



Biochemiczna i molekularna charakterystyka bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Propionibacterium*

Daniela Gwiazdowska
Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Uniwersytet Ekonomiczny,
Poznań

Biochemical and molecular characteristics of bacteriocins produced by *Propionibacterium*

Summary

Bacteriocins are antimicrobial proteins or peptides produced by both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Many of these metabolites are active towards closely related species, but some of them are able to inhibit bacteria not related with bacteriocin producer, including food pathogens such as *Listeria monocytogenes* or *Clostridium botulinum*. The most studied bacteriocins are those produced by lactic acid bacteria, but an increased interest in bacteriocins synthesized by propionibacteria has been observed in the last years. In this paper, the data on molecular characteristics and biochemical properties of actually known bacteriocins produced by this group of bacteria are presented.

Key words:

bacteriocins, *Propionibacterium*, activity spectrum, biosynthesis, antimicrobial activity.

Adres do korespondencji

Daniela Gwiazdowska,
Katedra Biochemii
i Mikrobiologii,
Uniwersytet Ekonomiczny,
al. Niepodległości 10,
61-875 Poznań.

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania konsumentów żywnością mało przetworzoną i pozbawioną konserwantów. Tendencja ta spowodowała rozwój badań nad biologicznymi metodami utrwalania żywności i metabolitami, które stanowiłyby alternatywę dla chemicznych związków konserwu-

jących. Jednym z możliwych rozwiązań jest wprowadzenie do żywności bakteriocyn lub kultur bakteriocynogennych (1).

Bakteriocyny są przeciwdrobnoustrojowymi peptydami lub białkami wytwarzanymi przez bakterie gramododatnie i gramujemne. Stanowią grupę związków zróżnicowanych pod względem wielkości cząsteczki i struktury pierwszorzędowej. Skład aminokwasowy i struktura cząsteczki bakteriocyny decyduje o jej aktywności, sposobie działania, a także jej stabilności. Większość bakteriocyn to związki o małej masie cząsteczkowej, amfifilowe lub hydrofobowe o charakterze kationowym (2,3).

Większość bakteriocyn ma wąski zakres aktywności, ograniczony do blisko spokrewnionych gatunków. Niektóre są jednak bakteriobójcze, bakteriostatyczne lub fungistatyczne wobec mikroorganizmów niespokrewnionych z producentem, w tym patogennych, co zwiększa możliwość ich praktycznego zastosowania. Pod względem strukturalnym i funkcjonalnym bakteriocyny wykazują szereg podobieństw do peptydów wytwarzanych przez inne organizmy żywe, m.in. rośliny, owady, ptaki czy ssaki. Od peptydów eukariotycznych różnią się węższym zazwyczaj zakresem aktywności przeciwdrobnoustrojowej, ale jednocześnie silniejszym oddziaływaniem względem wrażliwych mikroorganizmów. W porównaniu z bakteriocynami dawka aktywna peptydów eukariotycznych jest zwykle kilkakrotnie wyższa (1).

Bakteriocyny są uważane za substancje nietoksyczne dla człowieka. Jako związki o charakterze białkowym są wrażliwe na działanie enzymów trawiennych, takich jak pepsyna czy trypsyna, co sprawia, że ulegają rozkładowi w przewodzie pokarmowym. Ich zaletą jest również brak oddziaływania na właściwości organoleptyczne i sensoryczne produktu, do którego zostaną wprowadzone (4,5). Jednak zastosowanie bakteriocyn jako biokonserwantów na skalę przemysłową wymaga poznania cech takich jak: struktura, mechanizm działania czy stabilność, a także ich legalizacji jako dodatków do żywności. Z ekonomicznego punktu widzenia ważna jest również optymalizacja warunków wytwarzania bakteriocyn. Tylko dwie, jak dotąd bakteriocyny produkowane są komercyjnie: nizyna wytwarzana przez *Lactococcus lactis* (m.in. w postaci preparatu Nisaplin™ firmy Danisco z Danii) oraz pediocyna PA-1, której producentem jest *Pediococcus acidilactici* (preparat ALTA™ 2431 firmy Kerry Bioscience z Irlandii) (6).

W ciągu dwóch ostatnich dziesięcioleci bakteriocyny były przedmiotem wielu badań. W opublikowanych wcześniej pracach przedstawiono ogólną charakterystykę tych związków, ich klasyfikację i właściwości (7), a także strukturę i mechanizm działania (8). Praca ta dotyczy wybranej grupy tych metabolitów, a mianowicie bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie fermentacji propionowej. W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój badań nad zdolnością tych mikroorganizmów do wytwarzania bakteriocyn (9-12). Bakterie propionowe, podobnie jak mlekowe, należą do mikroorganizmów od lat stosowanych w produkcji żywności i posiadających status GRAS (ang. *Generally Recognized As Safe*), co zwiększa zainteresowanie nimi jako potencjalnymi producentami związków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

2. Bakteriocyny wytwarzane przez bakterie fermentacji propionowej

Bakterie z rodzaju *Propionibacterium*, wyizolowane w 1909 r. przez von Freudenreicha i opisane przez Orla-Jensena i van Niela, są zaliczane do klasy *Actinobacteria*. W zależności od środowiska bytowania podzielono je na dwie grupy: klasyczne, zwane również „mleczarskimi” (*dairy propionibacteria*) oraz szczepy skórne. Szczepy klasyczne tworzą dwie grupy filogenetyczne, z których pierwsza obejmuje gatunki: *P. acidipropionici*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, a druga podgatunki w obrębie gatunku *P. freudenreichii* i wyizolowany z soku pomarańczowego *P. cyclohexanicum* (13). Występują w serach, produktach mlecznych oraz innych produktach naturalnej fermentacji, np. kiszonych, fermentowanych oliwkach. Niektóre gatunki bytują również w żwaczku i przewodzie pokarmowym przeżuwaczy m.in. bydła i owiec (14).

Skórne szczepy bakterii propionowych, zaliczane do gatunków: *P. granulosum*, *P. acnes*, *P. avidum*, *P. propionicum* i *P. lymphophilum* należą do mikroorganizmów patogennych i występują głównie na ludzkiej skórze (15).

Bakteriocyny wytwarzane przez rodzaj *Propionibacterium* stanowią stosunkowo mało poznaną grupę tych metabolitów. Jednakże w pojawiających się w ostatnich latach pracach dowodzi się, że niektóre z nich charakteryzują się szerokim zakresem aktywności przeciwdrobnoustrojowej (16,17), co umożliwia ich praktyczne zastosowanie w konserwacji żywności bądź w przemyśle farmaceutycznym, przez co zainteresowanie tą grupą bakteriocyn wzrosło. Do tej pory poznano sekwencję aminokwasową i nukleotydową tylko kilku bakteriocyn bakterii propionowych (9,10,12, 17,18), co w porównaniu z bakteriocynami syntezowanymi przez bakterie fermentacji mlekowej stanowi tylko znikomy procent.

Zdolność do produkcji bakteriocyn wykazują zarówno klasyczne jak i skórne szczepy bakterii propionowych. Al-Zoreky (19) wykazał, że Microgard, produkt powstały na drodze fermentacji odtłuszczonego mleka przez *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, wykazuje antagonistyczny efekt wobec bakterii gramujemnych i niektórych drożdży i pleśni. Produkt ten został zaaprobowany przez Komisję Żywności i Leków FDA i jest obecnie używany jako konserwant serów typu „cottage” produkowanych w USA. W działaniu Microgardu, równoległe z działaniem kwasu propionowego, uczestniczy peptyd o masie cząsteczkowej 700 Da, jednak nie potwierdzono dotąd jednoznacznie, że czynnikiem aktywnym jest bakteriocyna (20).

Do tej pory scharakteryzowano zaledwie kilka bakteriocyn wytwarzanych przez klasyczne szczepy bakterii z rodzaju *Propionibacterium* (tab. 1). Większość z nich jest syntetyzowana przez gatunek *P. thoenii* (9,16,18,20), dwie przez *P. jensenii* (8,20), a tylko jedna przez *P. freudenreichii* (12). Skórne szczepy *P. acnes* są producentami substancji bakteriocynopodobnych. Fujimura i Nakamura (23) opisali aknecynę, wytwarzaną przez *P. acnes* CN-8, białko o masie molekularnej 60 000 Da, złożone z pięciu podjednostek o wielkości 12 000 Da. Aknecyna wykazuje działanie bakteriostatyczne wobec szczepów *P. acnes* nie produkujących aknecyny oraz *Corynebacterium parvum*. Paul i Booth (24) zidentyfikowali inne antybakteryjne białko produkowane

przez *P. acnes* RTT 108, które także jest dużym białkiem, o masie molekularnej 78 000 Da i działa bakteriostatycznie. Jego zakres aktywności jest jednak szerszy i obejmuje bakterie gramodatnie i gramujemne.

Tabela 1

Bakteriocyny wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Propionibacterium*

Bakteriocyna	Producent	Literatura
propionicyna PLG-1	<i>Propionibacterium thoenii</i> P127	(16)
propionicyna GBZ-1	<i>Propionibacterium thoenii</i> P127	(18)
propionicyna T1	<i>Propionibacterium thoenii</i> 419 i LMG 2792	(9)
propionicyna F	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	(12)
propionicyna SM1	<i>Propionibacterium jensenii</i> DF1	(10)
thoenicyna 447	<i>Propionibacterium thoenii</i> 447	(17)
jensenina G	<i>Propionibacterium thoenii (jensenii)</i> P126	(20)
jensenina P	<i>Propionibacterium jensenii</i> B1264	(22)
PAMP	<i>Propionibacterium jensenii</i>	(21)

Szczególnym rodzajem aktywnych białek, jakie scharakteryzowano w grupie metabolitów wytwarzanych przez *Propionibacterium* są peptydy aktywowane przez proteazy tzw. białka PAMP (21). Nazwa PAMP oznacza przeciwdrobnoustrojowe białko aktywowane enzymatycznie (ang. *Protease-Activated Antimicrobial Peptides*). Nazwa ta została zaproponowana przez Faye i in. (21) dla białek bakteriocynopodobnych, które są wydzielane z komórki w postaci nieaktywnej i aktywowane proteolitycznie przez proteazy obecne w środowisku. Jednak po raz pierwszy taki rodzaj bakteriocyn opisali Ratnam i in. (22). Stwierdzili oni nietypowy sposób działania aktywnych związków produkowanych przez szczepy *P. jensenii* B1264, *P. jensenii* 4868 i *P. freudenreichii* 6207 rosnące na agarze mleczanowo-sodowym. Szczepy hodowano na podłożu przez 5 dni w atmosferze beztlenowej, a następnie zalewano warstwą pożywki zawierającą szczep wskaźnikowy *Lactococcus lactis* C2. Tuż przed zalaniem w pobliżu wyrosniętych kolonii nanoszono enzymy proteolityczne. Aplikacja pronazy E i proteinazy typu XIV obok kultury *P. jensenii* B1264 wywołała strefę hamowania w kształcie półksiężyca w miejscach naniesienia i rozszerzyła spektrum inhibicji. Bez dodatku enzymów obserwowano aktywność *P. jensenii* B1264 w stosunku do bakterii propionowych i *Lactobacillus delbrueckii*, a po działaniu enzymów zakres aktywności obejmował również *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2, *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 i *Lb. plantarum* PI 549. Podobnie było w przypadku kultur *P. jensenii* ATCC 4868 i *P. freudenreichii* 6207, które w obecności proteaz hamowały szczepy z rodzaju *Lactobacillus*, podczas gdy wcześniej wykazywały aktywność wyłącznie wobec bakterii propionowych. Kiedy enzymy dodawano do substancji bakteriocynowych w roztworze wzrost aktywności miał miejsce, kiedy łączono je z proteazą tuż

przed nałożeniem na agarową warstwę wskaźnika. Dłuższe traktowanie aktywnych związków enzymem proteolitycznym, powyżej 2 minut, całkowicie niszczyło aktywność.

Faye i in. (21), wykorzystując wcześniejsze obserwacje, scharakteryzowali PAMP wytwarzane przez *P. jensenii* LMG 3032 i *P. jensenii* ATCC 4868. 5-dniowe kolonie wymienionych szczepów nie wykazywały antagonistycznej aktywności względem bakterii propionowych ani mlekowych. Dopiero, kiedy dodano proteinazę K w pobliżu kolonii przed zalaniem ich podłożem zawierającym szczep wskaźnikowy, pojawiała się strefa hamowania wzrostu. Podobne rezultaty uzyskano stosując trypsynę, proteinazę A, proteinazę P-5147 (pronazę), proteinazę P-5380 (subtilizynę), chymotrypsynę i reninę. We wszystkich przypadkach dodatek enzymu przekraczający ilość 100 µg/ml powodował zanik aktywności czynnika aktywnego.

2. Biosynteza i izolacja bakteriocyn z hodowli

Zasadniczym problemem dotyczącym wytwarzania bakteriocyn przez bakterie fermentacji propionowej jest ich niska aktywność przeciwdrobnoustrojowa w środowisku hodowlanym. Stąd niezwykle ważna jest zarówno optymalizacja warunków ich biosyntezy jak również opracowanie dobrych metod separacji i zagęszczania tych związków.

Pierwszą bakteriocyną wyizolowaną z hodowli bakterii propionowych była propionicyna PLG-1, syntetyzowana przez *Propionibacterium thoenii* P127. Aktywność antybakteryjną szczepu P127 obserwowano dopiero po 24 godzinach hodowli na podłożu zestalonym, przy czym po około 140 godzinach hodowli aktywność osiągała maksymalną wartość. Próby wyizolowania propionicyny z agaru z mleczanem sodu (NLA) wykazały niską koncentrację bakteriocyny, która była najprawdopodobniej związana z białkowymi składnikami podłoża (16). W hodowli płynnej, w bulionie z mleczanem sodu (NLB), aktywność antybakteryjną wykrywano w supernatantach otrzymanych z hodowli wzrastających do późnostacjonarnej fazy, również na niskim poziomie. Zastosowanie metody pozyskiwania tzw. częściowo oczyszczonej bakteriocyny na drodze wysalania siarczanem amonu i dializy pozwoliło około 600-krotnie zatężyć bakteriocynę, przez co aktywność antybakteryjna preparatu zawierającego aktywne białko wzrosła z 0,64 AU (*activity unit*)/ml do 388 AU/ml (25).

Wykrycie propionicyny PLG-1 zaowocowało odkryciem kolejnych bakteriocyn, jednak we wszystkich przypadkach konieczne okazało się zagęszczanie płynów pohodowlanych w celu wykrycia ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Na przykład jensenina G jest wykrywana zwykle w 50-krotnie skoncentrowanej 10-dobowej hodowli producenta w niskich stężeniach na poziomie 32-64 AU/ml (26). Jensenina P jest wykrywana w 20- do 50-krotnie zagęszczonym supernatancie (22), a wykrycie thoenicyny 447 wymaga 10-krotnego zatężenia płynu pohodowlanego (17).

Większość poznanych bakteriocyn bakterii propionowych jest wykrywana w fazie stacjonarnej, co jest charakterystyczne dla metabolitów wtórnych. Dotyczy to m.in. propionicyny PLG-1, jenseniny G, propionicyny F, propionicyny T1 (9,12,26, 27). W kilku przypadkach aktywność przeciwdrobnoustrojową stwierdzano jednak już w fazie logarytmicznej. Przykładem jest propionicyna T1, wytwarzana przez dwa szczepy: *P. thoenii* 419 i *P. thoenii* LMG 2792, pomiędzy którymi występują znaczne różnice w odniesieniu do jej produkcji. Podczas gdy *P. thoenii* 419 wytwarza bakteriocynę w późnej fazie logarytmicznej, produkcja bakteriocyny przez *P. thoenii* LMG 2792 wykrywana jest dopiero w późnej fazie stacjonarnej (po 120 godzinach). Może to wskazywać na fakt, że bakteriocyny są wytwarzane przez bakterie propionowe już w fazie logarytmicznej, jednak dopiero ich nagromadzenie w fazie stacjonarnej pozwala na wykrycie ich aktywności. Niektórzy autorzy wskazują również na możliwość aktywacji białek w fazie stacjonarnej, stąd ujawnienie aktywności w tej fazie. Przykładem są tu peptydy aktywowane enzymatycznie – białka PAMP, których aktywność wykrywano w fazie logarytmicznej tylko po aktywacji przez enzymy proteolityczne. Jednakże większość typowych bakteriocyn wytwarzanych jest w postaci prekursorów peptydowych, które ulegają następnie modyfikacji potranslacyjnej wewnątrz komórki bądź podczas transportu białka na zewnątrz przekształcają się w formę aktywną biologicznie (28).

Wcześniej wspomniano już, że efektywna produkcja bakteriocyn wymaga optymalizacji warunków biosyntezy, uwzględniając takie czynniki jak: skład i konsystencja podłoża, pH i temperatura hodowli (29-32).

Najczęściej jako podłoże do biosyntezy bakteriocyn stosowano bulion z mleczanem sodu, który jest podłożem stosunkowo prostym i ubogim w składniki odżywcze. Efektywność procesu biosyntezy można podnieść nawet kilkakrotnie poprzez stosowanie złożonych pożywek, takich jak MRS (12) czy podłoże z melasą buraczaną i namokiem kukurydzianym (33). Proces wytwarzania bakteriocyny może zależeć także od konsystencji podłoża. Ben-Shushan i in. (18) porównując poziom produkcji propionicyny PLG-1 i propionicyny GBZ-1 w hodowli *P. thoenii* P127 w zależności od konsystencji podłoża stwierdzili, że na podłożu płynnym propionicyna PLG-1 była wytwarzana w większych ilościach niż propionicyna GBZ-1, natomiast na podłożu półpłynnym zarówno GBZ-1 jak i PLG-1 były syntetyzowane w ilościach porównywalnych.

Istotnymi parametrami wpływającymi na biosyntezę bakteriocyn są także czynniki, takie jak pH i temperatura hodowli. W przypadku bakterii propionowych z reguły optymalne pH dla produkcji bakteriocyn pokrywa się z pH optymalnym dla wzrostu producenta i wynosi około 7,0. Wpływ pH na proces biosyntezy bakteriocyny wykazano m.in. dla propionicyny PLG-1 (27) i jenseniny G (26). W przypadku pierwszej proces biosyntezy przebiegał najintensywniej w hodowli z regulacją pH na poziomie 7,0, a w przypadku drugiej optymalne okazało się nieco niższe pH, na poziomie 6,4 (26,27). Wpływ temperatury na wydajność biosyntezy bakteriocyn opisano tylko w jednym przypadku. Faye i in. (9) zaobserwowali, że dwa szczepy będące producen-

tami tej samej bakteriocyny, propionicy T1, wytwarzały ją w różnej temperaturze. W przypadku szczepu LMG 2792 optymalna okazała się temperatura 22°C, a w przypadku szczepu 419 temperatura 30°C. W większości prac stosowana jest jednak temperatura optymalna dla wzrostu bakterii propionowych, czyli 30-32°C.

3. Właściwości bakteriocyn

Pomimo że liczba scharakteryzowanych dotąd bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie fermentacji propionowej jest niewielka, w dotychczasowych badaniach wskazuje się, iż jest to zróżnicowana grupa metabolitów. Dotyczy to zarówno ich wielkości, budowy cząsteczki, jak i właściwości biochemicznych (tab. 2).

Tabela 2

Właściwości fizykochemiczne poznanych bakteriocyn wytwarzanych przez *Propionibacterium*

Bakteriocyna	Masa cząsteczkowa (Da)	pI	Czynniki nie powodujące utraty aktywności	Enzymy inaktywujące	Literatura
propionicyna PLG-1	9328	bd	zakres pH 3-9 temp. 80°C poniżej 15 minut	proteaza, pronaza E, pepsyna, trypsyna, α-chymotrypsyna	(34,16)
propionicyna T1	7130,20	9,5	pH powyżej 2,5 temp. 60-100°C poniżej 15 minut	proteinaza K	(9)
propionicyna F	4397	4,0		proteinaza K	(12)
propionicyna GBZ-1	około 6000	bd	zakres pH 5,5-8,5	trypsyna, chymotrypsyna	(18)
thoenicyna 447	7130	bd	zakres pH 1-10 temp. 100°C przez 15 minut	proteinaza K, pronaza, pepsyna, trypsyna, α-chymotrypsyna	(17)
propionicyna SM1	19942	8,14	bd	bd	(10)
jensenina G	powyżej 12 000		temp. 100°C przez 2 minuty	proteinaza K, pronaza E, proteaza	(20)
jensenina P	szacowana na 6000-9000	3-3,5	zakres pH 3-12 temp. 100°C przez 60 minut	bd	(22)
białko PAMP	6383	8,12	bd	w stężeniu powyżej 100 µg/ml: proteinaza K, trypsyna, proteinaza A, proteinaza P-5147, proteinaza P-5380, chymotrypsyna, renina	(21)

pI – punkt izoelektryczny

bd – brak danych

Większość bakteriocyn z tej grupy należy do białek niskocząsteczkowych, ich masa molekularna nie przekracza 10 000 Da. Wyjątek wśród poznanych bakteriocyn stanowi propionicyna SM1, której masa wynosi prawie 20 000 Da i jest ona, jak dotąd, największą poznaną bakteriocyną bakterii propionowych. Wielkość cząsteczki jenseniny G oszacowano wstępnie na przekraczającą 12 000 Da, co mogłoby wskazywać, że również to białko należy do bakteriocyn wysokocząsteczkowych. Ustalenia te opierały się na fakcie stwierdzenia aktywności antybakteryjnej we frakcji pozostającej w woreczku dializacyjnym o porach wielkości 12 000 Da. W przypadku tego rodzaju metabolitów pojawiają się jednak wątpliwości, czy białka nie ulegają agregacji, stąd też taki sposób oceny masy cząsteczkowej nie jest wystarczająco wiarygodny. Przykładowo, propionicyna PLG-1 w preparatach częściowo oczyszczonych, czyli po wysalaniu i dializie, występuje w postaci małych cząsteczek o masie około 10 000 Da oraz w postaci agregatów o wielkości 100 000 Da (16).

Wszystkie bakteriocyny są wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych (tab. 2), co potwierdza białkowy charakter cząsteczki. Tylko w przypadku białka PAMP aktywność zanika pod warunkiem zastosowania enzymów proteolitycznych w odpowiednio wysokim stężeniu. Niskie stężenie niektórych enzymów sprzyja przekształceniu nieaktywnej formy białka w cząsteczkę aktywną biologicznie.

Podobnie, jak wiele innych bakteriocyn, aktywne białka wytwarzane przez *Propionibacterium* mają zazwyczaj charakter kationowy, a ich punkt izoelektryczny kształtuje się na poziomie od 8 do 9,5. Odmienny charakter wykazuje propionicyna F i jensenina P, dla których pI ustalono w granicach od 3 do 4.

Z reguły bakteriocyny wykazują dużą stabilność w szerokim zakresie pH. Ich aktywność antybakteryjna nie zanika w środowiskach kwaśnych, w pH około 3, jak również przy wartościach przekraczających pH neutralne. Taka stabilność może być użyteczna z punktu widzenia ewentualnego zastosowania aktywnych białek do konserwacji żywności. Kolejną, istotną z punktu widzenia aplikacji cechą bakteriocyn, jest ich termostabilność. Większość poznanych i scharakteryzowanych bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie propionowe nie traci aktywności nawet w wyniku kilku- lub kilkunastominutowego ogrzewania w temperaturze 100°C. Przykładowo, aktywność thoenicyny 447 pozostawała stała podczas 15-minutowego ogrzewania w temperaturze 100°C, dopiero w temperaturze 121°C obserwowano 80% spadek aktywności. Aktywność antybakteryjna jenseniny G pozostała natomiast niezmienną po ogrzaniu bakteriocyny w 100°C przez 2 minuty, dopiero dłuższe ogrzewanie (5, 10, 15 minut) w tej samej temperaturze ograniczało jej aktywność, ale nie powodowało całkowitego jej zaniku (20). Aktywność częściowo oczyszczonej jenseniny P nie uległa zmianie nawet po 60-minutowym ogrzewaniu w temperaturze 100°C. Wrażliwa na wysoką temperaturę była natomiast propionicyna PLG-1, która traciła swoje przeciwdrobnoustrojowe właściwości już po piętnastu minutach ogrzewania w temperaturze 80°C (16).

Bakteriocyny jako substancje o charakterze białkowym, mogą wykazywać zróżnicowaną wrażliwość na działanie różnych związków organicznych, rozpuszczalni-

ków czy jonów metali. Jensenina P okazała się stabilna w roztworach zawierających 0,1-1,0 mol/l NaCl, 0,1-2,0% SDS, 4 mol/l mocznika oraz w obecności organicznych rozpuszczalników (tj. metanol, etanol, izopropanol) stosowanych w stężeniu 0-50% (22). W przypadku propionicyny GBZ-1 zaobserwowano negatywny wpływ obecności jonów magnezu w postaci $MgCl_2$ na aktywność bakteriocyny. Podczas gdy sama bakteriocyna redukowała liczbę komórek szczepu wskaźnikowego niemal pięciokrotnie w stosunku do liczebności wyjściowej, dodatek 50 mM $MgCl_2$ powodował praktycznie zanik aktywności propionicyny GBZ-1. Jony magnezu dodawane w postaci $MgSO_4$ miały natomiast zdecydowanie mniejszy wpływ na aktywność antagonisticzną (18).

Propionicyna PLG-1 jest stabilna podczas długotrwałego przechowywania. Najbardziej stabilne są preparaty liofilizowane, które nie tracą aktywności przez 25 tygodni w temperaturach: 4°C, 25°C i -20°C. Podczas przechowywania nieliofilizowanych preparatów propionicyny w temperaturze 25°C zaobserwowano natomiast wzrost aktywności. Aktywność antibakteryjna preparatów nieliofilizowanych tej bakteriocyny zwiększyła się ponad 200% w ciągu pierwszych 10 dni przechowywania, po czym obserwowano stopniowy spadek aktywności przez kolejne 12-18 tygodni. Te same preparaty przechowywane w 4°C zachowywały stałą, wysoką aktywność przez 12 tygodni. Nawet po 20 tygodniach, ich aktywność była wciąż wysoka i bliska wyjściowego poziomu (33). Podobną stabilność wykazywała propionicyna T1, w przypadku której zamrażanie, rozmrażanie oraz przechowywanie w temperaturze 4°C i -20°C nie wpłynęło na aktywność.

4. Charakterystyka molekularna bakteriocyn

Niewiele bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie fermentacji propionowej scharakteryzowano pod względem struktury cząsteczki i budowy genu. Jednak opisana do tej pory grupa pozwala zauważyć znaczne zróżnicowanie tych białek, zarówno biorąc pod uwagę wielkość cząsteczki, sekwencję aminokwasów, jak i proces przekształcania w postać aktywną i transport na zewnątrz komórki. Prawdopodobnie ma to również znaczenie dla mechanizmu ich przeciwdrobnoustrojowego oddziaływania, jednak brak jest danych w literaturze na ten temat.

Pierwszą bakteriocyną bakterii propionowych, która została w pełni scharakteryzowana na poziomie molekularnym była propionicyna T1, posiadająca kilka cech typowych dla większości bakteriocyn bakterii mlekowych. Bakteriocyna ta powstaje jako prebakteriocyna złożona z 96 aminokwasów, która ulega następnie modyfikacji potranslacyjnej, dając ostatecznie 65-aminokwasową bakteriocynę. Prekursor zawiera peptyd liderowy na końcu aminowym, posiadający cechy typowe dla peptydów sygnalnych białek wydzielanych drogą zależną od białek *sec* (37), tj. dodatnio naładowany koniec aminowy, naturę hydrofobową oraz specyficzny region odcięcia, który przypada za sekwencją Ala-Met-Ala. W odległości 68 nukleotydów poniżej ko-

donu stop genu strukturalnego propionicyny T1 *pctA* zlokalizowano region, kodujący białko złożone z 424 aminokwasów o masie molekularnej 45163,95 Da. Aminowy koniec tego białka wykazuje duże podobieństwo do prokariotycznych struktur wiążących ATP i eukariotycznych transporterów ABC. Ponieważ powyżej kodonu startowego tego białka zidentyfikowano potencjalne miejsce wiązania rybosomu, ale nie znaleziono promotora, gen kodujący opisywane białko może być częścią operonu propionicyny T1. Domeny hydrolizujące ATP wchodzące w skład transporterów klasy ABC są charakteryzowane na podstawie trzech typowych sekwencji, które znaleziono również w sekwencji kodującej omawiane białko. Sekwencja aminokwasowa wskazuje, że białko to jest zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej, a jego strukturalną częścią są cztery potencjalnie transbłonowe helisy i koniec aminowy wiążący ATP, zlokalizowany po stronie cytoplazmatycznej. Nie jest jednak prawdopodobne, aby transporter ABC był związany z regularnym transportem bakteriocyny na zewnątrz komórki, ponieważ bakteriocyna wykazuje cechy białek wydzielanych podstawową drogą sekrecji. Lokalizacja genu sugeruje z kolei, że koduje on czynnik odporności. Tak zatem domniemany transporter może być związany z odpornością producenta na propionicynę T1, ponieważ kodujący opisywane białko region jest prawdopodobnie transkrypcyjnie dołączony do genu strukturalnego bakteriocyny. Odporność może być wyrażona przez transport aktywny bakteriocyny na zewnątrz komórki lub przez import i degradację bakteriocyny wewnątrz komórki (9). Transportery ABC zostały zidentyfikowane jako związane z własną ochroną producenta przed nizyną (38), subtilizyną (39) i laktyciną 481 (40).

Bakteriocyną o sekwencji w pełni homologicznej do propionicyny T1 jest thoenicyna 447, wytwarzana przez *Propionibacterium thoenii* 447. Jest to małe białko złożone z 65 aminokwasów w postaci dojrzałej. Bakteriocyna ta nie została oczyszczona do homogenności, jednak na bazie sekwencji nukleotydowej ustalono masę cząsteczkową na 7130 Da oraz sekwencję aminokwasową. Pomimo homologii do propionicyny T1, ustalono, że pomiędzy szczepami wytwarzającymi obie opisane bakteriocyny występują różnice fenotypowe, spowodowane najprawdopodobniej faktem, że *P. thoenii* 447 należy do odrębnej gałęzi rybotypowej (47,48). Dla szczepów zaklasyfikowanych jako *P. thoenii* zidentyfikowano cztery profile rybotypowe (rybotyp M-P). Szczep 447 należy do rybotypu N, natomiast 419 do rybotypu P. Skład aminokwasów thoenicyny 447 zawiera typowy wzór peptydu sygnałowego, tzn. dodatkowo naładowany koniec aminowy, centralny region hydrofobowy oraz specyficzny region odcięcia (49).

Pełną sekwencję białka, jak również genu, poznano w przypadku propionicyny F, najmniejszej z poznanych dotąd bakteriocyn bakterii propionowych. Jest to zarazem pierwsza bakteriocyna wyizolowana z hodowli dwóch szczepów należących do gatunku *P. freudenreichii*, LMGT 2956 i LMGT 2946. Jest to małe, niezmodyfikowane białko, wrażliwe na działanie proteiny K. Masa molekularna czystego białka, ustalona metodą spektrometrii mas wynosi 4397 Da. Masa molekularna oszacowana na podstawie sekwencji nukleotydowej jest nieco mniejsza i wynosi 4379 Da, co auto-

rzy tłumaczą utlenieniem reszty metioniny w propionicynie F do sulfotlenku metioniny (12). Dojrzała postać bakteriocyny obejmuje 43 aminokwasy z centralnego regionu probakteriocyny kodowanej przez gen *pcfA*, kotranskrybowany prawdopodobnie z innymi genami. Poniżej genu *pcfA* znajduje się gen *pcfB*, kodujący białko o wysokiej homologii do białek rodziny SAM – S-adenozylometioniny (42). Białka z tej rodziny biorą udział w różnych reakcjach, m.in. metylacji, izomeryzacji, formowaniu pierścienia, utleniania beztlenowego (43). Podobnie, w zespole genów subtilozyny A znajduje się gen *alba*, kodujący białko z rodziny SAM (42, 44). Białko to bierze udział w formowaniu wewnętrznych mostków tioeterowych w cząsteczce bakteriocyny (45) lub procesie kondensacji prowadzącym do powstania formy pierścieniowej (46). Propionicyna F nie jest cząsteczką cykliczną ani nie zawiera zmodyfikowanych aminokwasów, jednakże propropionicyna F zawiera reszty cysteiny zlokalizowane w miejscu graniczącym z miejscem odcięcia probakteriocyny. Według autorów *pcfB* może być zaangażowany w uwalnianie końca aminowego z jednoczesnym utworzeniem wolnej reszty cysteinowej (12). W porównaniu z innymi bakteriocynami, zaobserwowano nietypowy proces przekształcania formy macierzystej w aktywne biologicznie białko. Badanie sekwencji genowej propionicyny F nie ujawniło obecności ani potencjalnego kodonu start korespondującego z miejscem wiązania rybosomu powyżej części kodującej propionicynę F ani też sekwencji sygnałnej. Prawdopodobnie biologiczna aktywacja bakteriocyny obejmuje proces proteolitycznego odcięcia 101 aminokwasów z części N-terminalnej i 111 z części C-terminalnej. Jest to o tyle nietypowy proces, że obejmuje odcięcie fragmentów na obu końcach probakteriocyny, podczas gdy w literaturze znane są tylko przypadki obróbki potranslacyjnej jednego z końców. Na przykład probakteriocyna peptydów aktywowanych enzymatycznie i cytolizyna z *Enterococcus faecalis* przechodzą dwa etapy proteolitycznego odcięcia w obszarze N-terminalnym. Interesujący jest także fakt, że gen *pcfC*, który, jak się wydaje, jest kotranskrybowany razem z genem *pcfA*, koduje białko o wysokiej homologii do aminopeptydazy prolinowej ze *Streptococcus lividans* (41). Enzym ten należy do rodziny peptydaz, podgrupy proteaz serynowych o aktywności peptydazy prolinowej. Sekwencja aminokwasowa propionicyny F wykazała obecność w regionie końca karboksylowego proliny, stąd też przypuszczenie, że peptydaza proliny może brać udział w obróbce potranslacyjnej bakteriocyny.

Nietypowy proces aktywacji bakteriocyny odnotowano również w przypadku białka PAMP. Masa cząsteczkowa dojrzałej postaci PAMP została oszacowana na 6383 Da, podczas gdy prekursor po odcięciu peptydu sygnałnego jest peptydem o masie 20734 Da. Punkt izoelektryczny wyznaczono przy pH 8,12. PAMP jest syntetyzowany jako propeptyd złożony ze 198 aminokwasów z N-końcowym peptydem sygnałnym o długości 27 aminokwasów. Dojrzała postać białka zawiera C-końcowy fragment tego prekursora. Na podstawie sekwencji aminokwasowej pro-PAMP ujawniono liczne prawdopodobne miejsca proteolitycznego cięcia dla proteiny K, jednak po analizie metodą spektrometrii mas wykazano powstawanie jednego dominującego produktu powstającego po proteolizie prekursora pro-PAMP. Specyficz-

ny region proteolitycznego cięcia występuje pomiędzy dwiema argininami, co jest typowe dla proteazy serynowej, podobnie jak proteiny K. Jest przy tym prawdopodobne, że enzymy atakujące cząsteczki białka w innych typowych dla nich miejscach, mogłyby doprowadzić do powstania białka różniącego się długością od PAMP jednym lub kilkoma aminokwasami (21). Główne różnice pomiędzy PAMP a innymi bakteriocynami dotyczą procesu syntezy i dojrzewania aktywnego białka. Bakteriocyny bakterii gramdodatnich są z reguły wytwarzane w postaci prekursorów z N-końcowym peptydem sygnałnym, biorącym udział w wydzieleniu białka z komórki. Utrzymując białko w postaci nieaktywnej wewnątrz komórki, peptyd ten stanowi dla niej ochronę przed bakteriobójczym działaniem. PAMP także posiada sekwencję sygnałną typową dla białek wydzielanych podstawową drogą sekrecji, jednak w tym przypadku białko PAMP ulega aktywacji dopiero na zewnątrz komórki, co jest zjawiskiem nietypowym dla bakteriocyn, jednak spotykanym wśród białek bakteryjnych. Przykładem jest lizostafyna (hydrolaza peptydoglikanu) czy heksozoaminaza (endo-N-acetyloglukozoaminidaza) wytwarzane przez *Staphylococcus simulans*. Oba białka wydzielane są jako nieaktywne proproteiny i aktywowane zewnątrzkomórkowo (52). Poddanie białka PAMP działaniu proteiny K w stężeniu 40 µg/ml powoduje powstanie jednego dominującego produktu o masie cząsteczkowej 6383 Da.

Identyczną sekwencją aminokwasową jak białko PAMP, ale krótszą o jeden aminokwas, posiada propionicyna GBZ-1, bakteriocyna wyizolowana z hodowli *P. thoenii* P127, producenta propionicyny PLG-1 (18). Gen kodujący GBZ-1 składa się z 675 nukleotydów i koduje duże białko złożone z 225 aminokwasów, zawierające peptyd sygnałny o długości 27 aminokwasów w pozycji 1-27 i pro-GBZ-1. Porównując sekwencję aminokwasów pro-GBZ-1 z propionicyną PLG-1 stwierdzono, że osiem z dziesięciu aminokwasów sekwencji N-terminalnej propionicyny PLG-1 wykazuje całkowitą homologię z sekwencją aminokwasową pro-GBZ-1 w pozycji 156-165 (NIDARRARAP). Fakt, że natywna, aktywna forma propionicyny GBZ-1 jest tylko o jeden aminokwas krótsza od PAMP, powstałego w wyniku trawienia *in vitro* proteinazą K pro-PAMP, wskazuje, że GBZ-1 jest rezultatem odcięcia od pro-GBZ-1 przez specjalną proteazę. Różnica polega na tym, że GBZ-1 jest wydzielana już w formie aktywnej, a PAMP powstaje w wyniku trawienia *in vitro*. Sekwencja aminowego końca propionicyny GBZ-1 wykazuje całkowitą homologię do sekwencji N-terminalnej PAMP. Ponadto, po trawieniu GBZ-1 trypsyną i chymotrypsyną zidentyfikowano dwa krótkie peptydy, które również są w pełni homologiczne do PAMP. Według Ben-Shushan i in. (18) *P. jensenii* LMG 3032, producent PAMP może być naturalnym mutantem, u którego specyficzna proteaza aktywująca bakteriocynę nie jest aktywna, bądź nie ulega ekspresji.

Do grupy bakteriocyn o masie cząsteczkowej nie przekraczającej 10 kDa należy również propionicyna PLG-1, białko o masie molekularnej 9328 Da, składające się z 99 aminokwasów (32). Cząsteczka propionicyny PLG-1 nie zawiera aminokwasów modyfikowanych, ma natomiast stosunkowo dużą zawartość aminokwasów hydrofobowych. Jest to typowe dla wielu bakteriocyn. Dla przykładu około 50% amino-

kwasów hydrofobowych w cząsteczce posiada laktokokcyna A (35) i laktocyna S (36). Duża zawartość glicyny w cząsteczce propionicyny zapewnia jej dużą elastyczność. Sekwencja propionicyny PLG-1 nie wykazuje homologii z żadną z poznanych dotąd bakteriocyn.

W odróżnieniu od omówionych bakteriocyn, propionicyna SM1 jest największą spośród poznanych bakteriocyn bakterii propionowych. Propionicyna SM1 jest syntetyzowana jako prepeptyd o długości 207 aminokwasów, ale aktywne białko składa się ze 180 aminokwasów. Masę cząsteczkową oszacowano na 19 942 Da. Sekwencja aminokwasowa sugeruje, że białko to jest wydzielane z komórki główną ścieżką sekrecji, a 27-aminokwasowy N-terminalny peptyd sygnałowy jest podczas tego procesu odcinany. Sekwencja peptydu sygnałowego nie wykazuje homologii z żadną ze znanych sekwencji liderowych innych bakteriocyn, jest jednak homologiczna z sekwencją sygnałową białka Usp45 wytwarzanego przez *Lactococcus lactis* o nieznannej funkcji (50) i białka litycznego P45 syntetyzowanego przez *Listeria monocytogenes* (51). Peptyd sygnałowy propionicyny SM1 jest zbudowany w sposób typowy dla tego rodzaju peptydów (37), tzn. posiada dodatkowo naładowany koniec aminowy, centralny region hydrofobowy i bardziej polarny region na końcu karboksylowym. Na końcu aminowym znajduje się dodatnio naładowana lizyna, region hydrofobowy zawiera alaninę, walinę, leucynę, izoleucynę, fenyloalaninę i metioninę, natomiast region C-terminalny stanowi układ alanina-tyrozyna-alanina. Gen propionicyny SM1 jest zlokalizowany na plazmidzie pLME106 o wielkości 6,9 kb. W przypadku dwóch innych szczepów *P. jensenii* DF4 i DF9 sonda opracowana dla genu *ppnA*, kodującego propionicynę SM1, hybrydyzowała z plazmidem pLME121 szczepu DF4 i pLME123 szczepu DF9, ale nie wykryto aktywności bakteriocynowej (10). *P. jensenii* DF1, wytwarzający propionicynę SM1, jest także producentem innej bakteriocyny, nazwanej propionicyną SM2. Na podstawie analizy sekwencji N-terminalnej drugiej bakteriocyny wykazano, że nie stanowi ona aktywnej podjednostki propionicyny SM1, ale odrębne białko (10).

Nie wszystkie bakteriocyny zostały scharakteryzowane na poziomie molekularnym. W przypadku jenseniny G, wytwarzanej przez *P. jensenii* P126 (obecnie klasyfikowanym jako *P. thoenii*) brak jest informacji na temat dokładnej masy cząsteczkowej jak również sekwencji aminokwasów i budowy genu. Natomiast nieobecność plazmidów sugeruje chromosomalne ułożenie genu jenseniny G (20).

4. Zakres aktywności bakteriocyn

Większość poznanych do tej pory bakteriocyn bakterii propionowych ma ograniczony zakres aktywności (tab. 3) i wykazuje działanie antagonistyczne w stosunku do bakterii należących do rodzajów *Lactobacillus* i *Propionibacterium*. Niektóre, jak propionicyna PLG-1 czy jensenina G, wykazują aktywność również wobec mikroorganizmów niespokrewnionych z producentem. Mechanizm oddziaływania antybak-

teryjnego może być bakteriobójczy lub bakteriostatyczny, w zależności od wrażliwego drobnoustroju.

Tabela 3

Zakres aktywności bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie propionowe

Bakteriocyna (producent)	Zakres aktywności	Literatura
propionicyna PLG-1 (<i>P. thoenii</i> P127)	bakterie G(+): <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (DRC-1, C2) bakterie G(-): <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> (JM109, V517), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> grzyby: <i>Aspergillus wentii</i> (ATCC 1778), <i>Apiotrichum curvatum</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>Fusarium tridinctum</i> , <i>Phialophora gregata</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. fibuligera</i> , <i>Scopulariopsis</i> sp., <i>Trichoderma reesi</i>	(16,27)
jensenina G (<i>P. jensenii</i> P126)	<i>P. acidipropionici</i> P5, <i>P. jensenii</i> P54, <i>Lactobacillus bulgaricus</i> NCDO 1489, <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797, <i>L. helveticus</i> NCDO 8, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCDO 799, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> C2, <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Clostridium botulinum</i> typ A,B,E	(20) (22,55)
jensenina P (<i>P. jensenii</i> B1264)	<i>P. jensenii</i> B1264, <i>P. thoenii</i> P127 <i>P. acidipropionici</i> P5, <i>P. thoenii</i> (<i>jensenii</i>) P126, <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356, <i>L. delbruecki</i> subsp. <i>delbruecki</i> ATCC 9649, <i>L. delbruecki</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCDO 1489, <i>L. delbruecki</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797, <i>L. helveticus</i> ATCC 15009, <i>L. plantarum</i> C500, PI 549, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> C2	(22)
propionicyna T1 (<i>P. thoenii</i> 419, <i>P. thoenii</i> LMG 2792)	<i>P. acidipropionici</i> ATCC 4965, ATCC 4875, <i>P. jensenii</i> ATCC 4868, ATCC 9614, ATCC 4964, ATCC 14072, P17, P52, <i>P. thoenii</i> LMG 2792, 419, TL 221, ATCC 4871, ATCC 4872 <i>Lactobacillus sakei</i> NCDO 2714	(9)
propionicyna SMI i SM2 (<i>P. jensenii</i> DF1)	<i>P. jensenii</i> DSM 20274, DSM 20535	(10)
propionicyna F (<i>P. freudenreichii</i> LMG 2946, LMG 2956)	szczepy z gatunku <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	(12)
propionicyna GBZ-1	<i>L. delbruecki</i> ATCC 4794, <i>L. plantarum</i> ATCC 8293, L155, <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	(18)
thoenicyna 447	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> LMG 13551, <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919, ATCC 6922, ATCC 11827, ATCC 11828	(17)
PAMP	wybrane szczepy z gatunków: <i>P. acidipropionici</i> , <i>P. freudenreichii</i> , <i>P. jensenii</i> , <i>P. thoenii</i> , bakterie z rodzaju <i>Lactobacillus</i>	(21)

Najszerzy zakres aktywności ma propionicyna PLG-1, wykazująca antagonistyczne działanie w stosunku do bakterii fermentacji propionowej i mlekowej, a także wobec bakterii gramujemnych, drożdży i pleśni. Antagonistyczne oddziaływanie w stosunku do pałeczek gramujemnych odnotowano również w przypadku propio-

nicyny GBZ-1, która wykazuje aktywność antybakteryjną wobec *Pseudomonas aeruginosa*. Natomiast aktywność fungistatyczną opisano jak dotąd tylko dla propionicyny PLG-1. Stanowi ona wyjątkową cechę, wykrytą jedynie u nielicznych bakteriocyn (16), stwarzając jednocześnie szersze możliwości aplikacyjne. Niektóre bakteriocyny bakterii propionowych, jak propionicyna GBZ-1 i thoenicyna 447, poza oddziaływaniem w stosunku do klasycznych bakterii fermentacji propionowej, wykazują działanie antybakteryjne wobec chorobotwórczego szczepu *P. acnes* (17,18). Z kolei jensenina G hamuje rozwój przetrwalników *Clostridium botulinum* typu A, B i E (22).

Pozostałe bakteriocyny bakterii propionowych mają ograniczony zakres aktywności, obejmujący bakterie z rodzajów *Propionibacterium*, *Lactobacillus* i *Lactococcus*. W wielu przypadkach oddziaływanie wobec bakterii fermentacji mlekowej jest silniejsze niż w stosunku do bakterii propionowych. Przykładem są propionicyna GBZ-1, która wykazuje największą aktywność antagonistyczną wobec *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 4797 (18), podobnie jak jensenina P, bakteriobójcza w stosunku do *L. delbrueckii* (22). Thoenicyna 447 wykazuje bakteriobójcze oddziaływanie wobec *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LMG 13551, podczas gdy w stosunku do *Propionibacterium acnes* działa bakteriostatycznie (17). Z kolei jensenina G wykazuje zwiększoną aktywność wobec rodzajów *Lactobacillus* i *Lactococcus*, przy czym dwudziestokrotnie większa dawka tej bakteriocyny jest potrzebna do zahamowania wzrostu bakterii propionowych niż do inhibicji szczepów *Lactobacillus* (20). Podobnym zakresem aktywności, jak wymienione bakteriocyny, charakteryzują się białka aktywowane enzymatycznie – PAMP, które wykazują antagonizm wobec szczepów z gatunku *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii* i sześciu szczepów z rodzaju *Lactobacillus* (21), przy czym bakterie mlekowe są bardziej wrażliwe na działanie PAMP. W badaniach Faye i in. (21) stwierdzono, że PAMP wykazują działanie bakteriobójcze w stosunku do mikroorganizmów wrażliwych już w stężeniu nanomolarnym.

Niektóre bakteriocyny bakterii propionowych, jak propionicyna F (12), propionicyna T1 (9) i propionicyna SM1 (10) wykazują działanie antagonistyczne wyłącznie wobec szczepów należących do tego samego gatunku, co producent. W przypadku propionicyny SM1 surowe, nieoczyszczone preparaty bakteriocynowe charakteryzowały się szerokim zakresem aktywności, obejmującym drożdże, pleśnie, bakterie fermentacji propionowej i mlekowej, jednak po oczyszczeniu, antagonistyczna aktywność propionicyny SM1 ograniczała się wyłącznie do szczepu *P. jensenii* DSM20274 (10). Mogło to wynikać z faktu, że w preparacie nieoczyszczonym znajdowały się inne metabolity, wykazujące aktywność antybakteryjną i fungistatyczną, nie związane z działaniem bakteriocyny lub wspomagające jej aktywność.

Oddziaływanie bakteriocyn bakterii propionowych wobec blisko spokrewnionych szczepów jest też zróżnicowane i zależy od stopnia spokrewnienia szczepu producenta i szczepu wrażliwego. Zgodnie z filogenetyczną analizą opartą na analizie 16S rRNA, gatunek *P. freudenreichii* stanowi odrębną gałąź filogenetyczną aniżeli gatunki *P. thoenii*, *P. jensenii* i *P. acidipropionici* (53), co wiąże się z faktem, że większość bakteriocyn wyka-

zuje działanie antagonistyczne w obrębie swojej gałęzi filogenetycznej. Przykładowo, częściowo oczyszczona propioniczna PLG-1 oraz propioniczna T1 hamują wzrost szczepów należących do gatunków *P. thoenii*, *P. jensenii* i *P. acidipropionici*, ale nie wykazują aktywności antybakteryjnej wobec *P. freudenreichii* i *P. shermanii* (9,16).

W badaniach dotyczących bakteriocyn bakterii propionowych odnotowano zjawisko adsorpcji do bakterii wrażliwych na działanie bakteriocyn w przypadkach, kiedy oddziaływanie to ma charakter bakteriobójczy. Grinstead i Barefoot (22) wykazali, że po ekspozycji *L. delbrueckii* na jenseninę G, w płynie pozakomórkowym następuje znaczne obniżenie aktywności antybakteryjnej, wynikające prawdopodobnie z wiązania się bakteriocyny do komórek. Nie stwierdzono natomiast adsorpcji bakteriocyny do komórek innego wrażliwego szczepu, *P. acidipropionici*. Obserwacje te współgrają ze sposobem oddziaływania jenseniny G na mikroorganizmy wskaźnikowe, który jest bakteriostatyczny wobec *P. acidipropionici* i bakteriobójczy wobec *L. delbrueckii*. Również propioniczna PLG-1 adsorbuje się do komórek wrażliwego szczepu *P. acidipropionici* P5 (16) oraz *L. delbrueckii*, wobec których wykazuje działanie bakteriobójcze (33). Nie obserwowano natomiast adsorpcji propionicyny PLG-1 do komórek producenta, co świadczy o braku antagonistycznego oddziaływania wobec wytwarzającego ją szczepu (16,27,33).

Wyjątkowo, wrażliwość producentów, *Propionibacterium thoenii* 419 i LMG 2792, na swoją bakteriocynę odnotowano w przypadku propionicyny T1 w oznaczaniu płytkowym. Wrażliwość ta dotyczy komórek we wczesnej fazie logarytmicznej, co może wskazywać na fakt, że czynniki odporności na propionicynę T1 nie są konstytutywnie pobudzane, ale są połączone z produkcją bakteriocyny. Propioniczna T1 działa bakteriobójczo na komórki wrażliwe, powodując ich śmierć w ciągu kilku godzin po ekspozycji na bakteriocynę. Jednak podczas pierwszych kilku godzin po dodaniu propionicyny T1 obserwowano zaskakujące zjawisko wzrostu gęstości optycznej hodowli bakterii wrażliwych, podczas gdy liczba komórek w tym samym czasie malała (9). Podobne zjawisko obserwowano po dodaniu laktokokcyny 972 do hodowli wrażliwych laktokoków. Liczba komórek żywych gwałtownie zmalała, chociaż komórki pozostały metabolicznie aktywne. Zjawisko to tłumaczono hamowaniem podziałów przez laktokokcynę (54). Faye i in. (9) sugerowali ponadto możliwość nakładania się procesu zabijania komórek wrażliwych przez bakteriocynę i biosyntezy podstawowych makromolekuł. Kontynuacja produkcji składników komórkowych mogła spowodować wzrost gęstości optycznej w pierwszych godzinach po dodaniu propionicyny T1.

5. Podsumowanie

Bakteriocyny wytwarzane przez bakterie fermentacji propionowej stanowią nadal słabo poznaną grupę tych związków. Sekwencję aminokwasową i nukleotydową opisano zaledwie dla kilku z nich. Tymczasem obecnie coraz więcej prac poświęconych jest charakterystyce bakteriocyn na poziomie molekularnym i mechani-

zmowi ich działania. Powstają nowe nurty w badaniach nad tymi związkami, jak heterologiczna nad- i multiekspresja bakteriocyn, modyfikacje genetyczne czy prace nad stworzeniem bakterii multibakteriocynowych. Takie ukierunkowanie badań wynika z problemów spotykanych w trakcie doświadczeń i prób aplikacji do żywności. Efektywność bakteriocyny bądź szczepów bakteriocynogennych w żywności jest często ograniczona z różnych powodów, takich jak wąskie spektrum aktywności, spontaniczna utrata zdolności do wytwarzania bakteriocyny, słaba adaptacja szczepu producenta do środowiska czy pojawianie się szczepów odpornych na określoną bakteriocynę (1).

Pomimo że większość opisanych w tej pracy bakteriocyn wykazuje ograniczony zakres aktywności antagonistycznej, możliwe jest ich praktyczne wykorzystanie. Wąskim spektrum aktywności charakteryzuje się również wiele bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie fermentacji mlekowej, co bynajmniej nie ogranicza możliwości ich wykorzystania w praktyce, a w określonych warunkach jest postrzegane jako zaleta. Zastosowanie takich bakteriocyn, np. w żywności pozwala na ukierunkowanie niszczenia mikroflory niepożądaną bez wpływu na mikroflorę swoistą produktu, w tym kultury starterowe (55).

Obecnie prace dotyczące aplikacji bakteriocyn bakterii propionowych są w fazie badań. Uważa się, że aktywność omawianych bakteriocyn skierowana wobec bakterii fermentacji mlekowej mogłaby być wykorzystana w fermentowanych produktach mleczarskich w celu zapobiegania ich przekwaszeniu na skutek nadmiernego rozwoju bakterii mlekowych. Badania takie prowadzono m.in. dla jenseniny G (56). Również aktywność skierowana wobec członków tylko jednej gałęzi filogenetycznej może być istotna z praktycznego punktu widzenia. Propionicyna T1 mogłaby być wykorzystana do zapobiegania formowaniu się czerwonych plamek przez wytwarzające barwnik *P. thoenii* i *P. jensenii*, co stanowi częsty problem w produkcji serów szwajcarskich, pozostając jednocześnie bez wpływu na kultury starterowe obejmujące *P. freudenreichii*. Aktywność antybakteryjna niektórych bakteriocyn wobec *P. acnes* stwarza natomiast możliwość farmaceutycznego zastosowania aktywnych białek jako dodatku do preparatów, np. o działaniu przeciwtwardzikowym. Bakteriocyny o szerszym zakresie działania jak propionicyna PLG-1 można wykorzystać jako środki hamujące rozwój niepożądanych mikroorganizmów w różnego rodzaju produktach spożywczych, jak również kosmetycznych czy farmaceutycznych.

Należy również uwzględnić fakt, że bakteriocyny stanowią jeden z elementów antagonistycznego oddziaływania bakterii fermentacji propionowej, co może mieć znaczenie w przypadku stosowania żywych komórek zamiast białkowych preparatów. Przykładem może być wykorzystanie tych mikroorganizmów jako probiotyków, których prozdrowotne oddziaływanie na organizm ludzki lub zwierzęcy obejmuje między innymi aktywność przeciwdrobnoustrojową. Aktualnie nastąpił intensywny rozwój badań w kierunku poznania właściwości probiotycznych bakterii z rodzaju *Propionibacterium*, stąd też pełniejsza charakterystyka antybakteryjnej i fungistatycznej aktywności nabiera większego znaczenia.

Literatura

1. Schillinger U., Geisen R., Holzappel W. H., (1996), *Trends Food Sci.*, 7, 158-164.
2. Klaenhammer T. R., (1993), *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 39-86.
3. Tagg J. R., Dajani A. S., Wannamaker L. W., (1976), *Bacteriol. Rev.*, 40, 722-756.
4. Cabo M. L., Murado M. A., González M. P., Pastoriza L., (2001), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 29, 264-273.
5. Cleveland J., Montville T., Nes I. F., Chikindas M., (2001), *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 1-20.
6. Deegan L. H., Cotter P. D., Hill C., Ross P., (2006), *Int Dairy J.*, 16, 1058-1071.
7. Gwiazdowska D., Trojanowska K., (2005), *Biotechnologia*, 1, 114-130.
8. Gwiazdowska D., Filipiak M., (2005), *Na pograniczu chemii i biologii*, XII, 193-210.
9. Faye T., Lansgrud T., Nes I. F., Holo H., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4230-4236.
10. Miescher S. M., Stierli M. P., Teuber M., Meile L., (2000), *Syst. Appl. Microbiol.*, 23, 174-184.
11. Gwiazdowska D., Trojanowska K., (2006), *Le Lait*, 86, 141-154.
12. Brede D. A., Faye T., Johnsborg O., Ødegård I., Nes I. F., Holo H., (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 7303-7310.
13. Meile L., Dasen G., Miescher S., Stierli M., Teuber M., (1999), *Lait*, 79, 71-78.
14. Kujawski M., Rymaszewski J., Cichosz G., Łaniewska-Moroz Ł., Fetliński A., (1994), *Przegl. Mlecz.*, 10, 263-267.
15. Cummis C. S., Johnson J. L., (1986), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology – 9th*, II, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1346-1353.
16. Lyon W., Glatz B., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 701-706.
17. van der Merwe I. R., Bauer R., Britz T. J., Dicks L. M. T., (2004), *Int. J. Food Microbiol.*, 92, 153-160.
18. Ben-Shushan G., Zakin V., Gollop N., (2003), *Peptides*, 24, 1733-1740.
19. Al-Zoreky N. J., Ayres W., Sandine W. E., (1991), *J. Dairy Sci.*, 74, 758-763.
20. Grinstead D. A., Barefoot S. F., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 1, 215-220.
21. Faye T., Brede D. A., Lansgrud T., Nes I. F., Holo H., (2002), *J. Bacteriol.*, 184, 3649-3656.
22. Ratnam P., Barefoot S., Prince L., Bodine A., McCaskill L. H., (1999), *Lait*, 79, 125-136.
23. Fujimura S., Nakamura T., (1978), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14, 893-898.
24. Paul G. E., Booth S. J., (1988), *Can. J. Microbiol.*, 34, 1344-1347.
25. Lyon W., Glatz B., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 83-88.
26. Ekinci F. Y., Barefoot S. F., (1999), *Lett. in Appl. Microbiol.*, 29 (3), 176-180.
27. Lyon W., Sethi J. K., Glatz B., (1993), *J. Dairy Sci.*, 76, 1506-1513.
28. Jack R. W., Tagg J. R., Ray B., (1995), *Microbiol. Rev.*, 59, 171-200.
29. Morgan S. M., Galvin M., Kelly J., Sletten K., Nes I. F., (1999), *J. Food Protect.*, 62, 1011-1016.
30. Aasen I. M., Möretro T., Katla T., Axelsson L., Storro I., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 159-166.
31. Parente E., Ricciardi A., Addario G., (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 388-394.
32. DeVuyst L., Callewaert R., Crabbé K., (1996), *Microbiology*, 142, 817-827.
33. Hsieh H., Paik H., Glatz B., (1996), *J. Food Protect.*, 7, 734-738.
34. Paik H. D., Glatz B. A., (1995), *Lait*, 75, 367-377.
35. Holo H., Nilssen O., Nes I. F., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 3879-3887.
36. Mortvedt-Abilgaard C. I., Nissen-Meyer J., Sletten K., Nes I. F., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1829-1834.
37. von Heijne G., (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, 947, 307-333.
38. Siegers K., Entian K. D., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1082-1089.
39. Klein C., Entian K. D., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2793-2801.
40. Rince A., Dufour A., Uguen P., le Pennec J. P., Haras D., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4252-4260.
41. Butler M. J., Binnie C., DiZonno M. A., Krygsman P., Solters G. A., Soostmeyer G., Walczyk E., Malek L. T., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3145-3150.
42. Sofia H. J., Chen G., Hetzler B. G., Reyes-Spindola J. F., Miller N. E., (2001), *Nucleic Acid Res.*, 29, 197-1106.

43. Jarret J. T., (2003), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7, 174-182.
44. Zheng G., Yan L. Z., Vederas J. C., Zuber P., (1999), *J. Bacteriol.*, 181, 7346-7355.
45. Marx R., Stein T., Entian K. D., Glaser S.J., (2001), *J. Protein Chem.*, 20, 501-506.
46. Zheng G., Hehn R., Zuber P., (2000), *J. Bacteriol.*, 182, 3266-3273.
47. Riedel K. H. J., Britz T. J., (1996), *Syst. Appl. Microbiol.*, 19, 370-380.
48. Riedel K. H. J., Wingfield B. D., Britz T. J., (1998), *Syst. Appl. Microbiol.*, 21, 419-428.
49. Nielsen H., Engelbrecht S., Brunak S., von Heijne G., (1997), *Protein Eng.*, 10, 1-6.
50. van Asseldonk M., Rutten G., Oteman M., Siezen R. J., (1990), *Gene*, 95, 155-160.
51. Schubert K., Bichlmaier A. M., Mager E., Wolff K., Ruhland G., Fiedler F., (2000), *Arch. Microbiol.*, 173, 21-28.
52. Neumann V. C., Heath H. E., LeBlanc P. A., Sloan G. L., (1993), *FEMS Microbiol. Lett.*, 110, 205-211.
53. Dasen G., Smutny J., Teuber M., Meile L., (1998), *System Appl. Microbiol.*, 21, 251-259.
54. Martinez B., Rodriguez A., Suárez J. E., (2000), *Microbiology*, 146, 949-955.
55. Sip A., Krasowska M., Więckiewicz M., (2009), *Biotechnologia*, 3 (86), 129-147.
56. Weinbrenner D. R., Barefoot S. F., Grinstead D. A., (1997), *J. Dairy Sci.*, 80, 1246-1253.