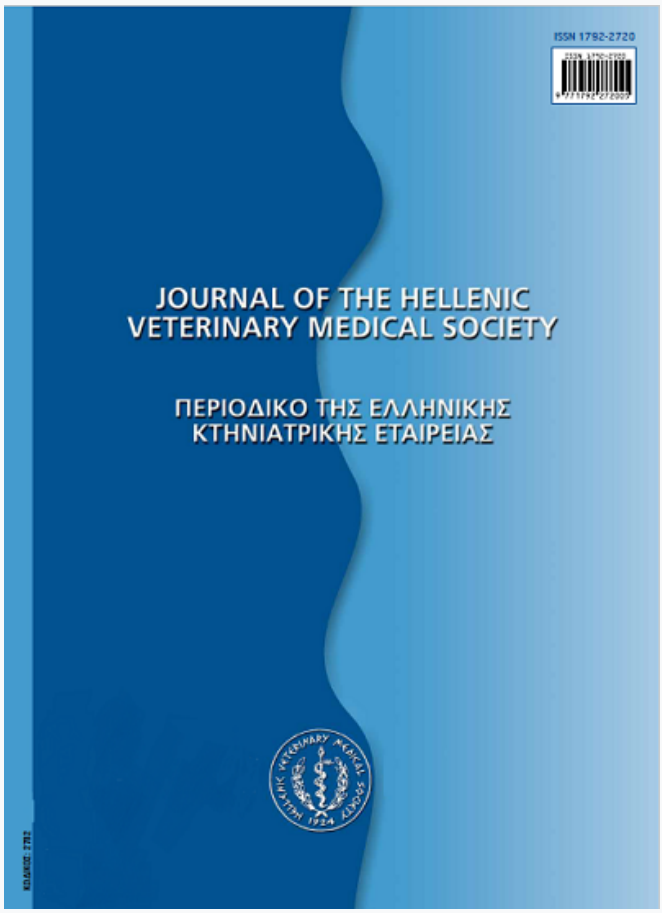
ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 53, No 4 (2002)



Bacteriocins: Classification, properties, production and mode of action. (I)

J. ΜΕΤΑΧΟΡΟULOS (Ι. ΜΕΤΑΞΟΠΟΥΛΟΣ), M. MATARAGAS (Μ. ΜΑΤΑΡΑΓΚΑΣ), E. H. DROSINOS (Ε. Χ. ΔΡΟΣΙΝΟΣ)

doi: 10.12681/jhvms.15390

Copyright © 2018, J METAXOPOULOS, M MATARAGAS, EH DROSINOS

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

To cite this article:

ΜΕΤΑΧΟΡΟULOS (Ι. ΜΕΤΑΞΟΠΟΥΛΟΣ) J., MATARAGAS (Μ. ΜΑΤΑΡΑΓΚΑΣ) M., & DROSINOS (Ε. Χ. ΔΡΟΣΙΝΟΣ) E. H. (2018). Bacteriocins: Classification, properties, production and mode of action. (I). *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *53*(4), 335–344. https://doi.org/10.12681/jhvms.15390

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 25/01/2026 11:38:40

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2002, 53(4): 335-344
JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2002, 53(4): 335-344

Ανασκόπηση
Review article

Βακτηριοσίνες: Ταξινόμηση, ιδιότητες, παραγωγή και τρόπος δράσης. (Ι)

Ι. Μεταξόπουλος, Μ. Ματαράγκας, Ε.Χ. Δροσινός

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Οι βακτηριοσίνες αποτελούν αντιμικροβιακές ουσίες, οι οποίες συντίθενται από τα ριβοσωμάτια του μικροβιακού κυττάρου. Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων πρωτεϊνικής φύσεως αντιμικροβιακών ουσιών, που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, έχει ταυτοποιηθεί και έχουν προσδιορισθεί οι βιοχημικές τους ιδιότητες. Αποτέλεσμα αυτών των μελετών είναι η διεύρυνση του πεδίου γνώσης, όσον αφορά τη βιοσύνθεση, τη δομή, την παραγωγή και τον τρόπο δράσης, αυτών των πρωτεϊνικών μορίων. Ο σκοπός της ανασκόπησης αυτής είναι η αναφορά των διαθέσιμων στοιχείων, που υπάρχουν μέχρι σήμερα για τις βακτηριοσίνες, τα οποία έχουν μεγάλη σημασία για την κατανόηση του όλου μηχανισμού της βιοσύνθεσης, της παραγωγής και της δράσης τους. Τέλος, θα αναφερθούν διάφορα χαρακτηριστικά και πρόσφατα ευρήματα από διάφορες μελέτες των βιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων τους, ώστε να αποδοθεί μια γενική εικόνα για τη δράση των βακτηριοσινών.

Λέξεις ευρετηρίασης: Βακτηριοσίνες, ταξινόμηση, βιοσύνθεση, τρόπος δράσης.

Bacteriocins: Classification, properties, production and mode of action. (I)

Metaxopoulos J., Mataragas M., Drosinos E.H.

ABSTRACT. Bacteriocins are antimicrobial compounds synthesized by ribosomes. In the last years a variety of bacteriocins, produced by lactic acid bacteria, has been identified and characterized. As a result of these studies is that new knowledge regarding the biosynthesis, structure, production and mode of action of these proteinaceous compounds has been gained. The present review attempts to refer some of the available data with reference to the bacteriocins, which are important for the understanding of the whole mechanism of the production of bacteriocins. Additionally, some features and recent biology and biochemistry findings concerning these substances will be reported, in order to provide a general overview of the production and action of the bacteriocins.

Key words: Bacteriocins, classification, biosynthesis, mode of action.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB: Lactic Acid Bacteria) χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην παραγωγή προϊόντων ζυμώσεως και μια μεγάλη ποικιλία στελεχών παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην πλειονότητα των ζυμώσεων στα τρόφιμα, αφού χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (starters cultures) σε διάφορα προϊόντα όπως είναι τα γαλακτοκομικά, τα κρεατοσκευάσματα, τα λαχανικά και τα προϊόντα αρτοποιίας.

Η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τρόφιμα οφείλεται στην ικανότητά τους να προκαλούν επιθυμητές αλλαγές στη γεύση, στο άρωμα και στην υφή των προϊόντων, καθώς και να παρεμποδίζουν την αύξηση παθογόνων και άλλων μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις [1]. Η δράση αυτή των οξυγαλακτικών βακτηρίων οφείλεται στη μείωση του pH, στον ανταγωνισμό ως προς τα διάφορα θρεπτικά συστατικά και στην παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το διακετύλιο, το γαλακτικό οξύ και άλλων μεταβολιτών μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται και οι βακτηριοσίνες[1].

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν μια ετερογενή ομάδα αντιμικροβιακών ουσιών πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες ποικίλλουν όσον αφορά το αντιμικροβιακό φάσμα και τον τρόπο δράσης, το μοριακό βάρος (MB), τη γενετική τους προέλευση και τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Η σημασία των βακτηριοσινών αποδίδεται στην ενδεχόμενη εφαρμο-

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα, Ελλάδα

Ημερομηνία υποβολής: 16.10.2001
Ημερομηνία εγκρίσεως: 17.01.2002

Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Iera Odos 75, 118 55 Athens, Greece

Submission date: 16.10.2001
Approval date: 17.01.2002

γή τους ως φυσικών συντηρητικών των τροφίμων, με σκοπό την αντικατάσταση ή μείωση των συντηρητικών, των οποίων ορισμένες κατηγορίες θεωρούνται επικίνδυνες για την υγεία των καταναλωτών.

Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν θεωρούνται επικίνδυνες ουσίες λόγω της προέλευσής τους και συγκαταλέγονται στις λεγόμενες GRAS (Generally Regarded As Safe) ουσίες και έτσι μπορούν να προστεθούν ή να παραχθούν μέσα στη μάζα του τροφίμου χωρίς ιδιαίτερους περιορισμούς με στόχο να δράσουν ως φυσικά συντηρητικά. Αυτή η πιθανότητα της χρήσης τους έχει ανάγει τις βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ερευνητικό θέμα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Παράγοντες που συμβάλλουν στην αύξηση του ερευνητικού ενδιαφέροντος για τις βακτηριοσίνες είναι οι εξής:

- Η έγκριση της νισίνης (1988), από την FDA (Food and Drug Administration: Υπηρεσία Ελέγχου Τροφίμων των Η.Π.Α), ως GRAS ουσία σε ορισμένες εφαρμογές
- Η αποστροφή των καταναλωτών σε παραδοσιακά χημικά συντηρητικά
- Ο προβληματισμός που υπάρχει γύρω από την ασφάλεια των υπαρχόντων συντηρητικών των τροφίμων, όπως τα θειώδη και τα νιτρώδη άλατα
- Η δυνατότητα μεταφοράς των γονιδίων που είναι υπεύθυνα: 1) για την παραγωγή των βακτηριοσινών και 2) για την ανοσία έναντι αυτών, σε επιλεγμένα στελέχη εκκινητών.

Βακτηριοσίνες

1.1 Ορισμός και ταξινόμηση των βακτηριοσινών

Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μόρια πρωτεϊνικής φύσης, δηλαδή αποτελούνται από πεπτίδια και αμινοξέα. Μπορούν να παρεμποδίσουν την αύξηση των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις και των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Σήμερα μόνο η νισίνη παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα και η χρήση της έχει επιτραπεί ως αντιμικροβιακής ουσίας στα τρόφιμα σε μερικώς καθαρή μορφή [2]. Ειδικότερα για τη νισίνη, τα ειδικά κριτήρια καθαρότητας περιγράφονται στο παράρτημα του άρθρου 36 του ελληνικού κώδικα τροφίμων και ποτών, όπως ισχύει σήμερα. Ο FDA έχει θεσπίσει αντίστοιχα ειδικά κριτήρια στην παράγραφο 21 CFR: 184.1538 (Code of Federal Regulations, 2001).

Οι βακτηριοσίνες παράγονται εξωκυτταρικά και παρουσιάζουν ένα στενό αντιμικροβιακό φάσμα δράσης. Το φάσμα δράσης των παραγωγών στελεχών περιορίζεται στην παρεμπόδιση της αύξησης στελεχών του ιδίου είδους ή συγγενών στελεχών.

Ο Tagg et al. (1976)[3] όρισαν τις βακτηριοσίνες οι οποίες παράγονται από τα Gram (+) βακτήρια ως ουσίες που παρουσιάζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Το μόριό τους αποτελείται από ενεργά βιολογικά πρωτεϊνικά τμήματα (πεπτίδια) και τα οποία παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες.
- Έχουν μικρό ΜΒ το οποίο ποικίλλει σημαντικά μεταξύ τους, όπως συμβαίνει και στο αντιμικροβιακό φάσμα και τον τρόπο δράσης τους· και
- Είναι γενικά δραστικές εναντίον συγγενών με το παραγωγό-στέλεχος βακτηρίων και μια εξήγηση αυτής της ιδιότητας είναι να δοθεί η δυνατότητα στο παραγωγό-στέλεχος να μπορέσει να αναπτυχθεί ευκολότερα σε σχέση με τα ευαίσθητα στη βακτηριοσίνη στελέχη.

Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, σύμφωνα με την ταξινόμηση του Klaenhammer (1993)[4] και την τροποποίηση που υπέστη αυτή από τον Nes et al. (1996)[5], σήμερα χωρίζονται σε 4 βασικές κατηγορίες[6]:

1. Κλάση Ι. Στην κλάση αυτή ανήκουν τα λαντιβιοτικά. Αυτά είναι μικρού ΜΒ πεπτίδια (<3,5 kDa), ανθεκτικά στη θέρμανση και χαρακτηρίζονται από την παρουσία στο μόριό τους αμινοξέων, τα οποία δεν απαντούν συχνά, όπως είναι η λανθειονίνη και η 3-μεθυλο-λανθειονίνη. Κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής και η πιο καλά μελετημένη από όλες τις βακτηριοσίνες είναι η νισίνη. Τα λαντιβιοτικά χωρίζονται σε 2 υποκατηγορίες: η πρώτη περιλαμβάνει μόρια με ελικοειδή μορφή, μικρού ΜΒ που κυμαίνεται μεταξύ 2151-4635 Da και φέρουν θετικά φορτία, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει σφαιρικά μόρια με μικρότερο από την πρώτη υποκατηγορία ΜΒ (1825-2042 Da) και φέρουν ουδέτερα ή αρνητικά φορτία.

2. Κλάση ΙΙ. Είναι μικρού ΜΒ βακτηριοσίνες (<10 kDa) με 30-100 αμινοξέα στο μόριό τους, ανθεκτικές στη θέρμανση και οι οποίες δεν περιέχουν λανθειονίνη στο μόριό τους. Η κλάση αυτή διακρίνεται σε 3 υποκατηγορίες:

- **ΙΙa.** Είναι η πιο κοινή κλάση. Περιλαμβάνει πεπτίδια τα οποία είναι δραστικά έναντι του γένους *Listeria*. Οι βακτηριοσίνες αυτές δεν είναι τόσο δραστικές έναντι των σπορίων, αλλά είναι πιο αποτελεσματικές από τη νισίνη σε ορισμένα τρόφιμα, όπως στο κρέας. Ο κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι η πεδιοσίνη PA-1/AcH.
- **ΙΙb**. Περιλαμβάνει βακτηριοσίνες που σχηματίζονται από 2 πεπτίδια (λακτοκοκκίνη G).
- **ΙΙc**. Πεπτίδια που απαιτούν ανηγμένα μόρια κυστεΐνης για την εκδήλωση της δραστικότητας (λακτοκοκκίνη B).

3. Κλάση ΙΙΙ. Είναι βακτηριοσίνες μεγάλου ΜΒ (>30 kDa), οι οποίες δεν είναι τόσο σταθερές στη θέρμανση και αδρανοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες (ελβετισίνη J).

4. Κλάση IV. Αυτές οι βακτηριοσίνες έχουν ένα υδατανθρακικό ή λιπαρό τμήμα στο μόριό τους, το οποίο απαιτείται για την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης (λακτοσίνη 27).

1.2 Ιδιότητες των βακτηριοσινών

1.2.1 Χημική σύσταση

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν μια ετερογενή ομάδα ουσιών αλλά παρ' όλη τη διαφορά μεταξύ τους στη χημική

σύσταση, ένα κοινό χαρακτηριστικό είναι η παρουσία στο μόριό τους ενός πρωτεϊνικού τμήματος. Με τη χρήση διαφόρων ενζύμων (πρωτεϊνάσες, λιπάσες κ.ά.) μπορεί να καθοριστεί η χημική σύσταση των βακτηριοσινών ανάλογα με την ευαισθησία των μορίων σε αυτά τα ένζυμα. Ορισμένες βακτηριοσίνες μπορεί να είναι απλά πρωτεϊνικά μόρια, αλλά αρκετές βακτηριοσίνες είναι πολύπλοκες χημικές ενώσεις, όπου εκτός από το πρωτεϊνικό τμήμα περιλαμβάνουν και άλλα τμήματα (υδατανθρακικό ή λιπαρό) τα οποία συνδέονται με το πρωτεϊνικό[3].

1.2.2 Αντοχή στη θέρμανση

Οι περισσότερες βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ανθεκτικές στη θέρμανση. Διατηρούν τη δραστικότητά τους σε διάφορες θερμοκρασίες και για ποικίλα χρονικά διαστήματα επεξεργασίας, όπως στους 100 °C ακόμα και σε θερμοκρασία αποστείρωσης (λακτασίνη F)[7]. Η ευαισθησία των βακτηριοσινών στη θέρμανση εξαρτάται από την καθαρότητά τους, το pH, το MB και την παρουσία προστατευτικών ενώσεων. Η αντοχή των βακτηριοσινών στη θέρμανση δείχνει ότι το βιολογικά ενεργό τμήμα του μορίου στερείται τριτοταγούς ή τεταρτοταγούς δομής. Εξαίρεση αποτελούν οι βακτηριοσίνες της τρίτης κλάσης, όπως η ελβετισίνη J, οι οποίες δεν είναι ανθεκτικές στη θέρμανση, γεγονός που δείχνει την ύπαρξη μιας πιο περίπλοκης πρωτεϊνικής δομής[8].

1.2.3 Επίδραση του pH

Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι γενικά σταθερές σε όξινο ή ουδέτερο pH (pH 2,0-8,0)[9]. Η νισίνη είναι αρκετά ευαίσθητη στις διακυμάνσεις του pH, όπου η μέγιστη διαλυτότητα και σταθερότητα του μορίου παρατηρείται σε τιμή pH 2,0, ενώ μειώνονται οι ιδιότητες αυτές με την αύξηση της τιμής. Αυτή η μείωση της διαλυτότητας της νισίνης από 57 mg/ml σε pH 2,0, σε 1,5 mg/ml σε pH 6,0, αποτελεί μειονέκτημα για την εφαρμογή της σε μη όξινα τρόφιμα. Οι περισσότερες βακτηριοσίνες αδρανοποιούνται σε αλκαλικές τιμές pH, ενώ μερικές είναι σταθερές σε πολύ μεγάλο εύρος τιμών, όπως η μπρεβισίνη B 37, η οποία είναι δραστική σε pH 1,0-11,0[10].

1.3 Γενετικές καταβολές των βακτηριοσινών

Η παραγωγή των βακτηριοσινών κωδικοποιείται από ειδικά πλασμιδικά γονίδια. Αυτά που ενδιαφέρουν είναι τα εξής[3,4,11,12]:

1. Το γονίδιο Bac^+, το οποίο κωδικοποιεί την παραγωγή της αντιμικροβιακής ουσίας και

2. Το γονίδιο Bac^r, το οποίο κωδικοποιεί την ανοσία του παραγωγού στελέχους στη βακτηριοσίνη που παράγει.

Τα υπεύθυνα για την παραγωγή και ανοσία πλασμίδια είναι σε ορισμένες περιπτώσεις ασταθή και μπορούν να καταστραφούν, όπως στην περίπτωση που το παραγωγό στέλεχος αναπτύσσεται σε αντίξοες συνθήκες, ή τεχνητά μετά από κατεργασία των κυττάρων με ειδικές ουσίες που προκαλούν διάσπαση των πλασμιδίων, όπως η ακριφλαβίνη.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο μέρος της έρευνας έχει επικεντρωθεί στην απομόνωση και μεταφορά των γονιδίων που σχετίζονται με τις βακτηριοσίνες ευρέος φάσματος από το παραγωγό στέλεχος σε κάποιο άλλο με τη μέθοδο της σύζευξης[9]. Η εφαρμογή μεθόδων γενετικής μηχανικής για τη βελτίωση των παραγωγών στελεχών ή την παραγωγή νέων βελτιωμένων καλλιεργειών είναι ένα σύγχρονο αντικείμενο της έρευνας με μεγάλο ενδιαφέρον για την εφηρμοσμένη επιστήμη και την τεχνολογία τροφίμων[13].

1.4 Βιοσύνθεση των βακτηριοσινών

Η σύνθεση των κατιονικών αυτών πεπτιδίων κωδικοποιείται από τέσσερα διαφορετικά γονίδια[5]:

1. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή της προβακτηριοσίνης (πρόδρομη ουσία),

2. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ανοσία στο παραγωγό-στέλεχος και το οποίο εντοπίζεται δίπλα στο προηγούμενο,

3. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη λειτουργία ενός μηχανισμού μεταφοράς έξω από το κύτταρο της πρόδρομης ουσίας (ABC-transporter) και, τέλος,

4. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή μιας συμπληρωματικής βοηθητικής πρωτεΐνης (accessing protein), της οποίας η παρουσία είναι σημαντική για τη μεταφορά έξω από το κύτταρο της βακτηριοσίνης, αλλά ο συγκεκριμένος ρόλος της είναι ακόμη άγνωστος.

Αυτά τα τέσσερα γονίδια οργανώνονται σε ένα ή δύο οπερόνια. Εκτός από αυτά τα γονίδια έχουν βρεθεί και γονίδια ρύθμισης της παραγωγής, σε ορισμένες βακτηριοσίνες της κλάσης II[14,15].

Οι βακτηριοσίνες πρώτα συντίθενται στα ριβοσωμάτια ως πρόδρομες ουσίες των βακτηριοσινών (προ-πεπτίδια) και οι οποίες δεν είναι βιολογικά δραστικές και περιέχουν στο αμινοτελικό τους άκρο μια κύρια αλληλουχία αμινοξέων, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο μορίων γλυκίνης (double-glycine leader). Η χρησιμότητα της αλληλουχίας αυτής φαίνεται να είναι η εξής:

- να αποτρέψει την εκδήλωση της βιολογικής δραστικότητας της βακτηριοσίνης, ενώ βρίσκεται ακόμα μέσα στο κύτταρο που την παράγει· και
- να δώσει το σήμα για την ενεργοποίηση του συστήματος μεταφοράς της βακτηριοσίνης (ABC-transporter και accessing protein) έξω από το κύτταρο.

Ο αριθμός των αμινοξέων που αποτελούν την αλληλουχία αυτή ποικίλλει από 14 μέχρι 30 αμινοξέα[4].

1.5 Μηχανισμός ρύθμισης της παραγωγής των βακτηριοσινών

Ο μηχανισμός ρύθμισης της σύνθεσης των βακτηριοσινών αποτελείται από τρία στοιχεία. Τον επαγωγικό παράγοντα (IF: Induction factor) και δύο πρωτεΐνες: από μία κινάση, την HPK (Histidine Protein Kinase: Ιστιδινική Κινάση) και τη ρυθμιστική πρωτεΐνη (RR: Response Regulator). Ο επαγωγέας απαιτείται όχι μόνο για την έναρξη της μετεγγραφής των γονιδίων του οπερονίου και της σύνθεσης της βακτηριοσίνης αλλά και για την εξα-

σφάλιση της διατήρησης της παραγωγής της. Η απομάκρυνση του επαγωγέα έχει ως άμεσο αποτέλεσμα τη διακοπή της παραγωγής της βακτηριοσίνης [5].

Το αμινοτελικό μέρος της κινάσης, το οποίο παίζει και το ρόλο του υποδοχέα, δηλαδή αλληλεπιδρά με τον επαγωγέα με σκοπό την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης, βρίσκεται στην περιπλασμική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης, ενώ το καρβοξυλικό τμήμα, που έχει το ρόλο της μετάδοσης του ερεθίσματος από τον επαγωγέα, βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά. Το καρβοξυλικό τμήμα της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται επίσης από την παρουσία ιστιδίνης, η οποία βοηθά στη διαδικασία της φωσφορυλίωσης, αλλά και από τη δράση της κινάσης (ένζυμο που βοηθά και αυτό τη διαδικασία φωσφορυλίωσης).

Η ρυθμιστική πρωτεΐνη περιέχει ένα αμινοτελικό υποδοχέα που αποτελείται από ασπαρτικό οξύ, που βοηθά στη φωσφορυλίωση και ένα καρβοξυλο-τελικό μέρος, το οποίο χρησιμεύει για την ενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή των βακτηριοσινών.

Όταν δεχτεί ο εξωτερικός υποδοχέας της κινάσης κάποιο συγκεκριμένο ερέθισμα (IF), το σήμα επεξεργάζεται και μεταφέρεται στον "αναμεταδότη" (καρβοξυλικό τμήμα της κινάσης) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου, που οδηγεί στη φωσφορυλίωση της ιστιδίνης. Η φωσφορυλιωμένη ιστιδίνη με τη σειρά της εξυπηρετεί ως ενδιάμεσο μέσο απόδοσης υψηλής ενέργειας, η οποία χρειάζεται για την επακόλουθη φωσφορυλίωση (η αντίδραση καταλύεται πάλι από την κινάση) του ασπαρτικού οξέος της ρυθμιστικής πρωτεΐνης. Η φωσφορυλίωση της τελευταίας προκαλεί αλλαγές στην καρβοξυλική πλευρά της, με αποτέλεσμα την υποκίνηση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των βακτηριοσινών (γονίδιο παραγωγής προ-πεπτιδίου, γονίδιο μεταφοράς και γονίδιο ρύθμισης της παραγωγής) [5].

Υπάρχουν δύο θεωρίες για το πώς προάγεται η παραγωγή των βακτηριοσινών [5]:

1. Η πρώτη θεωρεί ότι ο επαγωγέας παράγεται σταθερά σε χαμηλές ποσότητες με αποτέλεσμα τη σταδιακή συγκέντρωση του τελευταίου κατά την ανάπτυξη των κυττάρων. Όταν η συγκέντρωση του επαγωγέα περάσει μια κρίσιμη τιμή, που είναι απαραίτητη, έχουμε ως αποτέλεσμα την παραγωγή της βακτηριοσίνης.

2. Η δεύτερη θεωρία αναφέρει ότι η παραγωγή του επαγωγέα ρυθμίζεται έτσι ώστε η συγκέντρωσή του να βρίσκεται συνέχεια κάτω από μία κρίσιμη τιμή που απαιτείται για την παραγωγή των βακτηριοσινών. Διάφορες αλλαγές στις συνθήκες του περιβάλλοντος (μεταβολές στα θρεπτικά συστατικά ή στις φυσικοχημικές συνθήκες ανάπτυξης) μπορούν να προκαλέσουν μια προσωρινή αύξηση της παραγωγής του επαγωγέα που καταλήγει τελικά στην παραγωγή των βακτηριοσινών.

1.6 Σύστημα μεταφοράς των βακτηριοσινών έξω από το κύτταρο

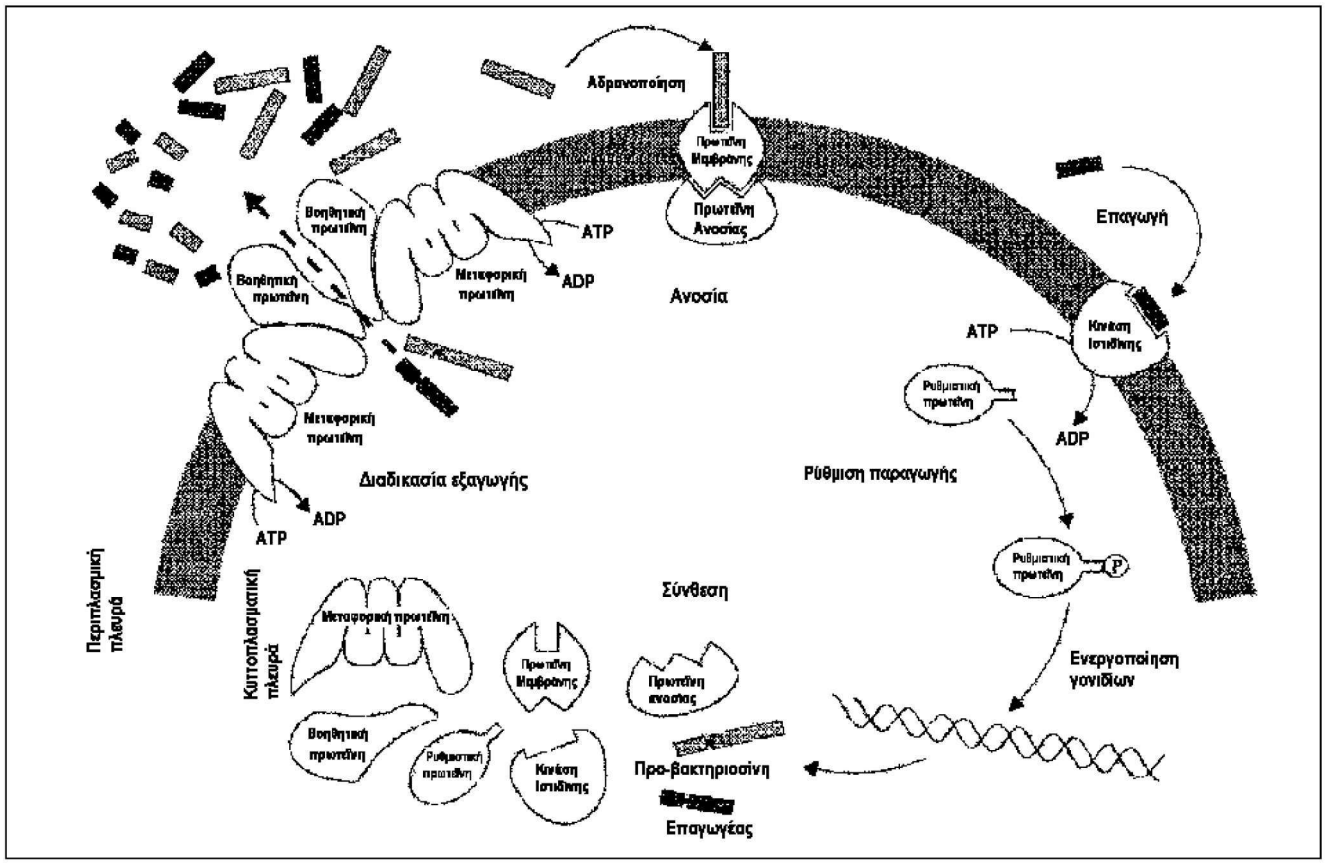
Το σύστημα μεταφοράς των βακτηριοσινών αποτελείται από δύο πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη, τη μεταφορική πρωτεΐνη (ABC-transporter) και τη συμπληρωματική (accessory) πρωτεΐνη. Η καταστροφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την παραγωγή μιάς εκ των δύο πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια της παραγωγής βακτηριοσίνης από το κύτταρο. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή της μεταφορικής πρωτεΐνης ανήκει στο οπερόνιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της βακτηριοσίνης ή βρίσκεται σε ξεχωριστό οπερόνιο σε μια γειτονική περιοχή.

Όλες οι μεταφορικές πρωτεΐνες αποτελούνται από δύο μέρη: από μία υδρόφοβη περιοχή και από μία κυτταροπλασματική καρβοξυλική περιοχή δέσμευσης ATP (ATP-binding region). Αυτές οι πρωτεΐνες μεταφοράς έχει αποδειχθεί όμως ότι φέρουν και μια αμινοτελική επέκταση που αποτελείται από 150 περίπου αμινοξέα, η οποία πιθανόν να έχει πρωτεολυτική δράση και να διασπά επιλεκτικά την κύρια αλληλουχία των αμινοξέων με τα δύο μόρια γλυκίνης (double-glycine leader) στα μόρια των προβακτηριοσινών. Από μελέτες αποδείχτηκε [16], ότι πραγματικά αυτό το αμινοτελικό πολυπεπτίδιο των μεταφορικών πρωτεϊνών είναι σε θέση να διασπά την κύρια αλληλουχία, αφού η αντικατάσταση της κυστεΐνης από αλανίνη είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της εξειδικευμένης αυτής δράσης των πρωτεϊνών-μεταφορέων. Με βάση αυτή την εργασία οι Havarstein et al. (1995)[16] πρότειναν την παρακάτω εξήγηση για την έξοδο από τα κύτταρα των βακτηριοσινών που περιέχουν την κύρια αλληλουχία των αμινοξέων (double-glycine leader): η πρωτεολυτική περιοχή της μεταφορικής πρωτεΐνης δεσμεύει την πρόδρομη ουσία της βακτηριοσίνης. Η υδρόλυση του ATP προκαλεί μεταβολές στην πρωτεϊνική δομή των μορίων της πρωτεΐνης-μεταφορέα που οδηγεί σε μια διαδικασία απομάκρυνσης της κύριας αλληλουχίας και μεταφορά του μορίου της βακτηριοσίνης διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

Για την έξοδο της βακτηριοσίνης από το κύτταρο απαιτείται και η βοήθεια μιας άλλης πρωτεΐνης (accessory protein), η οποία αποτελείται από 470 περίπου αμινοξέα. Ο ακριβής όμως ρόλος της πρωτεΐνης αυτής δεν έχει ακόμα διευκρινισθεί, αλλά πιστεύεται ότι διευκολύνει την μεταφορά της βακτηριοσίνης μέσω της μεμβράνης ή/και μπορεί να βοηθά στη διαδικασία απομάκρυνσης της κύριας αλληλουχίας [5].

1.7 Ανοσία των παραγωγών στελεχών

Η ανοσία των παραγωγών στελεχών οφείλεται στην παραγωγή πρωτεϊνών-ανοσίας και η παραγωγή αυτή κωδικοποιείται από γονίδιο που βρίσκεται στο οπερόνιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της βακτηριοσίνης. Τέτοια πρωτεΐνη είναι η LciA, της οποίας η παραγωγή κωδικοποιείται από το γονίδιο lciA. Η πρωτεΐνη αυτή παρέχει προστασία έναντι της βακτηριοσίνης LcnA. Η LciA είναι ένα κατιονικό πεπτίδιο, με MB περίπου 11kDa. Από μελέτες που έχουν γίνει φαίνεται ότι η LciA βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και πιθανόν να αντιδρά με τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς των βακτηριοσινών, ώστε να



Εικόνα 1. *Μηχανισμός παραγωγής των βακτηριοσινών (Βασισμένη σε στοιχεία από τη βιβλιογραφική παραπομπή 11).*
Figure 1. *Mechanism of production of the bacteriocins.*

αποτραπεί η δημιουργία πόρων.

Επίσης το γονίδιο nisI κωδικοποιεί την παραγωγή μιας πρωτεΐνης, της NisI που αποτελείται από 226 αμινοξέα και η οποία προσφέρει προστασία στο παραγωγό στέλεχος από τη δράση της νισίνης. Η σύνθεση της NisI γίνεται και αυτή στην κυτταροπλασματική περιοχή της μεμβράνης και έχει αποδειχθεί στο μόριό της η παρουσία μιας τυπικής λιποπρωτεϊνικής αλληλουχίας από 19 αμινοξέα μέσω της οποίας προσκολλάται στη μεμβράνη και αντιδρά με τη νισίνη με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της τελευταίας [11,17].

Στην Εικόνα 1 δίνεται μια γραφική απεικόνιση του όλου μηχανισμού παραγωγής, ρύθμισης της παραγωγής και εξόδου των βακτηριοσινών από το κύτταρο, καθώς και του μηχανισμού προστασίας του ίδιου του βακτηριακού κυττάρου από τη δράση της παραγόμενης βακτηριοσίνης [11].

1.8 Τρόπος δράσης των βακτηριοσινών

Ο μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών αποτελεί μια διαδικασία, η οποία μπορεί, γενικά, να διακριθεί σε δύο στάδια [3]:

1. Η πρώτη φάση συνίσταται στην προσρόφηση της βακτηριοσίνης πάνω σε εξειδικευμένους ή μη υποδοχείς, που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των ευαίσθητων στελεχών. Στο στάδιο αυτό οι βακτηριοσίνες δεν προκαλούν καμία αλλοίωση στο κύτταρο. Αυτή η φάση είναι αντιστρεπτή και η απομάκρυνση της βακτηριοσίνης (π.χ. με δράση πρωτεασών) κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού, έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της δομής της μεμβράνης χωρίς να προκληθούν βλάβες στα βακτηριακά κύτταρα.

2. Η δεύτερη φάση είναι μη αντιστρεπτή και περιλαμβάνει αλλοιώσεις στα ευαίσθητα κύτταρα, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε βακτηριοσίνη.

Γενικά η κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων αποτελεί τον κύριο στόχο δράσης των βακτηριοσινών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αφ' ενός την απώλεια ιόντων και άλλων σημαντικών κυτταρικών συστατικών, όπως για παράδειγμα των αμινοξέων, που περιέχονται μέσα στο κύτταρο και αφ' ετέρου την παρεμπόδιση μεταφοράς των αμινοξέων μέσα στα βακτηριακά κύτταρα [18].

Αυτή η διαπίστωση βεβαιώνεται από διάφορες μελέτες που έχουν γίνει πάνω στον τρόπο δράσης των βακτηριοσινών. Από την κλάση Ι των λαντιβιοτικών έχει διαπιστωθεί ότι η νισίνη δρα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη δημιουργώντας πόρους με αποτέλεσμα την έξοδο κυτταρικών υλικών, όπως ATP και αμινοξέων ή υπάρχουν περιπτώσεις που συμβαίνει λύση του κυττάρου, λόγω αύξησης της ωσμωτικής πίεσης. Οι πόροι που σχηματίζονται δεν έχουν πολύ μεγάλη διάμετρο με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η έξοδος από το κύτταρο των μεγαλομοριακών ενώσεων και λόγω της αύξησης των ωσμωτικών φαινομέ-

νων αρχίζει να εισέρχεται μέσα στο κύτταρο νερό. Έρευνες έχουν δείξει επίσης ότι η νισίνη παρεμποδίζει και τη σύνθεση μουρεΐνης, η οποία αποτελεί σημαντικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των Gram (+) μικροοργανισμών (30-70%) [18].

Σε πειράματα με το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* με την απευθείας προσθήκη νισίνης αποδείχτηκε ότι υπήρχε άμεση απώλεια κυτταρικών ιόντων K^+, αποπόλωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (απώλεια του δυναμικού της μεμβράνης), υδρόλυση και μερική εκροή κυτταρικού ATP. Αυτά τα στοιχεία επομένως δείχνουν ότι η κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων αποτελεί τον πρώτο και κύριο στόχο των βακτηριοσινών [19].

Η δημιουργία πόρων πάνω στην κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι αποτέλεσμα της διαφοράς δυναμικού (Δψ), που υπάρχει μέσα και έξω από το κύτταρο (Voltage-dependent pore formation) και απαιτείται μια κρίσιμη τιμή δυναμικού (threshold potential) για τη δημιουργία αυτών των πόρων στη μεμβράνη του κυττάρου. Η κρίσιμη τιμή δυναμικού εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως το pH και η σύσταση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, με τα οποία αλληλεπιδρά η νισίνη για τη διάσπαση της δομής της κυτταροπλασματικής μεμβράνης [17, 18].

Η δέσμευση της νισίνης πάνω στην κυτταρική μεμβράνη γίνεται με τη βοήθεια υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Έχει αποδειχτεί ότι η νισίνη σχηματίζει δεσμούς με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια. Δηλαδή σχηματίζονται δεσμοί μεταξύ των θετικά φορτισμένων μορίων της λυσίνης (αμινοξέος που περιέχεται στο μόριο της νισίνης) και των ανιόντων (αρνητικά φορτισμένα μόρια) των φωσφολιπιδίων, όπως είναι η φωσφατιδυλο-γλυκερόλη (PG) ή/και η διφωσφατιδυλο-γλυκερόλη (καρδιολιπίνη) [20, 21]. Σημαντικό ρόλο για τη διαπέραση και τη διάσπαση από τα λαντιβιοτικά της δομής της στιβάδας των λιπιδίων παίζει το αμινοτελικό άκρο της βακτηριοσίνης. Η αντικατάσταση της ισολευκίνης του αμινοτελικού άκρου με τρυπτοφάνη είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας της νισίνης να διαπεράσει μέσα στη μεμβράνη [22].

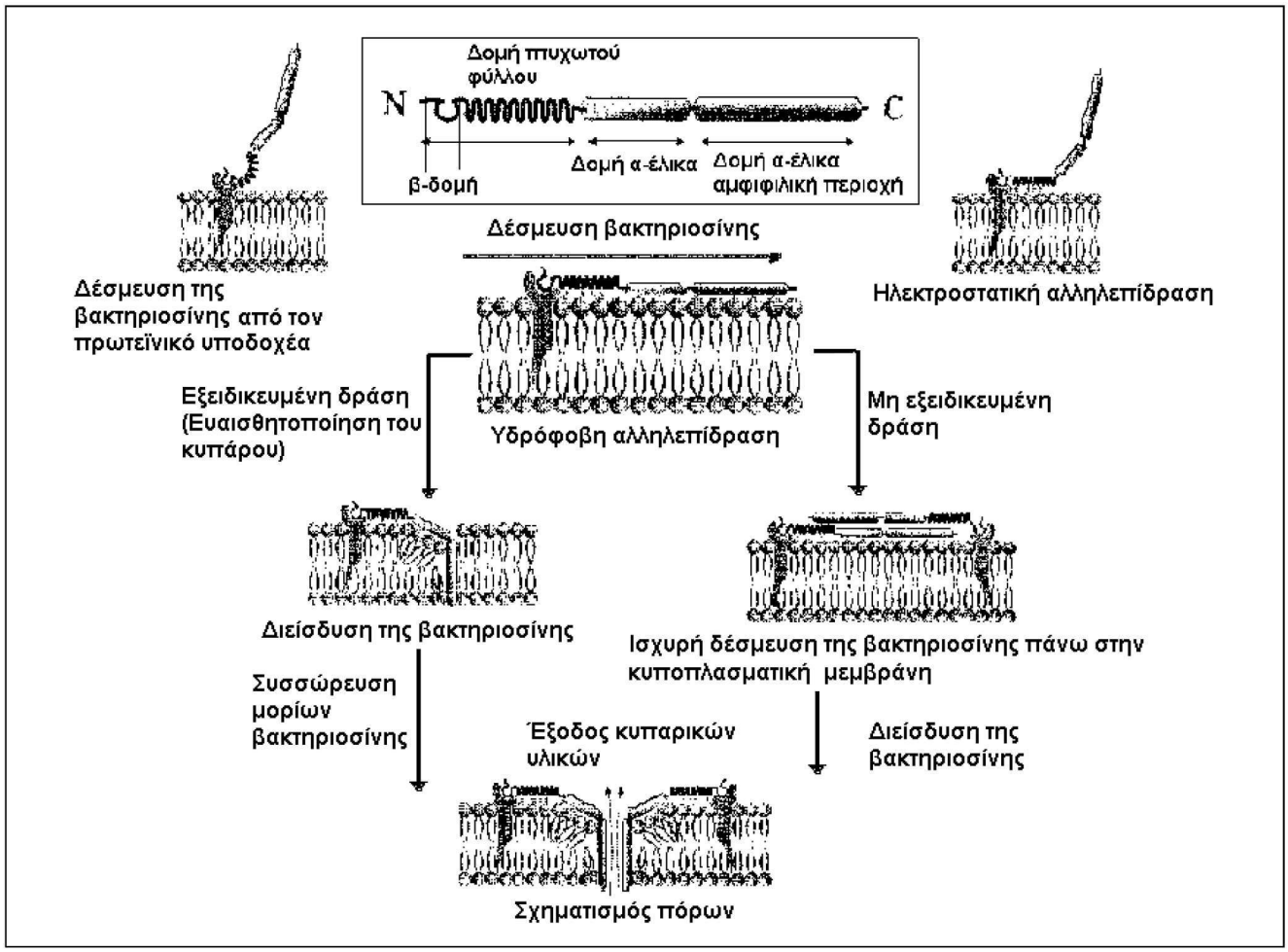
Η μειωμένη ικανότητα της νισίνης να σχηματίσει πόρους στα κύτταρα παρουσία δισθενών και τρισθενών ιόντων (Mg^{2+}, Ca^{2+} ή Gd^{3+}) μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα ιόντα αυτά αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα τμήματα της PG και της καρδιολιπίνης, που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, με αποτέλεσμα τη μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των θετικά φορτισμένων βακτηριοσινών και των αρνητικά φορτισμένων τμημάτων των μορίων των φωσφολιπιδίων [17, 18].

Η λακτοκοκκίνη A (Lcn A) που παράγεται από το μικροοργανισμό *Lactococcus lactis* είναι η πρώτη βακτηριοσίνη από την κλάση II, η οποία μελετήθηκε εκτεταμένα. Είναι ένα μικρό υδρόφοβο πεπτίδιο που αποτελείται από 54 αμινοξέα και εμποδίζει την ανάπτυξη των στελεχών των λακτοκόκκων. Από πειράματα που έγιναν [23] αποδείχτηκε ότι η βακτηριοσίνη αυξάνει τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των ευαίσθητων λακτοκόκκων. Σε αντίθεση με τις βακτηριοσίνες της πρώτης κατηγορίας, οι οποίες προκαλούν διαταραχή της δομικής ακεραιότητας της μεμβράνης, αυτές της κλάσης II διαταράσσουν τη λειτουργία της ανεξάρτητα από τη διαφορά δυναμικού (Δψ) που επικρατεί. Αποτέλεσμα της επίδρασης στη διαπερατότητα της μεμβράνης είναι η διαταραχή της διαβάθμισης της συγκέντρωσης των πρωτονίων (PMF: proton motive force) και της λειτουργίας της ως μηχανισμού για την παραγωγή ενέργειας (PMF depletion) [17]. Η εξειδίκευση που παρουσιάζει η βακτηριοσίνη για τους λακτόκοκκους μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδραση αυτής με συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς υποδοχείς που βρίσκονται μόνο στη μεμβράνη των μικροοργανισμών αυτών. Αυτή η υπόθεση αποδείχτηκε αργότερα με την επεξεργασία των κυττάρων με πρωτεάση K, η οποία μετέτρεψε τα κύτταρα ανθεκτικά στη Lcn A, αφού είχαν διασπασθεί οι πρωτεϊνικοί υποδοχείς από τη δράση της πρωτεάσης [24].

Η πιο καλά μελετημένη βακτηριοσίνη από την κλάση IIα που παρουσιάζει δράση εναντίον της *Listeria monocytogenes* είναι η πεδιοσίνη PA-1/AcH, που παράγεται από το μικροοργανισμό *Pediococcus acidilactici*. Η βακτηριοσίνη είναι ένα υδρόφοβο μόριο, θετικά φορτισμένο και αποτελείται από 44 αμινοξέα. Δρα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με αποτέλεσμα την έξοδο πολύτιμων κυτταρικών στοιχείων και διακόπτει τη μεταφορά των αμινοξέων μέσα στα κύτταρα. Η πρωτεΐνη περιέχει δύο δισουλφιδικούς δεσμούς που βρίσκονται μεταξύ των μορίων της κυστεΐνης στις θέσεις 24 και 44, οι οποίοι είναι σημαντικοί για τη δραστικότητα της βακτηριοσίνης. Είναι πιθανό η πεδιοσίνη PA-1/AcH, όπως και άλλες βακτηριοσίνες που ανήκουν στην ίδια κατηγορία (σακακίνη A και P, λευκοκίνη A, κουρβακίνη A και καρνοβακτηριοσίνη BM1 και B2), να σχηματίζουν πόρους πάνω στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων στόχων με τη μεσολάβηση ενός πρωτεϊνικού υποδοχέα, ανεξάρτητα από τη διαφορά δυναμικού (Δψ) που επικρατεί, όπως και στην περίπτωση δηλαδή της Lcn A [17, 18].

Τα Gram (+) βακτήρια χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη συγκέντρωση ανιονικών (αρνητικά φορτισμένων) λιπιδίων στην κυτταρική τους μεμβράνη. Λόγω του κατιονικού χαρακτήρα των βακτηριοσινών (θετικά φορτισμένες), ο ρόλος των λιπιδίων είναι πολύ σημαντικός για τη δέσμευση των βακτηριοσινών πάνω στην κυτταρική μεμβράνη. Επίσης σημαντικό ρόλο στη δέσμευση των βακτηριοσινών παίζουν και τα θετικά φορτία στην περιοχή του καρβοξυ-τελικού άκρου της βακτηριοσίνης. Επιπλέον, οι βακτηριοσίνες της δεύτερης κατηγορίας εξαρτώνται και από τα ανιονικά φωσφολιπίδια για την αρχική της δέσμευση με τη μεμβράνη. Σημαντικό επίσης ρόλο όσον αφορά την αρχική αλληλεπίδραση των βακτηριοσινών με το κυτταρικό τοίχωμα, έχουν τα ανιονικά πολυμερή συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των Gram (+) βακτηρίων, όπως το τοιχοϊκό και το λιποτοιχοϊκό οξύ [22].

Από τα παραπάνω στοιχεία γίνεται φανερό ότι γενικά



Εικόνα 2. *Σχηματισμός πόρων πάνω στην κυτταρική μεμβράνη κατά τη δράση των βακτηριοσινών (Βασισμένη σε στοιχεία από τη βιβλιογραφική παραπομπή 11).*
Figure 2. *Mode of action of the bacteriocins: formation of hydrophilic pores.*

η δραστικότητα των βακτηριοσινών είναι αποτέλεσμα των υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων των αμφιφιλικών, θετικά φορτισμένων πεπτιδίων με την κυτταροπλασματική μεμβράνη [25].

Στην Εικόνα 2 δίνεται μια γραφική απεικόνιση του μηχανισμού δημιουργίας πόρων πάνω στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων [11].

1.9 Αντιμικροβιακό φάσμα δράσης των βακτηριοσινών

Το αντιμικροβιακό φάσμα δράσης μιας συγκεκριμένης βακτηριοσίνης καθορίζεται εν μέρει από την παρουσία των κατάλληλων υποδοχέων πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες των ευαίσθητων μικροοργανισμών. Οι βακτηριοσίνες οι οποίες παράγονται από τους μικροοργανισμούς, έχουν κυρίως δράση εναντίον στελεχών που ανήκουν στο ίδιο ή σε συγγενές είδος με το παραγωγό στέλεχος, αλλά υπάρχουν και βακτηριοσίνες οι οποίες διαθέτουν ευρύτερο φάσμα δράσης, συμπεριλαμβανομένων και Gram (-) βακτηρίων [3].

Τα Gram (-) βακτήρια (π.χ. *Salmonella* spp.), γενικά είναι ανθεκτικά στις βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων λόγω της σύνθεσης της εξωτερικής τους μεμβράνης, η οποία τα προστατεύει από τη δράση των βακτηριοσινών. Όμως η παρουσία διαφόρων χηλικών ενώσεων (EDTA) ή κιτρικού οξέος έχουν ως αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί αυτοί να είναι ευαίσθητοι στις διάφορες βακτηριοσίνες, λόγω της δέσμευσης των ιόντων Mg^{2+} στη λιποπολυσακχαρική στιβάδα της εξωτερικής μεμβράνης των Gram (-) βακτηρίων, καταλήγοντας στην αλλοίωση της διαπερατότητάς της [26].

Η ανθεκτικότητα των Gram (-) μικροβίων έναντι των βακτηριοσινών των οξυγαλακτικών βακτηρίων μπορεί να αποδοθεί στη σύνθεση και σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων τους, η οποία διαφέρει από αυτή των Gram (+) μικροοργανισμών. Και στους δύο τύπους των μικροβίων, η κυτταροπλασματική μεμβράνη, που αποτελεί το φυσικό εμπόδιο μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του εξωτερικού περιβάλλοντος, περιβάλλεται από μια στιβάδα πεπτιδογλυκάνης. Αυτή η στιβάδα στα Gram (-) βακτήρια είναι αρκετά πιο λεπτή από ό,τι στα Gram (+). Αυτό συμβαίνει

διότι τα Gram (-) βακτήρια διαθέτουν μια επιπλέον στιβάδα, την εξωτερική μεμβράνη, η οποία αποτελείται από φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίδια (LPS) και αυτή η μεμβράνη είναι αδιαπέραστη από την πλειονότητα των ουσιών. Επίσης η παρουσία μικρών πόρων σε αυτή τη στιβάδα επιτρέπει την ελεύθερη διάχυση των μορίων με MB<600 Da, ενώ η μικρότερη σε μέγεθος βακτηριοσίνη που παράγεται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχει περίπου MB 3 kDa και επομένως είναι αρκετά μεγάλη για να μπορέσει να διαπεράσει την εξωτερική μεμβράνη, ώστε να φτάσει το στόχο που είναι η κυτταροπλασματική μεμβράνη [18].

Η βακτηριοκτόνος δράση των βακτηριοσινών της κλάσης IIα είναι κυρίως εναντίον διαφόρων στελεχών του γένους *Listeria*. Εκτός του γένους αυτού, άλλα γένη που παρουσιάζουν ευαισθησία σε αυτή την κλάση των βακτηριοσινών είναι: *Lactobacillus, Leuconostoc, Enterococcus, Bacillus, Brochothrix, Carnobacterium, Pediococcus* και *Micrococcus*. Οι βακτηριοσίνες αυτής της κατηγορίας ενώ παρουσιάζουν παρόμοια αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Listeria* spp., ομοιότητα που μάλλον οφείλεται στην ομοιογενή λιπιδική σύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών σε αυτό το γένος, ποικίλλει σημαντικά η δράση όχι μόνο μέσα στο ίδιο το είδος αλλά και από στέλεχος σε στέλεχος [11].

1.10 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή και τη δραστικότητα των βακτηριοσινών

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή των βακτηριοσινών από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, είναι οι παρακάτω [2]:

1. Το μικροβιακό στέλεχος: μια βακτηριοσίνη είναι δυνατό να παράγεται από αρκετά στελέχη ή/και είδη. Οι Yang και Ray (1994)[27] βρήκαν ότι η παραγωγή της νισίνης και της λευκονοσίνης Lcm1 ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων στελεχών, ενώ η πεδιοσίνη AcH παρουσίασε μικρότερη παραλλακτικότητα.

2. Φυσιολογικό στάδιο του παραγωγού-στελέχους: ανάλογα σε ποια φάση αύξησης βρίσκεται το παραγωγό-στέλεχος, επηρεάζεται και η παραγωγή των βακτηριοσινών. Η μέγιστη συγκέντρωση της ελβετισίνης J παρατηρήθηκε στο μέσο ή στο τέλος της λογαριθμικής φάσης αύξησης του παραγωγού-στελέχους[8], ενώ η παραγωγή της λακτοσίνης S έφτασε στο μέγιστο σημείο της στο τέλος της λογαριθμικής και στην αρχή της στατικής φάσης ανάπτυξης του παραγωγού-στελέχους [28]. Υπάρχουν όμως και βακτηριοσίνες οι οποίες παράγονται στην αρχή της λογαριθμικής φάσης, όπως συμβαίνει με το στέλεχος *Leuconostoc gelidum* UAL 187[13]. Η απώλεια της δραστικότητας των βακτηριοσινών που παρατηρείται σε περιπτώσεις παρατεταμένης επώασης, είναι αποτέλεσμα της αδρανοποίησής τους από την επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων που παράγονται από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς. Επίσης πιθανό είναι και το γεγονός, ορισμένες βακτηριοσίνες να μην είναι σταθερές κάτω από τις αυξανόμενες όξινες συνθήκες που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού [29].

3. Θρεπτικό υπόστρωμα: η παραγωγή των βακτηριοσινών επηρεάζεται σημαντικά από τον τύπο και το επίπεδο των θρεπτικών συστατικών σε άνθρακα, άζωτο και φωσφόρο, αλλά και από την παρουσία διαφόρων κατιόντων και παρεμποδιστικών παραγόντων. Οι βακτηριοσίνες παράγονται σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν διαφορετικές πηγές άνθρακα, όπως γλυκόζη, σακχαρόζη και ξυλόζη. Μελέτες έχουν δείξει ότι κάποιες από τις ουσίες αυτές αποτελούν για ορισμένες βακτηριοσίνες την καλύτερη πηγή άνθρακα, αφού πετυχαίνεται μεγαλύτερη παραγωγή [30, 31, 32]. Επίσης, η τελική συγκέντρωση και δραστικότητα των βακτηριοσινών επηρεάζεται από την αρχική συγκέντρωση των υδατανθράκων. Οι De Vuyst και Vandamme (1992)[33] προσδιόρισαν ότι η μέγιστη δραστικότητα της νισίνης επιτυγχάνεται με συγκέντρωση σακχαρόζης 30 g/l. Η παραγωγή των βακτηριοσινών συχνά παρεμποδίζεται περισσότερο από το διαθέσιμο άζωτο παρά από τη διαθέσιμη ποσότητα του άνθρακα. Οι Kim et al. (1997) [34] παρατήρησαν ότι η μέγιστη συγκέντρωση της νισίνης αυξάνει με την αύξηση του περιεχόμενου οργανικού αζώτου στο θρεπτικό υπόστρωμα. Ακόμα ο τύπος της πηγής του αζώτου επηρεάζει την παραγωγή των βακτηριοσινών. Η παρουσία ανιόντων (φωσφορικά) και κατιόντων (Mg^{2+}, Ca^{2+}) επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή βακτηριοσινών, αλλά η επίδρασή τους παρουσιάζει εξειδίκευση σε ορισμένα μόνο στελέχη. Η παρουσία του tween 80 (polyoxyethylene sorbitan mono-oleate) φαίνεται να προάγει την παραγωγή ορισμένων βακτηριοσινών [32, 35, 36]. Το tween 80 μπορεί να επηρεάζει έμμεσα τη δραστικότητα των βακτηριοσινών στο διάλυμα αποτρέποντας την προσρόφηση των τελευταίων στα μικροβιακά κύτταρα [37]. Τέλος, η προσθήκη αιθανόλης (1% v/v), αυξάνει την παραγωγή και τη δράση της λακτοσίνης S [28] και αμυλοβορίνης L471 [38].

4. Συνθήκες ζύμωσης: το pH επηρεάζει άμεσα την παραγωγή των βακτηριοσινών. Η άριστη τιμή pH για την παραγωγή τους κυμαίνεται συνήθως στο 5,5-6,0 [39, 40, 41], συχνά μικρότερη από την άριστη τιμή ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Λίγες βακτηριοσίνες παράγονται μόνο σε χαμηλότερο pH (5,0) [27, 28, 30, 31]. Η ανάπτυξη των μικροβιακών στελεχών στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης έχει ως αποτέλεσμα τη μέγιστη παραγωγή των βακτηριοσινών [32, 36, 39, 41, 42]. Υπάρχουν όμως περιπτώσεις που η τιμή της θερμοκρασίας για τη μέγιστη παραγωγή βακτηριοσίνης είναι μικρότερη από την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης [38]. Τέλος, υπάρχουν ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια που παράγουν περισσότερες από μία βακτηριοσίνες. Για παράδειγμα, το βακτήριο *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52, παράγει δύο βακτηριοσίνες, τη μεσεντεροσίνη 52A με μέγιστη παραγωγή σε pH 5,5 και σε θερμοκρασία 20 °C και την 52B με μέγιστη παραγωγή σε pH 5,0 και σε θερμοκρασία 25 °C [43].

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστικότητα των βακτηριοσινών που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι οι εξής [18]:

1. Οι εσωτερικοί παράγοντες του τροφίμου: η δραστικότητα των βακτηριοσινών έναντι των ευαίσθητων μικροοργανισμών επηρεάζεται σημαντικά από διάφορους πα-

ράγοντες του τροφίμου, όπως το pH, η συγκέντρωση των κυττάρων, η σύσταση σε λιπίδια, τα πρωτεολυτικά ένζυμα και η σχέση μεταξύ υγρής και στερεής φάσης [1]. Για παράδειγμα, η αποτελεσματικότητα της νισίνης έναντι της *Listeria monocytogenes* μειώνεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία δισθενών και τρισθενών ιόντων (Mg^{2+}, Ca^{2+} ή Gd^{3+}) [19], τα οποία πιθανόν να αντιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα τμήματα των φωσφολιπιδίων (PG και καρδιολιπίνη) που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη [44, 45].

2. Θερμοκρασία: η θερμοκρασία επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο δρουν οι βακτηριοσίνες. Η εκροή ιόντων K^+ από τα κύτταρα της *Listeria monocytogenes* αυξάνει, λόγω παρουσίας της νισίνης, όταν η ανάπτυξη του μικροοργανισμού γίνει σε θερμοκρασία 30 °C, ενώ μειώνεται σημαντικά σε χαμηλές θερμοκρασίες [19].

3. Ανθεκτικότητα στις βακτηριοσίνες: έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί αντίστασης στη νισίνη όπως είναι: η έκκριση νισινάσης, ενός ενζύμου το οποίο διασπά τη νισίνη. Το ένζυμο αυτό έχει απομονωθεί από αρκετά είδη του γένους *Bacillus* και είναι μια δεϋδροπεπτιδική ρεδουκτάση, η οποία εξειδικευμένα διασπά το καρβοξυλοτελικό άκρο της νισίνης, τη δεϋδροαλανυλο-λυσίνη σε αλανυλο-λυσίνη [46]. Άλλος μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι η προσαρμογή των κυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις βακτηριοσινών. ❑

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

1. Ray B and Daeschel MA. Food biopreservatives of microbial origin. CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.
2. Parente E and Ricciardi A. Production, recovery and purification of bacteriocins in lactic acid bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 1999, 52:628-638.
3. Tagg JR, Dajani AS and Wannamaker LW. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol Rev 1976, 40: 722-755.
4. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 1993, 12:39-86.
5. Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V and Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Ant van Leeuwenh 1996, 70:113-128.
6. Caplice E and Fitzgerald GF. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int J Food Microbiol 1999, 50:131-149.
7. Abee T, Klaenhammer TR and Letellier L. Kinetic studies on the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. Appl Environ Microbiol 1994, 60:1006-1013.
8. Joerger MC and Klaenhammer TR. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined, bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J Bacteriol 1986, 167:439-446.
9. Piard JC and Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait 1992, 72:113-142.
10. Rammelsberg M and Radler F. Antimicrobial polypeptides of *Lactobacillus* species. J Appl Bacteriol 1990, 69:177-184.
11. Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K and Ishizaki A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol Rev 2000, 24:85-106.
12. Dodd HM and Gasson MJ. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Edt: M. J. Gasson and W. M. de vos Blackie. Academic and Professional, an Imprint of Chapman and Hall, Glasgow, U.K. 1994: 211-251.
13. Stiles ME and Hastings JW. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. Trends Food Sci Technol 1991, 2:247-251.
14. Diep DB, Havarstein LS, Nissen-Meyer J and Nes IF. The gene encoding plantaricin, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. Appl Environ Microbiol 1994, 60:160-166.
15. Diep DB, Havarstein LS and Nes IF. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. J Bacteriol 1996, 178:4472-4483.
16. Havarstein LS, Diep BD and Nes IF. A family of bacteriocin ABC-transporters carries out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. Mol Microbiol 1995, 16:229-240.
17. Abee T. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. FEMS Microbiol Lett 1995, 129:1-10.
18. Abee T, Krockel L and Hill C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Int J Food Microbiol 1995, 28:169-185.
19. Abee T, Rombouts FM, Hugenholtz J, Guihard G and Letellier L. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. Appl Environ Microbiol 1994, 60:1962-1968.
20. Driessen AJM., van den Hooven HW, Kuiper W, van de Kamp M, Sahl HG, Konings RNH and Konings WN. Mechanistic studies of lantibiotic induced permeabilization of phospholipid vesicles. Biochem 1995, 34:1606-1614.
21. Garcia-Garcera MJ, Elferink MGL, Driessen AJM and Konings WN. In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of proton motive force and lipid composition. Eur J Biochem 1993, 212:417-422.
22. Moll GN, Konings WN and Driessen JM. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Ant van Leeuwenh 1999, 70:185-198.
23. Van Belkum MJ, Kok J, Venema G, Holo H, Nes IF, Konings WN and Abee T. The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. J Bacteriol 1991, 173:7934-7941.
24. Venema K, Haverkort RE, Abee T, Haandrikman AJ, Leenhouts KJ, de Leij L, Venema G and Kok J. Mode of action of Lci A, the lactococcin A immunity protein. Mol Microbiol 1994, 14:521-532.
25. Ganzle MG, Weber S and Hammes WP. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. Int J Food Microbiol 1999, 46:207-217.
26. Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA and Klaenhammer TR. Nisin treatment for the inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. Appl Environ Microbiol 1991, 57:3613-3615.
27. Yang R and Ray B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol 1994, 11:281-291.
28. Mortvedt-Abildgaard C, Nissen-Meyer J, Jelle B, Grenov, Skaugen M and Nes IF. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake*. Appl Environ Microbiol 1995, 61:175-179.
29. Schillinger U, Kaya M and Lucke FK. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. J Appl Bacteriol 1990, 70:473-478.
30. Barcena BJM, Sineriz F, Gonzalez de Llano D, Rodriguez A and

Suarez JE. Chemo-stat production of plantaricin C by *Lactobacillus plantarum* LL41. Appl Environ Microbiol 1998, 64:3512-3514.

31. Biswas SR, Ray P, Johnson MC and Ray B. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl Environ Microbiol 1991, 57:1265-1267.
32. Matsusaki H, Endo N, Sonomoto K and Ishikazi A. Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. Appl Microbiol Biotechnol 1996, 45:36-40.
33. De Vuyst L and Vandamme EJ. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentation. J Gen Microbiol 1992, 138:571-578.
34. Kim WS, Hall RJ and Dunn NW. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. Appl Microbiol Biotechnol 1997, 50:429-433.
35. Parente E and Hill C. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. J Appl Bacteriol 1992, 73:290-298.
36. Daba H, Lacroix C, Huang J and Simard R. Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. Appl Microbiol Biotechnol 1993, 39:166-173.
37. Joosten HMLJ and Nunez M. Adsorption of nisin and enterocin 4 to polypropylene and glass surface and its prevention by tween 80. Lett Appl Microbiol 1995, 21:389-392.
38. De Vuyst L, Callewaert R and Crabbe K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. Microbiol 1996, 142:817-827.
39. Meghrous J, Huot M, Quittelier M and Petitdemange H. Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Res Microbiol 1992, 143:879-890.
40. Kaiser AL and Montville TJ. The influence of pH and growth rate on the production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. J Appl Bacteriol 1993, 75:536-540.
41. Parente E and Ricciardi A. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. Lett Appl Microbiol 1994, 19:12-15.
42. Lejeune R, Callewaert R, Crabbe K and de Vuyst L. Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. J Appl Bacteriol 1998, 84:159-168.
43. Krier F, Revol-Junelles AM and Germain P. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 1998, 50:359-363.
44. Harwood JL and Russel NJ. Lipids in plants and microbes. George Allen and Unwin, London, UK, 1984.
45. O' Leary WM and Wilkinson SG. Gram-positive bacteria. In: R. Ratledge and S.G. Wilkinson (editors), Microbial Lipids, Acad. Press, London, 1988:117-201.
46. Hurst A. Nisin. Adv Appl Microbiol 1981, 27:85-123.