30. Franz C.M.A.P., Worobo R.W., Quadri L.E.N., Schillinger U., Holzapfel W.H., Vederas J.C., Stiles M.E.: Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2170–2178 (1999)
 31. Fuller R.: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365–378 (1989)
 32. Gálvez A., Abriouel H., López R.L., Ben Omar N.: Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 51–70 (2007)
 33. Garrity M. Bergey's Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Second Edition, released 4.0 October 2003
 34. Gniazdowska D., Trojanowska K.: Bakteriocyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia*, **1**, 114–130 (2005)
 35. Goldin B.R., Gorbach S.L.: Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements and dimethylhydrazine. *Cancer*, **40**, 2421–2426 (1977)
 36. González B., Arca P., Mayo B., Suárez J.E.: Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2158–2163 (1994)
 37. Grela E.R., Semeniuk W.: Probiotics in animal production. *Med. Wet.* **55**, 222–228 (1999)
 38. Heng N.C., Burtenshaw G.A., Jack R.W., Tagg J.R.: Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7763–7766 (2007)
 39. Hill H.A., Hill J.E.: The value of plasmid profiling in monitoring *Lactobacillus plantarum* in silage fermentations. *Curr. Microbiol.* **13**, 91–94 (1986)
 40. Holo H., Nilssen O., Nes I.F.: Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* **173**, 3879–3887 (1991)
 41. Husni R.N., Gordon S.M., Washington J.A., Longworth D.L.: *Lactobacillus* bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 1048–1055 (1997)
 42. Jack R.W., Tagg J.R., Ray B.: Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. *Microbiol. Rev.* **6**, 171–200 (1995)
 43. Jiménez-Díaz R., Ríos-Sánchez R.M., Desmazeaud M., Ruiz-Barba J.L., Piard J.C.: Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1416–1424 (1993)
 44. Kanatani K., Tahara T., Yoshida K., Miura H., Sakamoto M., Oshimura M.: Plasmid-linked galactose utilization by *Lacto-*

- bacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 826–827 (1992)
45. Karakas Sen A., Narbad A., Horn N., Dodd H. M., Parr A.J., Colquhoun I., Gasson M. J.: Post-translational modification of nisin. The involvement of NisB in the dehydration process. *Eur. J. Biochem.* **261**, 524–532 (1999)
 46. Kiesau P., Eikmanns U., Gutowski-Eckel Z., Weber S., Hammelmann M., Entian K.-D.: Evidence for a multimeric subtilin synthetase complex. *J. Bacteriol.* **179**, 1475–1481 (1997)
 47. Klaenhammer T.R., Sutherland S.M.: Detection of plasmid deoxyribonucleic acid in an isolate of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 592–600 (1980)
 48. Klaenhammer T.R.: A general method for plasmid isolation in lactobacilli. *Curr. Microbiol.* **10**, 23–28 (1984)
 49. Klaenhammer T.R.: Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39–86 (1993)
 50. Klaenhammer T.R.: Genetics of *Lactobacilli*. *Int. Dairy Journal*, **5**, 1019–1058 (1995)
 51. Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Moleenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Turchini R., Peters S.A., Sandbrink H.M., Fiers M.W.E.J., Stiekema W., Lankhorst R.M., Bron P.A., Hoffer S.M., Groot M.N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de Vos W.M., Siezen R.J.: Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1990–1995 (2003)
 52. Klein C., Pack A., Bonaparte Ch., Reuter G.: Taxonomy and phylogeny of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41**, 103–125 (1998)
 53. Leer R.J., van Luijk N., Posno M., Pouwels P.H.: Structural and functional analysis of two cryptic plasmids from *Lactobacillus pentosus* MD353 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 265–274 (1992)
 54. Libudzisz Z., Śliżewska K., Biernasiak J.: Probiotics as alternative for antibiotics. *Chemia Spożywcza i Biotechnologia*, **984**, 79–91 (2006)
 55. Lilly D.M., Stillwell R.H.: Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, **147**, 747–748 (1965)
 56. Lin J.H.C., Savage D.C.: Cryptic plasmids in *Lactobacillus* strains isolated from the murine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1004–1006 (1985)
 57. Liu M.L., Kondo J.K., Barnes M.B., Bartholomeu D.T.: Plasmid-linked maltose utilization in *Lactobacillus* spp. *Biochimie*, **70**, 351–355 (1988)
 58. Lönner C., Preve-Akeson K., Ahrné O.: Plasmid contents of lactic acid bacteria isolated from different types of sour doughs. *Curr. Microbiol.* **20**, 201–207 (1990)
 59. Mayo B., Hardisson C., Brana A.F.: Selected characteristic of several strains of *Lactobacillus plantarum*. *Microbiologia*, **5**, 105–122 (1989)
 60. McAuliffe O., Ryan M.P., Ross R.P., Hill C., Breeuwer P., Abee T.: Lacticin 3147, a Broad-Spectrum Bacteriocin Which Selectively Dissipates the Membrane Potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 439–445 (1998)
 61. McCracken V.J., Gaskins H.R.: Probiotics and the immune system. [w:] Probiotics: a critical review. red. G. Tannock, Horizon Sci. Press 1999, s. 85–112
 62. Meyer C., Bierbaum G., Heidrich C., Reis M., Suling J., Iglesias-Wind M. I., Kempter C., Molitor E., Sahl H.-G.: Nucleotide sequence of the lantibiotic Pep5 biosynthetic gene cluster and functional analysis of PepP and PepC. Evidence for a role of PepC in thioether formation. *Eur. J. Biochem.* **232**, 478–489 (1995)
 63. Moll G.N., Konings W.N., Driessen A.J.M.: Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 185–198 (1999)
 64. Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakurai T., Takashi Y.: Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acids biosynthesis pathways. *J. Bacteriol.* **148**, 64–71 (1981)
 65. Muriana P., Klaenhammer T.R.: Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 553–560 (1987)
 66. Nes I.F., Diep D.B., Hlvarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V., Holo H.: Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 113–128 (1996)
 67. Nissen-Meyer J., Rogne P., Opegård C., Haugen H.S., Kristiansen P.E.: Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by grampositive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**, 19–37 (2009)
 68. O’Keeffe T., Hill C., Ross R.P.: Characterization and Heterologous Expression of the Genes Encoding Enterocin A Production, Immunity, and Regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1506–1515 (1999)
 69. Parente E., Ricciardi A.: Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 628–638 (1999)
 70. Piard J.C., Muriana P.M., Desmazeaud M.J., Klaenhammer T.R.: Purification and Partial Characterization of Lacticin 481, a Lanthionine-Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 279–284 (1992)
 71. Pot B., Ludwig W., Kersters K., Schleifer K.-H.: Taxonomy of lactic acid bacteria. In: L. de Vuyst and E. J. Vandamme (ed.), Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, genetics and applications. Blackie Academic and Professional, London 1994, s. 13–90
 72. Pouwels P.H., Leer R.J.: Genetics of lactobacilli: plasmids and gene expression. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**, 85–107 (1993)
 73. Qi F., Chen P., Caufield P. W.: Functional Analyses of the Promoters in the Lantibiotic Mutacin II Biosynthetic Locus in *Streptococcus* mutans. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 652–658 (1999)
 74. Qi F., Chen P., Caufield P. W.: Purification of Mutacin III from Group III *Streptococcus* mutans UA787 and Genetic Analyses of Mutacin III Biosynthesis Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3880–3887 (1999)
 75. Quadri L.E., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C., Stiles M.E.: Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* **269**, 12204–12211 (1994)
 76. Reddy G.V., Shahani K.M., Banerjee M.R.: Inhibitory effect of the yoghurt on Ehrlich ascites tumor cell proliferation. *J. Nat. Cancer Inst.* **50**, 815–817 (1973)
 77. Reid G.: The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3763–3766 (1999)
 78. Ross K.F., Ronson C.W., Tagg J.R.: Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene salA from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2014–2021 (1993)
 79. Roussell Y., Colmin C., Simonet J.M., Decaris B.: Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Mocoquot). *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 549–556 (1993)

80. Rowland I.R., Grasso P.: Degradation of Nitrosamine by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* **29**, 7–12 (1975)
81. Ruiz-Barba J.L., Piarg J.C., Jiménez-Díaz R.: Plasmid profiles and curing on plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 417–421 (1991)
82. Ryan M.P., Jack R.W., Josten M., Sahl H.G., Jung G., Ross R.P., Hill C.: Extensive post-translational modification, including serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lactacin 3147. *J. Biol. Chem.* **274**, 37544–37550 (1999)
83. Sand S.L., Haug T.M., Nissen-Meyer J., Sand O.: The Bacterial Peptide Pheromone Plantaricin A Permeabilizes Cancerous, but not Normal, Rat Pituitary Cells and Differentiates between the Outer and Inner Membrane Leaflet. *J. Membrane Biol.* **216**, 61–71 (2007)
84. Savadogo A., Ouattara C.A.T., Bassole I.H., Traore S.A.: Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *Afr. J. Biotechnol.* **5**, 678–683 (2006)
85. Schleifer K.H., Ludwig W.: Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 461–467 (1995)
86. Schrezenmeier J., de Vrese M.: Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 361S–364S (2001)
87. Shay B.J., Egan A., Wright M., Rogers P.: Cysteine metabolism in an isolate of *Lactobacillus sake*: plasmid composition and cysteine transport. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**, 183–188 (1988)
88. Siegers K., Heinzmann S., Entian K.-D.: Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. *J. Biol. Chem.* **271**, 12294–12301 (1996)
89. Sinha R.P.: Plasmid instability in *Lactobacillus plantarum* strain caTC2. *Curr. Microbiol.* **25**, 219–223 (1992)
90. Sinha R.P.: Stability of plasmid in *Lactobacillus plantarum* caTC2R as affected by carbohydrate metabolism. *J. Dairy Sci.* **74**, 124 (1991)
91. Sinha R.P.: Toxicity of organic acids for repair – deficient strain of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1364–1366 (1986)
92. Skaugen, M., Abildgaard C.I., Nes I.F.: Organization and expression of a gene cluster involved in the biosynthesis of the lantibiotic lactocin S. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 674–686 (1997)
93. Smiley M.B., Fryder V.: Plasmids, lactic acid production, and N-acetyl-D-glucosamine fermentation in *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 777–781 (1978)
94. Spicher G., Lönner C.: Die Mikroflora des Sauerteiges XXI. die in Sauerteigen schwedischer Bäckereien vorkommenden Lactobacillen. *Zu Lebensm. unters. Forsch.* **181**, 9–13 (1985)
95. Stiles M.E., Holzapfel W.H.: Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**, 1–29 (1997)
96. Tahara T., Oshimura M., Umezawa C., Kanatani K.: Isolation, partial characterization, and mode of action of Acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 892–897 (1996)
97. Uguen P., Le Pennec J.P., Dufour A.: Lantibiotic Biosynthesis: Interactions between Prelactacin 481 and Its Putative Modification Enzyme, LctM. *J. Bacteriol.* **182**, 5262–5266 (2000)
98. Van Kraaij C., de Vos W.M., Siezen R.J., Kuipers O.P.: Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and application. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 575–587 (1999)
99. Von Husby K.O., Nes I.F.: Changes in the plasmid profile of *Lactobacillus plantarum* obtained from commercial meat starter cultures. *J. Appl. Bacteriol.* **60**, 413–417 (1986)
100. Wang T.T., Lee B.H.: Plasmids in *Lactobacillus*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**, 227–272 (1997)
101. Włodarczyk M.: Plazmidy bakteryjne, w: red. J. Baj, Z. Markiewicz: *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2006, s. 366–368
102. Worobo R.W., van Belkum M.J., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C., Stiles M.E.: A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* **177**, 3143–149 (1995)