

Urszula Błaszczyk*, Kamila Dąbrowska

Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano we wrześniu 2017 r.

1. Charakterystyka i klasyfikacja bakteriocyn cyklicznych. 2. Genetyka bakteriocyn cyklicznych. 3. Biosynteza bakteriocyn cyklicznych. 4. Struktura bakteriocyn cyklicznych. 5. Mechanizmy działania bakteriocyn cyklicznych. 6. Enterocyna AS-48. 7. Potencjalne zastosowanie bakteriocyn cyklicznych. 8. Podsumowanie

Characteristics and potential applications of circular bacteriocins

Abstract: Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides or proteins exerting antagonistic activity toward organisms which are closely related to the producer strain. Circular bacteriocins are produced by Gram-positive bacteria, mainly lactic acid bacteria, and to a lesser extent by *Bacillus*, *Clostridium* and *Staphylococcus* genera. These bacteriocins are characterized by the head-to-tail cyclization of their backbone. The circular nature of these peptides makes them resistant to many proteolytic enzymes and provides great thermal and pH stability. Circular bacteriocins are divided into 2 subgroups based on their physicochemical properties and sequence identity. These bacteriocins are synthesized as linear precursors with a leader sequence which is cleaved off during maturation. The mature circular peptides are composed of 58–70 amino acid residues. Biosynthesis of circular bacteriocins requires three stages: cleavage of the leader sequence, circularization and export out of the cell. Circular bacteriocins have broad antimicrobial activity spectrum, including many food spoilage bacteria and pathogens, such as *Listeria*, *Staphylococcus* and *Clostridium* spp. Circular bacteriocins permeabilize the membrane of sensitive bacteria, causing loss of ions and dissipation of the membrane potential, and finally cell death. Enterocin AS-48 was the first identified circular bacteriocin and is best characterized so far. Circular bacteriocins or bacteriocin-producing lactic acid bacteria have great potential in food preservation, and possibly in pharmaceutical and cosmetic industries. Thanks to their properties, circular bacteriocins could be an alternative not only to preservatives and methods used to provide microbial food safety presently, but also to less stable, linear bacteriocins.

1. Characteristics and classification of circular bacteriocins. 2. Genetics of circular bacteriocins. 3. Biosynthesis of circular bacteriocins. 4. Structure of circular bacteriocins. 5. Modes of action of circular bacteriocins. 6. Enterocin AS-48. 7. Potential applications of circular bacteriocins. 8. Summary

Słowa kluczowe: aktywność antymikrobiologiczna, bakterie kwasu mlekowego, bakteriocyny cykliczne, enterocyna AS-48

Key words: antimicrobial activity, lactic acid bacteria, circular bacteriocins, enterocin AS-48

1. Charakterystyka i klasyfikacja bakteriocyn o budowie cyklicznej

Bakteriocyny stanowią zróżnicowaną funkcjonalnie rodzinę toksyn, a specyficzną cechą, która je łączy jest fakt, że są peptydami lub białkami syntetyzowanymi rybosomalnie. Wykazują działanie antagonistyczne w stosunku do szczepów przeważnie blisko spokrewnionych z producentem bakteriocyny, który jednocześnie posiada specyficzny sprzężony mechanizm immunologiczny chroniący go przed działaniem własnej toksyny [15, 42]. Bakteriocyny cykliczne wytwarzane są przez bakterie Gram-dodatnie, a ich antagonistyczna aktywność skierowana jest głównie w stosunku do bakterii kwasu mlekowego oraz bakterii z rodzajów *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus* i *Clostridium* [26]. W związku ze znacznym zróżnicowaniem bakteriocyn, peptydy cykliczne klasyfikowane są w niejednoznaczny sposób, m.in. jako należące do podklasy IIc według Cottera i wsp.

[2005], do podklasy IId według Nes i wsp. [2007], często zaliczane są również do nowej klasy IV (przy podziale bakteriocyn na lantibiotyki, termostabilne niezmodyfikowane postranslacyjnie bakteriocyny, duże termolabilne bakteriocyny i bakteriocyny cykliczne) [18, 45, 54] lub do nowo utworzonej klasy V uwzględniając podział Klaenhammera [47, 50, 75]. Bakteriocyny cykliczne charakteryzują się obecnością wiązania peptydowego między C- i N-końcem cząsteczki i cyklizacją szkieletu w układzie „głowa-ogon” („head-to-tail”). Budowa cykliczna czyni te bakteriocyny odpornymi na wiele enzymów proteolitycznych oraz działanie wysokich temperatur. Mimo iż peptydy o zbliżonej strukturze zostały zidentyfikowane w organizmach ssaków, roślin i grzybów, w odróżnieniu od cyklicznych polipeptydów produkowanych przez organizmy eukariotyczne, cykliczne bakteriocyny nie zawierają mostków disiarczkowych. Ponadto w przeciwieństwie do większości peptydów o budowie cyklicznej, które są wytwarzane jako

* Autor korespondencyjny: Urszula Błaszczyk, Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków; tel. 12 662 47 90; e-mail: urszula.blaszczyk@urk.edu.pl

prekursory powstające dzięki wydłużeniu końców C i N, bakteriocyny cykliczne syntetyzowane są w wyniku wydłużenia jedynie N-końca [86].

Pierwszą bakteriocyną cykliczną, która została wyizolowana i zidentyfikowana, jest enterocyna AS-48, wytwarzana przez *Enterococcus faecalis*, dlatego obecnie jest najlepiej poznanym związkem tego typu. Od odkrycia AS-48 w 1986 roku [29] i opisanie jej cyklicznej natury [79] do chwili obecnej zidentyfikowano kilkanaście innych bakteriocyn cyklicznych (Tab. I). Liczba ta jest jednak nieporównywalnie mniejsza od liczby opisanych bakteriocyn o strukturze liniowej. Ze względu na właściwości fizykochemiczne i podobieństwo sekwencji genu kodującego, bakteriocyny cykliczne dzieli się na dwie podgrupy. Podgrupa 1 to kationowe bakteriocyny cykliczne z punktem izoelektrycznym (pI) bliskim 10. Do wspomnianej podgrupy zalicza się m.in.: wspomnianą wyżej enterocynę AS-48, enterocynę NKR-5-3B syntetyzowaną przez *Enterococcus faecium* NKR-5-3 [44], garwicynę ML wytwarzaną przez *Lactococcus garvieae* [17], uberolizynę produkowaną przez *Streptococcus uberis* [87], karnocyklinę A pochodzącą od *Carnobacterium maltaromaticum* [64], laktocyklicynę Q syntetyzowaną przez *Lactococcus* sp. [81], amylocyklinę wytwarzaną przez *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [82], cyrkularynę A, której producentem jest *Clostridium beijerinckii* [47] oraz leukocyklicynę Q pochodzącą od *Leuconostoc mesenteroides* [67] (Tab. I). Podgrupa 2 to bakteriocyny cykliczne o znacznie niższym pI (w przedziale 4–7): acydocyna B syntetyzowana przez *Lactobacillus acidophilus* M46 [3], gazerycyna A produkowana przez *Lactobacillus gasseri*

[50] oraz butyrywibriocyna AR10 wytwarzana przez *Butyrivibrio fibriosolvens* [46] (Tab. I). Początkowo do podgrupy 2 zaliczana była również reuterycyna 6. Jednak kolejne analizy wykazały, że masa cząsteczkowa (5,65 kDa) i struktura pierwszorzędowa reuterycyny 6 produkowanej przez *Lb. reuteri* LA6 są identyczne z masą i strukturą gazerycyny A [11, 48, 49]. Większość bakteriocyn cyklicznych zbudowana jest z 58–70 aminokwasów i posiada masę cząsteczkową w zakresie 5,6–7,2 kDa [26]. Do bakteriocyn o strukturze cyklicznej bywa również zaliczana subtylozyna A [51]. Jednak ze względu na znacznie mniejszą masę cząsteczkową (3,4 kDa, 35 aminokwasów), ale również nietypową budowę – obecność trzech mostków tioeterowych łączących atomy siarki 3 reszt cysteinowych z atomami węgla α Phe 22, Thr 28 i Phe 31, jej przynależność do bakteriocyn cyklicznych bywa kwestionowana [86].

2. Genetyka bakteriocyn cyklicznych

Struktura genetyczna niektórych bakteriocyn cyklicznych została dokładnie poznana, a analiza funkcjonalna klastrów genowych enterocyny AS-48 i kilku innych bakteriocyn cyklicznych dała wgląd w rolę poszczególnych genów kodujących procesy biosyntezy tych substancji. Klastry genowe bakteriocyn cyklicznych są zlokalizowane w chromosomach lub plazmidach i mają wiele cech wspólnych. Geny kodujące poszczególne bakteriocyny wykazują również zgodność sekwencji na poziomie 20–30%. Minimalny zestaw genów niezbędny do syntezy bakteriocyny cyklicznej

Tabela I
Zestawienie bakteriocyn o budowie cyklicznej

Bakteriocyna	Producent	Piśmiennictwo
Enterocyna AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i> S-48	[29]
Garwicyna ML	<i>Lactococcus garvieae</i> DCC43	[17]
Uberolizyna	<i>Streptococcus uberis</i> 42	[87]
Karnocyklina A	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL307	[64]
Laktocyklicyna Q	<i>Lactococcus</i> sp. szczep QU 12	[81]
Amylocyklina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	[82]
Cyrkularyna A	<i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC 25752	[47]
Leukocyklicyna Q	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TK41401	[67]
Enterocyna NKR-5-3B	<i>Enterococcus faecium</i> NKR-5-3	[44]
Enterocyna NKR-5-3C	<i>Enterococcus faecium</i> NKR-5-3	[43]
Aureocyklicyna 4185	<i>Staphylococcus aureus</i> 4185	[76]
Pneumocyklicyna	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	[16]
Acydocyna B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	[3]
Gazerycyna A	<i>Lactobacillus gasseri</i> LA39	[50]
Reuterycyna 6	<i>Lactobacillus reuteri</i> LA6	[48]
Butyrywibriocyna AR10	<i>Butyrivibrio fibriosolvens</i> AR10	[46]

i oporności na nią obejmuje 5–7 genów [27]. Podstawową składową klastra jest gen strukturalny, który koduje peptyd prekursorowy, zawierający sekwencję liderową składającą się z 2–48 reszt aminokwasowych [26]. Poza tym wszystkie klastry genowe zawierają gen kodujący niewielkie, hydrofobowe białko kationowe, które odpowiedzialne jest za oporność producenta bakteriocyny na wytwarzaną bakteriocynę [26, 85]. Minimalny zestaw genów zawiera również gen kodujący ATPazę i białko błonowe z rodziny DUF95, które związane jest opornością i sekrecją bakteriocyn cyklicznych [27]. Ponadto w zależności od podgrupy, klastry genowe kodują duże, prawdopodobnie transbłonowe białko (podgrupa 1 bakteriocyn cyklicznych) lub białko błonowe wykazujące podobieństwo do rodziny transporterów typu ABC-2 (podgrupa 2) [26]. Większość klastrów genowych bakteriocyn podgrupy 1 zawiera również dodatkowy operon kodujący kompleks transportera ABC (permeazę, ATPazę i białko zewnątrzkomórkowe). Rola transportera ABC nie jest w pełni wyjaśniona. W przypadku enterocyny AS-48 prawdopodobnie jego rola polega na wzmacnianiu syntezy bakteriocyny i zwiększeniu oporności producenta na wytwarzaną bakteriocynę. Porównanie struktury genetycznej znanych bakteriocyn cyklicznych wskazuje, że z wyjątkiem subtylozyny A, której przynależność do bakteriocyn o budowie cyklicznej jest zresztą poddawana pod wątpliwość, polipeptydy te mają szereg cech wspólnych, co może świadczyć o ich podobnej biogenezie [54, 87].

3. Biosynteza bakteriocyn cyklicznych

Mechanizmy zachodzące podczas biosyntezy bakteriocyn cyklicznych, enzymy odpowiedzialne za ten proces, a zwłaszcza sprzężenie mechanizmów z działaniem enzymów, nie są w pełni poznane [73]. Bakteriocyny cykliczne to polipeptydy przeważnie hydrofobowe, co sugerowałoby, że są to białka związane z błoną komórkową, a co za tym idzie ich biosynteza prawdopodobnie zachodzi na powierzchni błon. Proces biosyntezy bakteriocyn cyklicznych obejmuje trzy etapy: odłączenie sekwencji liderowej, cyklizację i eksport z komórki [27].

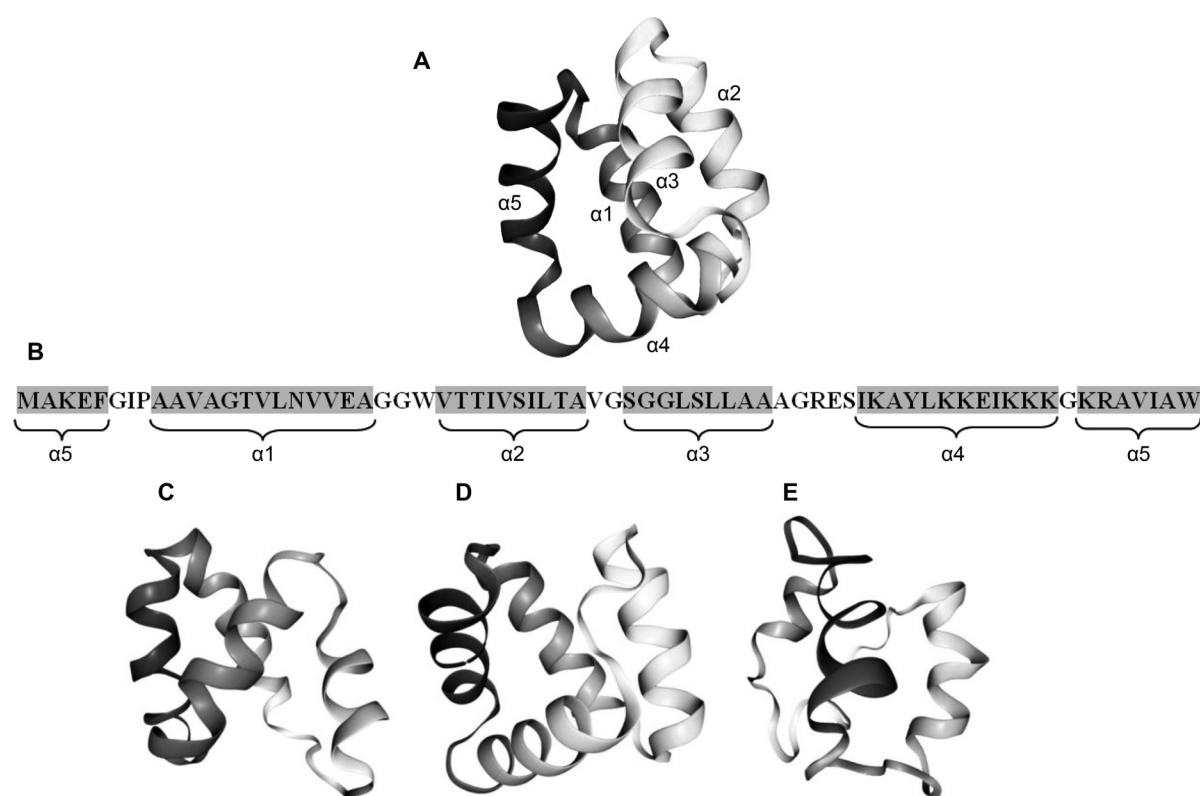
Proces oddzielenia sekwencji liderowej jako pierwszego etapu biosyntezy badano na przykładzie garwicy ML [27]. Wykazano, że odcięcie sekwencji liderowej i cyklizacja to dwa odrębne etapy. Ponadto wnioskowano, że odszczepienie sekwencji liderowej nie jest wynikiem działania żadnego z peptydów zakodowanych w klastrach genowych, a jest procesem katalizowanym przez specyficzny lub niespecyficzny, nieznaną enzym proteolityczny, co tłumaczyłoby brak genów kodujących enzymy proteolityczne w klastrach genowych. Możliwym jest, że sekwencja liderowa działa

na zasadzie punktu kontroli całego procesu biosyntezy bakteriocyn [26].

Cyklizacja – drugi etap biosyntezy bakteriocyn o budowie cyklicznej, odróżniający je od pozostałych bakteriocyn, to jeszcze mniej poznany obszar tego zagadnienia. Końce N i C bakteriocyn cyklicznych zbudowane są głównie z aminokwasów hydrofobowych, a miejsce połączenia C- i N-końca za pomocą wiązania peptydowego zlokalizowane wewnątrz α -helisy. Takie ułożenie wymaga, aby proces cyklizacji zachodził w hydrofobowym rdzeniu cząsteczki. Analiza mutacyjna bakteriocyny AS-48 wykazała, że zamiana aminokwasów na końcach N i C skutkuje powstaniem formy liniowej, zamiast cyklicznej. Obrazuje to więc, że natura końców N i C jest kluczowa w procesie cyklizacji [18]. Ponadto wydaje się, że za mechanizm cyklizacji nie jest odpowiedzialne tylko jedno białko, a raczej ich grupa, która składa się z minimum 3 białek transbłonowych i ATPazy. Określenie czy cyklizacja zachodzi według tego rozwiązania, wymaga jednak dalszych badań [26].

4. Struktura bakteriocyn cyklicznych

Jak wspomniano wcześniej bakteriocyny cykliczne dzieli się na dwie podgrupy. Wiedza o strukturze bakteriocyn cyklicznych z podgrupy 1 opiera się głównie o badania nad najlepiej poznaną bakteriocyną AS-48, znane są również struktury trójwymiarowe karnocykliny A i enetrocyny NKR-5-3B (Rys. 1A, C, D). Wspomniane bakteriocyny cykliczne charakteryzują się zwartą budową. Ich łańcuch polipeptydowy formuje struktury α -helis (w przypadku enterocyny AS-48 – 5 α -helis, karnocykliny A i enterocyny NKR-5-3B – 4 α -helisy), które obudowują hydrofobowy rdzeń [33, 44, 63, 74]. Reszty aminokwasowe odpowiedzialne za cyklizację zlokalizowane są w segmencie helikalnym. Na powierzchni cząsteczki znajdują się reszty aminokwasowe, które determinują kationowy charakter [26]. Badania nad strukturą AS-48 wykazały podobieństwo do NK-lizyny, polipeptydu zbudowanego z 78 reszt aminokwasowych. NK-lizyna produkowana jest m.in. przez komórki NK (Natural Killers) i wykazuje działanie antibakteryjne i cytotoksyczne. NK-lizyna charakteryzuje się obecnością domeny saponinowej, zawierającej trzy mostki disiarczkowe [84]. Enterocyna AS-48 posiada także domenę o strukturze analogicznej do saponinowej, pozbawioną jednak mostków disiarczkowych. Porównanie struktur obu związków sugeruje, że domena saponinowa może mieć wpływ na działanie przeciwdrobnoustrojowe bakteriocyn cyklicznych zaliczanych do podgrupy 1 [33]. Co więcej, analiza właściwości antibakteryjnych liniowej formy AS-48, otrzymanej syntetycznie, wykazała, że charakteryzuje się ona niższą zawartością struktury helikalnej (badania



Rys. 1. Struktura bakteriocyn cyklicznych

A. Struktura trójwymiarowa enterocyny AS-48 (PDB: 1E68 [33]). B. Sekwencja aminokwasowa enterocyny AS-48. C. Karnocyklina A (PDB: 2KJF [63]). D. Enterocyna NKR-5-3B (PDB: 2MP8 [44]). E. Acydocyna B (PDB: 2MWR [3]). Trójwymiarowa wizualizacja – NGL Viewer [77, 78].

dichroizmu kołowego), a cyklizacja omawianego typu bakteriocyn, nie tyle wpływa na ich aktywność (choć zaobserwowano ograniczenie antagonistycznego działania), ale istotna jest do stabilizacji struktury [68]. Z drugiej strony w badaniach prowadzonych nad garwicyną ML nie wykazano aktywności przeciwdrobnoustrojowej formy liniowej, czyli budowa cykliczna w przypadku tej bakteriocyny wydaje się być niezbędną do prawidłowego działania [27].

Odnosnie bakteriocyn podgrupy 2, struktura trójwymiarowa butyrywibriocyny AR10 i gazercyny A nie jest dotąd poznana, udało się jednak, stosując technikę NMR, określić budowę acydocyny B [3] (Rys. 1E). Bakteriocyny cykliczne podgrupy 2 wykazują wysoki stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej, natomiast znacznie różnią się od bakteriocyn podgrupy 1. Prawdopodobnie wszystkie zbudowane są z 4 α -helisy o zbliżonej długości, oddzielonych krótkimi fragmentami, zawierającymi glicynę lub prolinę. Pomimo że ogólny schemat struktury wydaje się być podobny do bakteriocyn podgrupy 1 (4 α -helisy otaczające hydrofobowy rdzeń z domeną sapozynową), występowanie różnic w budowie między podgrupami sugerują chociażby mocno różniące się punkty izoelektryczne, charakteryzujące przedstawicieli tych dwóch podgrup [63].

Niewielkie rozmiary i charakterystyczna budowa bakteriocyn cyklicznych decydują o ich oporności na

wysokie temperatury, zmiany pH i rozkład pod wpływem enzymów proteolitycznych. Poza tym podobieństwa struktury omawianych peptydów mogą oznaczać wspólny mechanizm ich działania. W szczególności dodatni ładunek na powierzchni cząsteczek bakteriocyn cyklicznych wydaje się odgrywać istotną rolę w oddziaływaniu i insercji do wnętrza ujemnie naładowanej błony fosfolipidowej komórek docelowych [26].

5. Mechanizm działania bakteriocyn cyklicznych

Uważa się, że bakteriocyny o budowie cyklicznej działają poprzez przerwanie integralności błon komórkowych komórek wrażliwych. Powoduje to wyciek jonów, degradację błon i w konsekwencji śmierć komórek [28]. Większość bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie Gram-dodatnie jest aktywna wyłącznie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, co tłumaczone jest faktem, że zewnętrzna błona bakterii Gram-ujemnych stanowi dla tych bakteriocyn barierę. Zidentyfikowano jednak takie bakteriocyny bakterii Gram-dodatnich (AS-48, laktocyklina Q czy subtylozyna A), które wykazują aktywność w pewnych szczególnych warunkach również przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. Wymaga to jednak dużo wyższych stężeń tych bakteriocyn, niż w przypadku aktywności typowej dla tej

grupy (przeciwko bakteriom Gram-dodatnim) albo zastosowania dodatkowego czynnika, który zaburza integralność błony zewnętrznej, jak np. EDTA [86].

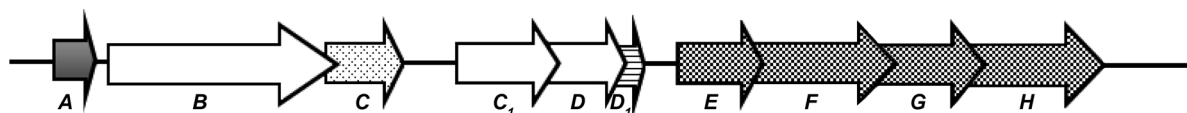
Jakkolwiek wspólne cechy strukturalne i właściwości fizykochemiczne bakteriocyn cyklicznych sugerują, że mechanizm działania tych związków jest podobny, jednak prowadzone do tej pory badania poszczególnych bakteriocyn wykazują między nimi sporo różnic. W badaniach mechanizmu działania enterocyny AS-48 dowiedziono, że do aktywności antymikrobiologicznej nie jest wymagane wiązanie z odpowiednim receptorem w błonie komórkowej komórki docelowej. Bakteriocyna ta tworzy nieselektywne pory w liposomach, co powoduje wyciek jonów i komponentów komórkowych o niskiej masie cząsteczkowej [28]. Inna bakteriocyna cykliczna – karnocyklina A również tworzy kanały jonowe w membranach lipidowych, są one jednak anio-noselektywne i ich przepuszczalność zależy od różnicy potencjałów [32].

W przypadku wielu bakteriocyn wykazano, że ich działanie przeciwdrobnoustrojowe jest związane z receptorami, czyli rozpoznawaniem specyficznych białek na powierzchni komórek wrażliwych. W związku z tym podjęto badania pod tym kątem, również w przypadku bakteriocyn o budowie cyklicznej. Trudno jednak wysnuć jednoznaczne wnioski. Analiza AS-48 i karnocykliny A wykazała jak wspomniano wyżej, że bakteriocyny te tworzą pory w liposomach i membranach lipidowych, co może wskazywać, że dla bakteriocyn o budowie cyklicznej wystarczająca i kluczowa dla działania, jest bezpośrednia interakcja z komórką wrażliwą. Pozwala to z kolei wykluczyć tezę, że niezbędne do działania antymikrobiologicznego tych związków są receptory na powierzchni komórek wrażliwych [26]. Enterocyna AS-48 i karnocyklina A analizowane były jednak pod tym kątem z wykorzystaniem dużo wyższych stężeń, w porównaniu do poziomów, które są wystarczające do ich działania *in vivo*. Z drugiej strony, analizując aktywność garwicyzny ML wykazano korelację między działaniem bakteriocyny, a obecnością kompleksu transportera ABC w komórce wrażliwej. Obecność kompleksu transportera odpowiedzialna jest za wrażliwość komórek docelowych, natomiast jego brak warunkuje oporność komórki na garwicyznę ML, co może oznaczać, że kompleks ten jest receptorem niezbędnym do działania bakteriocyny. Jednakże zwiększenie stężenia bakteriocyny również w tym przypadku skutkowało aktywnością niezależną od obecności receptora. Podsumowując, prawdopodobnym jest, że działanie bakteriocyn cyklicznych zależne jest od ich stężenia. Ich aktywność wydaje się być niespecyficzna w wyższych stężeniach, w niższych natomiast specyficzna i zależna od obecności receptora na powierzchni komórek szczepów bakterii wrażliwych [26].

6. Enterocyna AS-48

Enterocyna AS-48 to pierwsza opisana, a zarazem najlepiej poznana bakteriocyna o budowie cyklicznej. Struktura pierwszorzędowa AS-48 charakteryzuje się przewagą aminokwasów zasadowych w stosunku do kwaśnych (Rys. 1B). Stwierdzono znaczny udział aminokwasów hydrofobowych takich jak alanina, prolina, walina czy metionina, a także pozbawionych ładunku aminokwasów hydrofilowych (m.in. seryna, glicyna, treonina i tyrozyna). Wspomniana bakteriocyna syntetyzowana jest jako liniowy prekursor zbudowany z 105 aminokwasów, od którego odcinana jest sekwencja liderowa obejmująca 35 aminokwasów. Dojrzały peptyd składa się z 70 reszt aminokwasowych i nie zawiera mostków disiarczkowych; jego masa cząsteczkowa wynosi 7,14 kDa, a punkt izoelektryczny 10,09 [36]. Poznana została także budowa drugorzędowa i trzeciorzędowa enterocyny AS-48. Bakteriocyna ta składa się z 5 α -helis otaczających zwarty, hydrofobowy rdzeń (Rys. 1A). Wiązanie peptydowe pomiędzy N- i C-końcem znajduje się w środku piątej helisy, pomiędzy N-końcową metioniną a C-końcowym tryptofanem w pozycji 70 (Rys. 1A, B). Sekwencję aminokwasową AS-48 cechuje wysoce asymetryczny rozkład ładunków dodatnich – wszystkie zasadowe aminokwasy, których łącznie jest 10, znajdują się w segmencie 26 reszt, podczas gdy cały łańcuch polipeptydowy enterocyny zbudowany jest 70 reszt [68]. Cyklizacja oraz zwarta budowa sprawiają, że enterocyna AS-48 cechuje się wyjątkową stabilnością struktury i opornością na wysoką temperaturę, zmiany pH, a także czynniki denaturujące.

Analiza uwarunkowań genetycznych wykazała, że bakteriocyna AS-48 kodowana jest przez geny znajdujące się w plazmidach zależnych od feromonów. Klaster genowy *as-48* znajduje się w plazmidzie pMB2, region o długości 7,8 kbp koduje informacje niezbędne do syntezy i oporności na AS-48 [55]. Ekspresję AS-48 i oporność producenta na wspomnianą bakteriocynę warunkuje 10 genów w klastrze genowym, w tym gen strukturalny *as-48A*, gen *as-48D* kodujący białko opornościowe i geny kodujące kompleks transportera ABC (Rys. 2) [24, 25]. Dwa nakładające się geny *as-48BC* zlokalizowane są 73 nukleotydy poniżej nonsensownego kodonu TAA genu strukturalnego, od którego oddzielone są charakterystyczną odwróconą sekwencją powtórzoną IR (Inverted Repeat). IR jest sekwencją, która początkowo uważana była za sygnał terminatorowy transkrypcji [54]. Obecnie jednak przypisuje się IR rolę charakterystycznego substratu dla endorybonukleaz, zaangażowanych w modyfikację mRNA, i kluczowej sekwencji w kontroli ekspresji genów *as-48BC* [25]. W dalszej kolejności w klastrze genowym położone są nakładające się geny *as-48C₁DD₁*, oddzielone



Rys. 2. Organizacja klastra genowego *as-48* zaangażowanego w produkcję i oporność na enterocynę AS-48

A – gen strukturalny *as-48A* kodujący peptyd prekursorowy; **B** – gen *as-48B* kodujący duże, hydrofobowe białko transmembranowe; **C** – gen *as-48C* kodujący białko należące do rodziny DUF96; **C₁D** – geny *as-48C₁D* związane z odłączeniem sekwencji liderowej i eksportem bakteriocyny; **D** – gen *as-48D* kodujący białko wiążące ATP; **D₁** – gen *as-48D₁* kodujący białko odpowiadające za oporność producenta na AS-48; **EFGH** – geny *as-48EFGH* kodujące kompleks transportera ABC [24, 55].

międzygenowym regionem liczącym 205 nukleotydów od nakładających się genów *as-48EFGH*, poprzedzających sekwencję terminalną [24, 54] (Rys. 2).

Badania mechanizmu działania enterocyny AS-48 na komórki wrażliwe *E. faecalis* S-47 wykazały, że od 2 do 10 cząsteczek bakteriocyny potrzebne jest do inaktywacji jednej komórki wrażliwej. Odwracalność tego procesu zależy jednak od czasu ekspozycji na AS-48. W krótkim czasie od zastosowania bakteriocyny efekt inaktywacji może być odwrócony, np. poprzez dodatek trypsyny. Długi czas interakcji uniemożliwia powtórne odzyskanie aktywności przez komórki wrażliwe, które miały kontakt z enterocyną AS-48 [30].

Badania dotyczące mechanizmu działania enterocyny AS-48 przeprowadzano również na bakteriach Gram-ujemnych (*E. coli*), wobec których AS-48 wykazuje działanie bakteriobójcze, ale nie aktywność bakteriologiczną. Obserwowano podobne efekty jak w przypadku komórek wrażliwych *E. faecalis* oraz innych bakterii Gram-dodatnich, jednak ich osiągnięcie wymagało stosowania dużo wyższych stężeń bakteriocyny [31].

Analizowano także wpływ enterocyny nie tylko na żywotność, ale również na szereg innych parametrów życiowych badanych komórek. Wykazano, że bakteriocyna AS-48 zaburza zdolność komórek *E. faecalis* do gromadzenia szeregu prekursorów (np. [6-³H] tymidyny, L-[4,5-³H] leucyny), a co za tym idzie możliwości wbudowania ich w docelowe struktury, takie jak DNA, RNA i peptydoglikan ściany komórkowej. Ponadto obecność AS-48 uniemożliwia utrzymanie cytoplazmatycznego stężenia jonów K⁺ i podnosi poziom jonów Na⁺. Na podstawie tych analiz wnioskowano, że mechanizm działania bakteriocyny wiąże się z niszczeniem błony komórkowej [30, 31]. Z kolei inne badania wykazały szybki spadek potencjału błonowego komórek traktowanych AS-48, a co za tym idzie upośledzenie transportu aminokwasów oraz prekursorów, i co się z tym wiąże szlaków biosyntezy. Interpretacja wyników analizy wpływu AS-48 na transport i przenikanie pęcherzyków błonowych, pozwoliła na potwierdzenie, że zewnętrzna błona bakterii Gram-ujemnych wykazuje dużo większą oporność na działanie bakteriocyny niż komórki bakterii Gram-dodatnich oraz że potencjał błonowy nie jest niezbędny do tworzenia przez nią kanałów jonowych lub porów o niskiej specyficzności

w błonach komórek wrażliwych [28]. Na podstawie analizy struktury enterocyny AS-48 zaproponowano, że mechanizm działania tej bakteriocyny opiera się o funkcjonowanie dwóch konformacji dimerów – rozpuszczalnej w wodzie formy DF-I i związanej z błoną DF-II. Zmiana konformacji dimeru DF-I do DF-II wymaga rotacji cząsteczki, podczas której częściowo ukryte hydrofobowe α -helisy 1 i 2 ulegają rearanżacji, umożliwiając enterocynie AS-48 integrację z błoną komórki wrażliwej [80].

Oprócz właściwości bakteriobójczych, enterocyna AS-48 wykazuje również aktywność bakteriologiczną, która wydaje się być wtórną w stosunku do oddziaływania na błonę komórek wrażliwych. Sugeruje się, że podczas interakcji z błoną, następująca jej depolaryzacja skutkuje utratą kontroli nad enzymami litycznymi ściany komórkowej. Inhibicja syntezy białek lub RNA w komórkach wrażliwych przed inkubacją z AS-48 wiąże się z ograniczeniem autolizy. Aktywność bakteriologiczna enterocyny zależna jest ponadto od temperatury, wymaga potencjału czynnościowego błony oraz może być wstrzymana np. przez dodatek EDTA, a aktywowana przez trypsynę [36].

W badaniach dotyczących mechanizmu działania bakteriocyn cyklicznych zwrócono również uwagę na reakcję komórek wrażliwych na obecność bakteriocyny. Przykładem analizującym to zagadnienie jest badanie odpowiedzi szczepu *Bacillus cereus* ATCC 14579 na AS-48. Analiza transkryptomu *B. cereus* przeprowadzona na 5200 genach wykazała, że ekspresja 24 genów podlegała zmianom po zastosowaniu AS-48. Większość genów charakteryzowała zwiększona ekspresja, natomiast w przypadku operonu odpowiedzialnego za metabolizm argininy zaobserwowano efekt przeciwny, co autorzy badań tłumaczą jako wynik prawdopodobnie niewielkich różnic we wzroście komórek traktowanych AS-48 w stosunku do próby kontrolnej, niewidocznych w pomiarach gęstości optycznej (OD₆₀₀). Najbardziej wzmożona ekspresja dotyczyła operonu BC4206-BC4207, zawierającego gen *BC4206*, kodujący białko regulatorowe z rodziny PadR oraz gen *BC4207*, kodujący białko błonowe o nieznannej funkcji, zbudowane z 4 segmentów transbłonowych, które uznano za powiązane z mechanizmem oporności przeciwko enterocynie AS-48. Dokładne zrozumienie mechanizmów oporności

komórek wrażliwych na bakteriocyny, może odgrywać kluczową rolę w przyszłości, podczas prób stosowania bakteriocyn w przemyśle na szeroką skalę [34].

7. Potencjalne zastosowanie bakteriocyn cyklicznych

Większość jak dotąd opisanych bakteriocyn o budowie cyklicznej wytwarzanych jest przez bakterie fermentacji mlekowej, które w większości posiadają status GRAS (Generally Recognised As Safe). Ponadto bakteriocyny te charakteryzują się termostabilnością, a także wytrzymałością na zmiany pH i działanie szeregu enzymów proteolitycznych (np. karboksy- i aminopeptydaz). Cechy te powodują, że bakteriocyny o budowie cyklicznej są przedmiotem wielu badań prowadzonych szczególnie pod kątem ich potencjalnego zastosowania w przemyśle spożywczym. Połączenie wyżej wymienionych korzystnych właściwości z faktem, że nie stwierdzono toksyczności enterocyny AS-48 względem komórek eukariotycznych [36, 63, 65] może oznaczać, że bakteriocyny cykliczne nie tylko byłyby lepszymi dodatkami do żywności w stosunku do używanych obecnie konserwantów (np. azotanów (III) i (V)), ale również mniej stabilnych bakteriocyn o budowie liniowej. Stosowanie bakteriocyn o budowie cyklicznej w żywności mogłoby nie tylko doprowadzić do redukcji użycia konserwantów, ale także ograniczenia niektórych zabiegów przemysłowych, np. działania wysoką temperaturą na produkty spożywcze. Pozwoliłoby to otrzymać produkty bezpieczne dla zdrowia, o lepszej jakości organoleptycznej, a także zredukować koszty (choćby w przypadku eliminacji działania wysokiej temperatury), co byłoby korzystne zarówno dla konsumentów, jak i producentów [86].

Najlichniesze badania pod kątem potencjalnego zastosowania do utrwalania żywności dotyczą najlepiej poznanej z bakteriocyn o budowie cyklicznej – enterocyny AS-48. Analiza wpływu enterocyny AS-48 na mikroflorę mleka i produktów mlecznych wykazała, że AS-48 znacząco ogranicza rozwój *Staphylococcus aureus* w odtłuszczonej mleku, dodatkowo zaobserwowano wzmocnienie efektu hamowania w kombinacji z niziną, jedyną bakteriocyną o strukturze liniowej, która posiada status GRAS i jest stosowana w przemyśle spożywczym. Zastosowanie AS-48 w połączeniu z techniką pulsacyjnego pola elektrycznego o wysokiej intensywności (HIPEF – High Intensity Pulsed Electric Field), która jest wykorzystywana m.in. do kontrolowania bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności, również skutkowało spotęgowaniem efektu inhibicji względem *S. aureus*. Wnioskowano, że połączenie dodatku AS-48 i techniki HIPEF, może być w przyszłości z powodzeniem stosowane w celu eliminacji *S. aureus*

z mleka [83]. Według Ananou i wsp. [8] dodatek AS-48 do odtłuszczonego mleka również prowadzi do inaktywacji bakterii *Listeria monocytogenes*. W badaniu zastosowano liofilizat AS-48, w przeciwieństwie do pozostałych analiz, w których badano płynny preparat enterocyny lub kulturę bakterii *E. faecalis*, zdolną do syntezy AS-48 w analizowanym produkcie. Obecność enterocyny w produktach mlecznych – w odtłuszczonych serach dojrzewających i niedojrzewających, także znacząco wpływała na zredukowanie ilości komórek *B. cereus* i *S. aureus* [70, 83].

Produkty mięsne również mogą stanowić źródło niebezpiecznych patogenów. W celu określenia możliwości biokontroli rozwoju *S. aureus* oraz *L. monocytogenes* przez bakteriocyny cykliczne, badano wpływ dodatku AS-48 do kielbasy wieprzowej [5, 7]. W odniesieniu do *L. monocytogenes*, zastosowano roztwory bakteriocyny o różnych aktywnościach (112 AU/g, 225 AU/g, 450 AU/g) oraz produkującą ją szczepy (*E. faecalis* A-48-32 i *E. faecium* S-32-81). Już najniższe stężenie AS-48 znacząco ograniczało wzrost *L. monocytogenes*, przy wyższej zawartości bakteriocyny (225 AU/g) przez pierwsze 3 dni doświadczenia obserwowano całkowite zahamowanie rozwoju badanego mikroorganizmu, podczas gdy zastosowanie najwyższego stężenia (450 AU/g) eliminowało wzrost *L. monocytogenes* przez 9 dni inkubacji w 20°C [5]. Użycie szczepów produkujących bakteriocynę w ilości 10⁷ jtk/g również prowadziło do zahamowania rozwoju niepożądanego mikroflory. Z kolei analiza kielbasy wieprzowej w kierunku kontroli wzrostu *S. aureus* wykazała, że zarówno dodatek częściowo oczyszczonej bakteriocyny (30 lub 40 µg/g), jak i produkującego ją szczepu *E. faecalis* (10⁷ jtk/g) znacząco ograniczało rozwój *S. aureus*. Zaobserwowano, że poza hamowaniem wzrostu wspomnianego mikroorganizmu, AS-48 działa antagonistycznie również w stosunku do bakterii mlekowych, co w przypadku badanego wyrobu jest traktowane jako efekt negatywny [7].

Innym produktem mięsnym, w którym analizowano aktywność antagonistyczną AS-48 wobec *L. monocytogenes* i *S. aureus*, była gotowana szynka wieprzowa. Badano wpływ samej enterocyny (20, 40 i 60 µg/g) lub w kombinacjach z powszechnie używanymi konserwantami (azotanami(III) i (V), trifosforanem pentasodowym, benzoesanem sodu, sorbinianem potasu, octanem sodu, mleczanem sodu), a także w połączeniu z zastosowaniem temperatury subletalnej (60°C) [4]. Uzyskane wyniki potwierdziły, że kontrola mikrobiologiczna mięs jest możliwa przy użyciu enterocyny AS-48. Należy jednak podkreślić fakt, że zastosowanie samej enterocyny nie wyeliminowało ponownego wzrostu *L. monocytogenes* po fazie skutecznej inhibicji. Najbardziej obiecujące wyniki otrzymano w przypadku biokontroli tego drobnoustroju podczas przechowywania produktu w temperaturze 5°C, przy użyciu AS-48 (40 µg/g) w połączeniu

z azotanami (III) lub (V) w stężeniu 0,007%. Gatunek *S. aureus*, który określany jest jako bardziej oporny na działanie bakteriocydu, inaktywowany był już przy użyciu samej AS-48, a efekt potęgował dodatek azotanów (III) lub (V), trifosforanu pentasodowego, mleczanu sodu oraz octanu sodu. Największy stopień zahamowania rozwoju obydwu gatunków bakterii uzyskano w kombinacji AS-48 (60 µg/g) z trifosforanem pentasodowym, a efekt ten był wyraźnie wzmacniany przez działanie temperatury subletalnej [4].

Gotowana szynka wieprzowa była przedmiotem innego badania, dotyczącego aktywności AS-48 względem *Lactobacillus sakei* (gatunek powodujący zepsucie mięsa, objawiające się śluzowaceniem), *Brochothrix thermosphacta* (gatunek odpowiedzialny za psucie mięsa i ryb, rozwijający się zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych) oraz *Staphylococcus carnosus* (jego wzrost jest powodem nieprzyjemnego zapachu zepsutego mięsa) [12]. Rozpatrywano znaczenie dodatku samej enterocydu, jej aplikacji wraz z konserwantami (azotanami (III) i (V), trifosforanem pentasodowym, benzoesanem, octanem sodu, mleczanem sodu oraz pirofosforanem sodu), a także przechowywania w modyfikowanej atmosferze (40% CO₂/60% N₂) oraz pakowania próżniowego. Najsilniejszą i nieodwracalną inhibicję względem *Lb. sakei* stwierdzono zarówno w przypadku zastosowania wyłącznie bakteriocydu AS-48 (60 µg/g), jak i przy jej niższym stężeniu (40 µg/g) w kombinacji z innymi konserwantami. W mniejszym, ale również znaczącym stopniu, AS-48 wykazywała aktywność antagonistyczną w stosunku do *S. carnosus* i *B. thermosphacta*. Przechowywanie w modyfikowanej atmosferze nie skutkowało żadnymi zmianami, pakowanie próżniowe natomiast spowodowało wzmocniony efekt inhibicji AS-48 wobec zarówno *B. thermosphacta*, jak i *Lb. sakei* [12].

Warto wspomnieć również o badaniu dotyczącym innego wyrobu mięsnego – fuetu (katalońskiej kiełbasy wieprzowej). W doświadczeniu analizowano wpływ AS-48 i wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP – High Hydrostatic Pressure) na rozwój *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *Salmonella enterica*. Tak jak w poprzednich badaniach, otrzymano wyniki wskazujące, że po zastosowaniu bakteriocydu (148 AU/g) występowała znacząca redukcja liczby komórek *L. monocytogenes* (podczas dojrzewania wędliny i przechowywania w 7°C). Enterocydu AS-48 w kombinacji z HHP (400 MPa) znacząco hamowała rozwój *S. enterica* [6].

W doświadczeniach nad potencjalnym zabezpieczeniem żywności pochodzenia zwierzęcego uwzględniono również ryby i produkty rybne, które mogą stanowić ognisko rozprzestrzeniania się chorób przenoszonych przez żywność, głównie powodowanych przez biotoksyny morskie, aminy biogenne i wirusy. Większość schorzeń powoduje histamina, której toksyczny

wpływ może być wzmocniony przez obecność innych amin biogennych, np. putrescyny czy kadaweryny. W badaniu analizującym wpływ AS-48 na powstawanie amin biogennych w sardynkach stwierdzono, że enterocydu AS-48 znacząco obniżała poziom tych związków – putrescyny, kadaweryny, tyraminy i histaminy, a w połączeniu z przechowywaniem w modyfikowanej atmosferze lub pakowaniem próżniowym, również powodowała spadek aktywności bakterii kwasu mlekowego, produkujących tyraminę i histaminę [9]. Ponadto inne oznaczenia, w których obiektem były ryby (surowy morszczuk, surowy i wędzony łosoś), wykazały skuteczną inaktywację patogennego gatunku *L. monocytogenes* przez AS-48 [13].

Nie tylko produkty odzwierzęce stanowią potencjalne źródło zakażeń groźnymi patogenami, niebezpieczna może być również mikroflora związana z zepsuciem produktów roślinnych. Spożycie surowych owoców i warzyw może również być przyczyną niebezpiecznych infekcji drobnoustrojami chorobotwórczymi. Dodatkowo w przypadku warzyw i owoców ważne jest, aby wszelkie zabiegi mające na celu przedłużenie trwałości produktów i kontrolę mikroflory, również patogennej, miały znikomy wpływ na właściwości organoleptyczne żywności [2].

Prace doświadczalne sprawdzające wpływ AS-48 na rozwój *L. monocytogenes* w surowych owocach, prowadzone były z wykorzystaniem truskawek, malin, jeżyn, melona, arbuza, kiwi i gruszek. Próby stanowiły owoce myte roztworem bakteriocydu oraz mieszaniną bakteriocydu z konserwantami (trimetafosforanem sodu, mleczanem sodu, kwasem mlekowym, kwasem polifosforowym, karwakrolem, kwasem hydrocynamonowym, kwasem kumarowym, parabenem propylu, 2-nitropropanolem) i przechowywane w różnych temperaturach (-20, 6, 15, 22°C). Mycie z wykorzystaniem AS-48 skutkowało znaczną lub całkowitą inaktywacją *L. monocytogenes* w truskawkach, malinach i jeżynach, przechowywanych w 15 i 22°C do dwóch dni, a w przypadku truskawek i jeżyn przechowywanych w 6°C, nawet do sześciu dni. Działanie AS-48 w próbach pozostałych owoców, czyli melona, arbuza, kiwi i gruszki, przechowywanych w 15 i 22°C również wiązało się ze znacznym zmniejszeniem liczby komórek *L. monocytogenes*. Zaobserwowano jednak ponowne namnażanie komórek, które przetrwały kontakt z bakteriocydu. Zastosowanie kombinacji enterocydu z konserwantami wzmocniło efekty otrzymane w przypadku działaniem samej enterocydu, a użycie karwakrolu oraz parabenu propylu skutkowało wyeliminowaniem efektu ponownego wzrostu komórek przechowywanych nawet w 22°C [69].

Próby zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego w surowcach roślinnych dotyczyły także warzyw. Ze względu na wzrastający popyt na surowe kiełki oraz szparagi, a także ich niski stopień obróbki przed spo-

życiem, przeprowadzono doświadczenia sprawdzające możliwości zastosowania enterocyny AS-48 do kontroli *L. monocytogenes* w próbach kiełków soi i lucerny oraz zielonych szparagów. W przypadku kiełków zaobserwowano znaczące zahamowanie wzrostu *L. monocytogenes* po umieszczeniu prób w roztworze bakteriocyny (25 µg/ml) przez okres 5 minut. Uzyskany efekt inhibicji potęgowało dodatkowo przechowywanie prób w temperaturze poniżej 22°C (6 i 15°C) oraz, podobnie jak w przypadku wcześniej opisywanych oznaczeń, gdy działanie enterocyny AS-48 połączono z użyciem chemicznych konserwantów. Istotne zahamowanie rozwoju *L. monocytogenes* uzyskano w kombinacji bakteriocyny z nadmanganianem potasu, kwasem octowym, kwasem cytrynowym, propionianem sodu lub sorbinianem potasu [19].

Kiełki soi, lucerny oraz szparagi użyto również w analogicznym oznaczeniu wykorzystania AS-48 w kierunku kontroli *B. cereus* i *Bacillus weihenstephanensis*. *B. cereus* to gatunek powszechnie występujący w glebie, względnie patogenny, czynnik etiologiczny m.in. zatruc pokarmowych, którego obecność stwierdzano w rozmaitych produktach spożywczych (m.in. produkty zbożowe, makarony, płatki, produkty mleczne, sosy i desery) [14]. *B. weihenstephanensis* natomiast jest psychrotolerancyjnym gatunkiem, zdolnym do wzrostu poniżej 7°C, bakteria ta była wykrywana w pasteryzowanym mleku przechowywanym w 7°C. Najsilniejsze ograniczenie rozwoju wspomnianych bakterii uzyskano w kombinacji AS-48 z chemicznymi konserwantami (chlorkiem heksadecylopirydyniowym, podchlorynem sodu oraz kwasem nadoctowym) [21].

Wpływ połączonego działania enterocyny, metod fizycznych oraz konserwantów na rozwój bakterii Gram-ujemnych badano w kiełkach soi. Pomimo że większość bakterii Gram-ujemnych jest oporna na działanie AS-48 poszukuje się czynników, które współdziałając z AS-48 mogłyby stanowić metody kontroli tej grupy bakterii w produktach roślinnych. Inaktywację *S. enterica* udało się osiągnąć w zasadowym roztworze (pH 9,0), zawierającym AS-48 w stężeniu 25 µg/ml, dodatkowo odgrzewanym przez 5 min. w 65°C. Efekt ten dodatkowo potęgowało dodanie do roztworu takich składników jak EDTA, kwas nadoctowy, kwas polifosforowy, podchloryn sodu, chlorek heksadecylopirydyniowy, paraben propylu oraz kwas hydrocynamonowy. W przypadku innych badanych Gram-ujemnych bakterii skuteczne zahamowanie zaobserwowano po zastosowaniu enterocyny AS-48 (25 µg/ml) w połączeniu z kwasem polifosforowym (0,1 do 2%). Synergistyczne działanie tych związków znacząco ograniczyło lub całkowicie zahamowało rozwój *E. coli* O157:H7, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella* spp. i *Pseudomonas fluorescens* w kiełkach soi przechowywanych w temperaturach 6°C i 15°C. Otrzymane wyniki wyka-

zują, że możliwe jest opracowanie metod konserwacji żywności opartych na kombinacji enterocyny AS-48 z innymi czynnikami, które skutecznie mogłyby obniżyć ryzyko zepsucia i zakażenia patogennymi bakteriami Gram-ujemnych surowców roślinnych [20].

Inną, dużą grupą surowców roślinnych badanych pod kątem zastosowania enterocyny AS-48 były zboża oraz półprodukty i produkty, będące wynikiem ich przetworzenia. Zepsucie chleba, które objawia się ciągliwym i upłynnionym miększem oraz nieprzyjemnym smakiem i zapachem, najczęściej powodowane jest przez bakterie z rodzaju *Bacillus*, szczególnie *B. subtilis* i *B. licheniformis*, w mniejszym stopniu gatunki *B. pumilus* i *B. cereus*. Uważa się, że zepsucie chleba powodowane wspomnianymi mikroorganizmami może być skutkiem rozwoju bakterii już na etapie przygotowania ciasta. W związku z tym przeprowadzono analizę sprawdzającą skuteczność działania antagonistycznego AS-48 (4–7 µg/ml) w stosunku do bakterii z rodzaju *Bacillus* w cieście z mąki pszennej. Wyniki wskazują, że enterocyna nie tylko inaktywuje analizowane gatunki, ale efekty jej działania spotęgowane były w próbach ciasta przechowywanych w 22°C, w porównaniu do inkubacji w 10°C. Otrzymane wyniki są korzystne z punktu widzenia przemysłu piekarskiego, ze względu na wysokie temperatury, w których powinno garować ciasto do wypieku chleba [60]. *B. cereus* jak wspomniano wcześniej, izolowany jest z różnego rodzaju produktów spożywczych, często surowców roślinnych. Znaczącą eliminację obecności tych bakterii przy użyciu AS-48 (20–35 µg/ml) udało się osiągnąć w ryżu gotowanym i kleiku ryżowym. Co więcej, podczas inkubacji w temperaturze 37°C obserwowano zahamowanie syntezy enterotoksyny, a dzięki procesowi krótkotrwałego podgrzewania (gotowany ryż – 90°C/1 min, kleik ryżowy – 95°C/1 min) inaktywację przetrwalników [41]. Kolejnym badaniem, wynikającym z obecnych trendów konsumenckich, było badanie odpowiedzi komórek *S. aureus* na AS-48 w napojach owsianych i sojowych. Podobnie jak w poprzednich analizach, dodatek samej bakteriocyny AS-48 nie przyniósł zadawalających rezultatów w przeciwieństwie do efektów synergistycznego działania bakteriocyny i związków fenolowych lub 2-nitropropanolu [35].

Konieczność kontroli mikroflory produktów roślinnych nie ogranicza się do surowych owoców i warzyw, ale dotyczy także wyrobów będących wynikiem ich przetworzenia, takich jak soki, napoje, sosy, czy konserwy. Oznaczenie z wykorzystaniem świeżego soku jabłkowego wykazało synergistyczne działanie dodatku AS-48, techniki HIPEF oraz temperatury 40°C prowadzące do skutecznego ograniczenia rozwoju *S. enterica* [61]. Analiza wpływu kombinacji HIPEF oraz AS-48 w stosunku do *Pediococcus parvulus* (drobnoustroju wytwarzającego egzopolisacharydy, odpowiedzialnego

za zepsucie cydrów) potwierdziła oczekiwaną korelację między redukcją liczby komórek bakterii, a synergistycznym działaniem bakteriocynty i techniki HIPEF, które stosowane osobno, nie miały znaczącego wpływu na aktywność drobnoustrojów [62]. Badania pod kątem wykorzystania AS-48 w sokach, skierowane były również przeciwko *Alicyclobacillus acidoterrestis*. Jest to gatunek, którego endospory zdolne są do przetrwania w niskim pH oraz wysokich temperaturach, stosowanych podczas rozlewania soków na gorąco. Do oznaczenia wybrano świeży sok jabłkowy i pomarańczowy oraz komercyjne soki: pomarańczowy, jabłkowy, ananasowy, brzoskwiński i grejpfrutowy. Dodatek AS-48 do świeżych soków, inkubowanych w 37°C, skutkowało ograniczeniem wzrostu *A. acidoterrestis* do 14 dni. Natomiast bakteriocynty w komercyjnych sokach (pomarańczowym i ananasowym), inkubowanych w temperaturach 37, 15 i 4°C, warunkowała bezpieczeństwo nawet do 90 dni. Odmienne wyniki otrzymano w przypadku soku jabłkowego, brzoskwińskiego i grejpfrutowego inkubowanych w 37°C, w których rozwój *A. acidoterrestis* ograniczony był jedynie do 60 dni. Zaobserwowano również inaktywację przetrwalników, nawet po 1 minucie ekspozycji na AS-48. Obserwacje pod mikroskopem elektronowym wykazały znaczne uszkodzenia i lizę komórek wegetatywnych oraz dezorganizację w strukturach endospor [39]. W kolejnym badaniu potwierdzono aktywność antymikrobiologiczną AS-48 w stosunku do *Bacillus licheniformis* (gatunek wytwarzający egzopolisacharydy, często odpowiedzialny za zepsucie cydru). Wykazano nie tylko inhibicję rozwoju *B. licheniformis*, ale również wzmoczoną wrażliwość przetrwalników badanego gatunku na ciepło [40].

Analizy wpływu enterocynty na mikroorganizmy rozwijające się w napojach nie ominęły również spożywanych obecnie na dużą skalę napojów energetycznych i płynów dedykowanych do spożycia wśród sportowców. Napoje tego typu ze względu na niskie pH mogą powodować problemy stomatologiczne, dlatego dąży się do uzyskania w nich wyższego pH, a co za tym idzie pojawia się większe ryzyko rozwoju bakterii. W napojach o pH podwyższonym do 5,0 wykazano aktywność antagonistyczną AS-48 w stosunku do takich mikroorganizmów jak: *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. licheniformis* i *B. cereus* [57].

Badaniami możliwości zastosowania AS-48 do zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego objęto również produkty konserwowe. Mikroorganizmem, którego odpowiedź na AS-48 analizowano był *Bacillus coagulans*, a badanymi produktami pasta pomidorowa, sok z ananasów i syrop z brzoskwiń. *B. coagulans* to termotolerancyjna bakteria, często obecna w produktach zakwaszanych, odpowiedzialna za tzw. zepsucie „płasko-kwaśne”, prowadzące do obniżenia pH produktu na skutek wytwarzania kwasów, głównie mlekowego

z węglowodanów, bez wydzielenia gazów. Obecność AS-48 powodowała znaczący spadek liczby komórek wegetatywnych *B. coagulans*, efekt ten wzmacniał dodatek cukru (w badaniu glukoza i sacharoza). Co więcej, bakteriocynty AS-48 potęgowała efekt letalny w stosunku do endospor *B. coagulans*, osiągnąć przez użycie wysokiej temperatury [53]. Działanie AS-48 w odniesieniu do innego mikroorganizmu – *Geobacillus stearothermophilus*, sprawdzano w produktach takich jak: puszkowana kukurydza i groszek oraz cieszącym się dużym zainteresowaniem konsumentów mleku kokosowym. *G. stearothermophilus* to niepatogeny, niezwykle odporny na wysoką temperaturę gatunek, odpowiedzialny za zepsucie „płasko-kwaśne” produktów, szczególnie długo przechowywanych w wysokich temperaturach (np. automaty z jedzeniem lub żywność wykorzystywana podczas misji wojskowych w rejonach tropikalnych). Również w tym przypadku dodatek AS-48 skutkowało szybką redukcją wzrostu wspomnianej bakterii [59].

Współcześni konsumenci coraz chętniej sięgają po gotowe produkty, w związku z tym przeprowadzono również analizy wpływu dodatku AS-48 do gotowych zup, purée i sosów warzywnych. Badane bakterie (*B. cereus*, *B. macroides*, *Paenibacillus polymyxa* i *P. amylolyticus*) wykazywały pewną oporność na działanie AS-48, w szczególności rodzaj *Paenibacillus*. Dopiero zastosowanie AS-48 wraz ze związkami fenolowymi (karwakrol, eugenol, geraniol i kwas hydrocynamonowy) skutkowało znacznie zwiększoną aktywnością bakteriobójczą [37]. Podobną zależność obserwowano w pokrewnym badaniu wpływu AS-48 na *S. aureus* w gotowych sosach (m.in. dostępne w komercyjnej sprzedaży sos neapolitański, carbonara oraz pesto). W tym przypadku *S. aureus* wykazywał najwyższą oporność w sosie carbonara, którą podobnie jak w wyżej opisanym badaniu, skutecznie obniżono stosując związki fenolowe [38].

Analizowano również aktywność antymikrobiologiczną bakteriocynty AS-48 w deserach. Dodatek AS-48 do bitej śmietany, deserów na bazie jogurtu sojowego czy puddingu żelatynowego, powodował inhibicję rozwoju *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *B. cereus*, a stopień ograniczenia wzrostu wspomnianych mikroorganizmów zależał od zastosowanego stężenia AS-48. Ponadto wykazano, że dodatek bakteriocynty zapobiegał upłynnianiu deserów z dodatkiem żelatyny, wskutek zahamowania aktywności proteolitycznej *B. cereus* [58]. Przeprowadzono również analizy działania antagonistycznego AS-48 w takich produktach jak: płynny karmel, konfitura dyniowa, krem migdałowy, masło orzechowe, krem i syrop czekoladowy oraz syrop waniliowy. Antybakteryjna aktywność AS-48 w stosunku do *S. aureus* znacząco zależała od analizowanego produktu – od pełnej inaktywacji w płynnym karmelu, do nieznacznej inhibicji w wanilii czy czekoladzie. Stopień

inhibicji skutecznie wzmacniało zastosowanie eugenolu, 2-nitropropanolu i nizyny wraz z AS-48 [56].

W związku z tym, że enterocyna AS-48 jest najlepiej poznaną bakteriocyną o budowie cyklicznej poświęca jej się szczególnie dużo uwagi, jednak podejmowane są próby mające na celu sprawdzenie możliwości zastosowania również pozostałych bakteriocyn cyklicznych w przemyśle spożywczym, jako naturalnych konserwantów. Warto zwrócić uwagę na karnocyklinę A (CclA) wywarzaną przez *C. maltaromaticum* – gatunek, który w USA i w Kanadzie jest dopuszczony przez USDA (United States Department of Agriculture) i FDA (Food and Drug Administration) do użytku jako konserwant produktów mięsnych. Atywność antagonizująca CclA w stosunku do *L. monocytogenes* wydaje się niezaprzeczalna, zwłaszcza że przeprowadzane już zostały badania analizujące mechanizm tego działania wraz z komórkową odpowiedzią *L. monocytogenes* na obecność bakteriocyny [52]. Jak nadmieniono wcześniej, zewnętrzna błona bakterii Gram-ujemnych stanowi barierę dla bakteriocyn o budowie cyklicznej, chociaż niektóre bakteriocyny stanowią wyjątek od tej reguły. W związku z tym przeprowadzono badanie z wykorzystaniem CclA w kierunku inaktywacji wybranych bakterii Gram-ujemnych: *E. coli* DH5 α , *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella* Typhimurium. Podobnie jak w przypadku aktywności AS-48 w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, do osiągnięcia działania przeciwdrobnoustrojowego CclA niezbędne było zastosowanie dodatkowych czynników, takich jak EDTA. Taka kombinacja pozwoliła na znaczącą inhibicję rozwoju bakterii *E. coli* i *P. aeruginosa* [66].

Kolejną bakteriocyną, którą badano pod kątem potencjalnego stosowania w żywności jest gazerycyna A (GaaA). W oznaczeniu wykorzystano koncentrat zawierający GaaA, uzyskany po hodowli kultury *Lb. gasseri* w medium z serwatki serowej. Aktywność GaaA analizowano w stosunku do wybranych drobnoustrojów: *B. cereus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Achromobacter denitrificans* i *P. fluorescens*. W przypadku użycia wyłącznie bakteriocyny stwierdzono wzrost badanych gatunków. Natomiast całkowitą inhibicję wzrostu analizowanych drobnoustrojów zaobserwowano po użyciu GaaA z dodatkiem glicyny [10, 71].

Bakteriocyny o budowie cyklicznej stanowią obiekt badań przede wszystkim pod kątem ich wykorzystania jako naturalnych konserwantów żywności. Zarówno przechowywanie surowców, jak i duża ilość procesów technologicznych wymaga często stosowania ekstremalnych warunków, dlatego bakteriocyny cykliczne, ze względu na swoje właściwości, wydają się być dużo skuteczniejsze w potencjalnym zabezpieczeniu żywności przed patogenami niż bakteriocyny o strukturze liniowej. Jednak stabilność bakteriocyn o budowie cyklicznej i ich szerokie spektrum działania jest powodem, dla

którego poszukuje się innych sposobów wykorzystania tej grupy związków. Potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie m.in. w weterynarii, np. w leczeniu mastitis (zapalenia wymienia) u krów mlecznych [23]. Ponadto należy rozważyć również wykorzystanie tych związków w medycynie, np. jako terapeutyków czy nośników substancji czynnych [65]. Dowiedzono także, że enterocyna AS-48 wywołuje efekt letalny w stosunku do pierwotniaków *Leishmania*, zarówno w postaci promastygotów, jak i amastygotów [1]. Sugeruje się ponadto, że w związku z prawdopodobnie unikalnym mechanizmem biosyntezy, który nie jest jeszcze całkowicie poznany, bakteriocyny o budowie cyklicznej mogłyby być używane w bioinżynierii, do projektowania nowych peptydów [88].

Ze względu na wyjątkowe właściwości, które są poniekąd rozszerzeniem właściwości bakteriocyn o strukturze liniowej, bakteriocyny cykliczne mogą znaleźć zastosowanie także jako dodatki do kosmetyków lub substytutu antybiotyków.

8. Podsumowanie

Bakteriocyny cykliczne to niewielki zbiór peptydów charakteryzujących się nie tylko cyklizacją struktury, ale i wyjątkowymi właściwościami – odpornością na działanie wielu enzymów proteolitycznych, wysokich temperatur, a także zmiany pH. Bakteriocyny cykliczne wytwarzane są przez bakterie Gram-dodatnie i ich aktywność antymikrobiologiczna w głównej mierze skierowana jest przeciwko bakteriom Gram-dodatnim. Jednak po zastosowaniu wysokich stężeń lub dodatkowych czynników, takich jak np. EDTA, niektóre bakteriocyny mogą również hamować wzrost bakterii Gram-ujemnych, np. *E. coli*. Bakteriocyny o budowie cyklicznej stanowią potencjalnie obiecującą alternatywę dla powszechnie stosowanych metod i środków zabezpieczania żywności przed mikrobiologicznym zepsuciem. Istnieje duże zapotrzebowanie rynku na tego typu związki jako naturalne konserwanty lub produkujące je bakterie jako kultury starterowe i probiotyki. Badania z wykorzystaniem enterocyny AS-48 są dowodem na to, że bakteriocyny cykliczne mogłyby znaleźć zastosowanie w rozmaitych gałęziach przemysłu spożywczego. Skuteczną inaktywację wielu gatunków mikroorganizmów, zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, w tym bakterii powodujących zepsucie żywności oraz patogennych, uzyskano w analizach dotyczących wpływu enterocyny AS-48 jako dodatku do różnych surowców i produktów spożywczych. Badania nad zastosowaniem bakteriocyn w żywności ukazują również perspektywy ich użycia w innych celach, m.in. do ograniczenia powstawania niebezpiecznych amin biogennych czy w zapobieganiu procesowi upłynniania się produktów żelatynowych.

Mimo obiecujących wyników potwierdzających działanie bakteriocyn cyklicznych w stosunku do szeregu gatunków bakterii rozwijających się w żywności, w tym gatunków patogennych, należy podkreślić potrzebę dalszych badań tych związków. Stan wiedzy na temat bakteriocyn o budowie cyklicznej, jest wciąż niewystarczający, szczególnie biorąc pod uwagę tak istotne zagadnienia, jak pełne wyjaśnienie mechanizmów biosyntezy tych związków, rozpoznawania komórek docelowych i sposobów działania. Innym zagadnieniem, zgłębnym w bardzo niewielkim stopniu, jest nabywanie oporności na działanie bakteriocyn przez mikroorganizmy docelowe. Być może, dopiero poznanie tych mechanizmów pozwoli na opracowanie racjonalnych metod stosowania bakteriocyn o budowie cyklicznej w przemyśle spożywczym, a niewykluczone, że w przyszłości również w medycynie.

9. Piśmiennictwo

1. Abengózar M.A., Cebrián R., Saugar J.M., Gárate T., Valdivia E., Martínez-Bueno M., Maqueda M., Rivas L.: Enterocin AS-48 as evidence for the use of bacteriocins as new leishmanicidal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e02288–16 (2017)
2. Abriouel H., Lucas R., Ben Omar N., Valdivia E., Gálvez A.: Potential applications of the cyclic peptide enterocin AS-48 in the preservation of vegetable foods and beverages. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **2**, 77–89 (2010)
3. Acedo J.Z., van Belkum M.J., Lohans C.T., McKay R.T., Miskolzie M., Vederas J.C.: Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 2910–2918 (2015)
4. Ananou S., Baños A., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E.: Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. *Food Control*, **21**, 478–486 (2010)
5. Ananou S., Garriga M., Hugas M., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E.: Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **103**, 179–190 (2005)
6. Ananou S., Garriga M., Jofré A., Aymerich T., Gálvez A., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Valdivia E.: Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages. *Meat Sci.* **84**, 594–600 (2010)
7. Ananou S., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E.: Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Sci.* **71**, 549–556 (2005)
8. Ananou S., Muñoz A., Martínez-Bueno M., González-Tello P., Gálvez A., Maqueda M., Valdivia E.: Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food Microbiol.* **27**, 58–63 (2010)
9. Ananou S., Zentar H., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Maqueda M., Valdivia E.: The impact of enterocin AS-48 on the shelf-life and safety of sardines (*Sardinia pilchardus*) under different storage conditions. *Food Microbiol.* **44**, 185–195 (2014)
10. Arakawa K., Kawai Y., Iioka H., Tanioka M., Nishimura J., Kitazawa H., Tsurumi K., Saito T.: Effects of gasserins A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri*, with glycine on custard cream preservation. *J. Dairy Sci.* **92**, 2365–2372 (2009)
11. Arakawa K., Kawai Y., Ito Y., Nakamura K., Chujo T., Nishimura J., Kitazawa H., Saito T.: HPLC purification and re-evaluation of chemical identity of two circular bacteriocins, gasserin A and reuterin 6. *Lett. Appl. Microbiol.* **50**, 406–411 (2010)
12. Baños A., Ananou S., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Maqueda M., Valdivia E.: Prevention of spoilage by enterocin AS-48 combined with chemical preservatives, under vacuum, or modified atmosphere in a cooked ham model. *Food Control*, **24**, 15–22 (2012)
13. Baños A., García-López J.D., Núñez C., Martínez-Bueno M., Maqueda M., Valdivia E.: Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fish by enterocin AS-48 and *Listeria lytic* bacteriophage P100. *LWT – Food Sci. Technol.* **66**, 672–677 (2016)
14. Bednarczyk A., Daczkowska-Kozon E.G.: Czynniki patogenności bakterii z grupy *Bacillus cereus*. *Post. Mikrobiol.* **47**, 51–63 (2008)
15. Błaszczuk U., Moczarny J.: Bakteriocyny bakterii Gram-ujemnych – struktura, mechanizm działania i zastosowanie. *Post. Mikrobiol.* **55**, 157–171 (2016)
16. Bogaardt C., van Tonder A.J., Brueggemann A.B.: Genomic analyses of pneumococci reveal a wide diversity of bacteriocins – including pneumocyclin, a novel circular bacteriocin. *BMC Genomics*, **16**, 544, 1–16 (2015)
17. Borrero J., Brede D.A., Skaugen M., Diep D.B., Herranz C., Nes I.F., Cintas L.M., Hernandez P.E.: Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 369–373 (2011)
18. Cebrián R., Maqueda M., Neira J. L., Valdivia E., Martínez-Bueno M., Montalbán-López M.: Insights into the functionality of the putative residues involved in enterocin AS-48 maturation. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7268–7276 (2010)
19. Cobo Molinos A., Abriouel H., Ben Omar N., Valdivia E., López R.L., Maqueda M., Martínez Cañamero M., Gálvez A.: Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7781–7787 (2005)
20. Cobo Molinos A., Abriouel H., López R.L., Valdivia E., Omar N.B., Gálvez A.: Combined physico-chemical treatment based on enterocin AS-48 for inactivation of Gram-negative bacteria in soybean sprouts. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 2912–2921 (2008)
21. Cobo Molinos A., Abriouel H., Lucas López R., Ben Omar N., Valdivia E., Gálvez A.: Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing solutions containing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. *Food Microbiol.* **25**, 762–770 (2008)
22. Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.: Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 777–788 (2005)
23. Davidse E.K., Balla E., Holzapfel W.H., Muller C.J.C., Cloete S.W.P., Dicks L.M.T.: Peptide AS-48 (*Enterococcus faecalis*) for prevention and treatment of mastitis in dairy cows. *Online J. Vet. Res.* **8**, 22–32 (2004)
24. Diaz M., Valdivia E., Martínez-Bueno M., Fernández M., Soler-González A.S., Ramírez-Rodrigo H., Maqueda M.: Characterization of a new operon, as-48EFGH, from the as-48 gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1229–1236 (2003)
25. Fernández M., Sánchez-Hidalgo M., García-Quintás N., Martínez-Bueno M., Valdivia E., López P., Maqueda M.: Processing of as-48ABC RNA in AS-48 enterocin production by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **190**, 240–250 (2008)
26. Gabrielsen C., Brede D.A., Nes I.F., Diep D.B.: Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 6854–6862 (2014)

27. Gabrielsen C., Brede D.A., Salehian Z., Nes I.F., Diep D.B.: Functional genetic analysis of the GarMl gene cluster in *Lactococcus garvieae* DCC43 gives new insights into circular bacteriocin biosynthesis. *J. Biotechnol.* **196**, 911–919 (2014)
28. Gálvez A., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Valdivia E.: Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **173**, 886–892 (1991)
29. Gálvez A., Maqueda M., Valdivia E., Quesada A., Montoya E.: Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.* **32**, 765–771 (1986)
30. Gálvez A., Valdivia E., Martínez M., Maqueda M.: Bactericidal action of peptide antibiotic AS-48 against *Escherichia coli* K-12. *Can. J. Microbiol.* **35**, 318–321 (1989)
31. Gálvez A., Valdivia E., Martínez M., Maqueda M.: Effect of peptide AS-48 on *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-47. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 641–645 (1989)
32. Gong X., Martin-Visscher L.A., Nahirney D., Vederas J.C., Duszynski M.: The circular bacteriocin, carnocyclin A, forms anion-selective channels in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 1797–1803 (2009)
33. González C., Langdon G.M., Bruix M., Gálvez A., Valdivia E., Maqueda M., Rico M.: Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11221–11226 (2000)
34. Grande Burgos M.J., Kovács A.T., Mironczuk A.M., Abriouel H., Gálvez A., Kuipers O.P.: Response of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to challenges with sublethal concentrations of enterocin AS-48. *BMC Microbiol.* **9**, 227–234 (2009)
35. Grande Burgos M.J., López Aguayo M.C., Pérez Pulido R., Gálvez A., Lucas López R.: Inactivation of *Staphylococcus aureus* in oat and soya drinks by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. *J. Food Sci.* **80**, 2030–2034 (2015)
36. Grande Burgos M.J., Pérez Pulido R., López Aguayo M.C., Gálvez A., Lucas R.: The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 22706–22727 (2014)
37. Grande M.J., Abriouel H., Lucas López R., Valdivia E., Ben Omar N., Martínez-Bueno M., Martínez-Cañamero M., Gálvez A.: Efficacy of enterocin AS-48 against bacilli in ready-to-eat vegetable soups and purees. *J. Food Prot.* **70**, 2339–2345 (2007)
38. Grande M.J., López R.L., Abriouel H., Valdivia E., Ben Omar N., Maqueda M., Martínez-Cañamero M., Gálvez A.: Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* **70**, 405–411 (2007)
39. Grande M.J., Lucas R., Abriouel H., Omar N.B., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Martínez-Cañamero M., Valdivia E., Gálvez A.: Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **104**, 289–297 (2005)
40. Grande M.J., Lucas R., Abriouel H., Valdivia E., Ben Omar N., Maqueda M., Martínez-Cañamero M., Gálvez A.: Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from ropy cider by enterocin AS-48. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 422–428 (2006)
41. Grande M.J., Lucas R., Abriouel H., Valdivia E., Omar N.B., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Martínez-Cañamero M., Gálvez A.: Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 185–194 (2006)
42. Güllüce M., Karadayı M., Bariş Ö.: Bacteriocins: promising natural antimicrobials (w) Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, red. A. Mendes-Vilas, Formatex Research Center, Badajoz, 2013, s. 1016–1027
43. Himeno K., Fujita K., Zendo T., Wilaipun P., Ishibashi N., Masuda Y., Yoneyama F., Leelawatcharamas V., Nakayama J., Sonomoto K.: Identification of enterocin NKR-5-3C, a novel class IIa bacteriocin produced by a multiple bacteriocin producer, *Enterococcus faecium* NKR-5-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1245–1247 (2012)
44. Himeno K., Rosengren K.J., Inoue T., Perez R.H., Colgrave M.L., Lee H.S., Chan L.Y., Henriques S.T., Fujita K., Ishibashi N., Zendo T., Wilaipun P., Nakayama J., Leelawatcharamas V., Jikuya H., Craik D. J., Sonomoto K.: Identification, characterization, and three-dimensional structure of the novel circular bacteriocin, enterocin NKR-5-3B, from *Enterococcus faecium*. *Biochemistry*, **54**, 4863–4876 (2015)
45. Jurkowski M., Błaszczak M.: Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna bakterii fermentacji mlekowej. *KOSMOS Problemy Nauk Biologicznych*, **3**, 493–504 (2012)
46. Kalmokoff M.L., Cyr T.D., Hefford M.A., Whitford M.F., Teather R.M.: Butyrivibriocin AR10, a new cyclic bacteriocin produced by the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: characterization of the gene and peptide. *Can. J. Microbiol.* **49**, 763–773 (2003)
47. Kemperman R., Kuipers A., Karsens H., Nauta A., Kuipers O., Kok J.: Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1589–1597 (2003)
48. Kawai Y., Ishii Y., Uemura K., Kitazawa H., Saito T., Itoh T.: *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food Microbiol.* **18**, 407–415 (2001)
49. Kawai Y., Kemperman R., Kok J., Saito T.: The circular bacteriocins gasserin A and circularin A. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 393–398 (2004)
50. Kawai Y., Saito T., Kitazawa H., Itoh T.: Gasserin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 2438–2440 (1998)
51. Kawulka K., Sprules T., McKay R.T., Mercier P., Diaper C.M., Zuber P., Vederas J.C.: Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4726–4727 (2003)
52. Liu X., Basu U., Miller P., McMullen L.M.: Stress response and adaptation of *Listeria monocytogenes* 08-5923 exposed to a sublethal dose of carnocyclin A. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 3835–3841 (2014)
53. Lucas R., Grande M.J., Abriouel H., Maqueda M., Ben Omar N., Valdivia E., Martínez-Cañamero M., Gálvez A.: Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1774–1781 (2006)
54. Maqueda M., Sánchez-Hidalgo M., Fernández M., Montalbán-López M., Martínez-Bueno E.V., Martínez-Bueno M.: Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 2–22 (2008)
55. Martínez-Bueno M., Valdivia E., Gálvez A., Coyette J., Maqueda M.: Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **27**, 347–358 (1998)
56. Martínez Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas López R., Gálvez A.: Antistaphylococcal effect of enterocin AS-48 in bakery ingredients of vegetable origin, alone and in combination with selected antimicrobials. *J. Food Sci.* **74**, 384–389 (2009)
57. Martínez Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas López R., Valdivia E., Gálvez A.: Antibacterial protection by enterocin

- AS-48 in sport and energy drinks with less acidic pH values. *J. Food Prot.* **71**, 881–884 (2009)
58. Martínez Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas López R., Valdivia E., Gálvez A.: Assay of enterocin AS-48 for inhibition of foodborne pathogens in desserts. *J. Food Prot.* **72**, 165–1659 (2009)
 59. Martínez Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas López R., Valdivia E., Gálvez A.: Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* in canned food and coconut milk samples by addition of enterocin AS-48. *Food Microbiol.* **26**, 289–293 (2009)
 60. Martínez Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., López Lucas R., Gálvez A.: Inhibition of spoilage and toxigenic *Bacillus* species in dough from wheat flour by the cyclic peptide enterocin AS-48. *Food Control*, **22**, 756–761 (2011)
 61. Martínez Viedma P., Sobrino López A., Ben Omar N., Abriouel H., Lucas López R., Martín Belloso O., Gálvez A.: Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against *Salmonella enterica* in apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 244–249 (2008)
 62. Martínez Viedma P., Sobrino López A., Ben Omar N., Abriouel H., Lucas López R., Martín Belloso O., Gálvez A.: Increased inactivation of exopolysaccharide-producing *Pedococcus parvulus* in apple juice by combined treatment with enterocin AS-48 and high-intensity pulsed electric field. *J. Food Prot.* **73**, 39–43 (2010)
 63. Martin-Visscher L.A., Gong X., Duszyk M., Vederas C.: The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *J. Biol. Chem.* **284**, 28674–28681 (2009)
 64. Martin-Visscher L.A., van Belkum M.J., Garneau-Tsodikova S., Whittall R.M., Zheng J., McMullen L.M., Vederas J.C.: Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4756–4763 (2008)
 65. Martin-Visscher L.A., van Belkum M.J., Vederas J.C.: Class Iic or circular bacteriocins (w): Prokaryotic Antimicrobial Peptides. From genes to application, red. Drider D. Rebuffat S., Springer, Nowy York, Dordecht, Heidelberg, Londyn, 2011, s. 232
 66. Martin-Visscher L.A., Yoganathan S., Sit C.S., Lohans C.T., Vederas J.C.: The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiol. Lett.* **317**, 152–159 (2011)
 67. Masuda Y., Ono H., Kitagawa H., Ito H., Mu F., Sawa N., Zendo T., Sonomoto K.: Identification and characterization of leucocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 8164–8170 (2011)
 68. Montalbán-López M., Spolaore B., Pinato O., Martínez-Bueno M., Valdivia E., Maqueda M., Fontana A.: Characterization of linear forms of the circular enterocin AS-48 obtained by limited proteolysis. *FEBS Lett.* **582**, 3237–3242 (2008)
 69. Molinos A.C., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas R., Valdivia E., Gálvez A.: Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. *J. Food Prot.* **71**, 2460–2467 (2008)
 70. Muñoz A., Maqueda M., Gálvez A., Martínez-Bueno M., Rodríguez A., Valdivia E.: Enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a nonfat hard cheese by an Enterococcal strain-producing enterocin AS-48. *J. Food Prot.* **7**, 1517–1521 (2004)
 71. Nakamura K., Arakawa K., Kawai Y., Yasuta N., Chujo T., Watanabe M., Iioka H., Tanioka M., Nishimura J., Kitazawa H., Tsurumi K., Saito T.: Food preservative potential of gassericin A – containing concentrate prepared from cheese whey culture supernatant of *Lactobacillus gasseri* LA39. *Anim. Sci. J.* **84**, 144–149 (2013)
 72. Nes I.F., Diep D.B., Holo H.: Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* **189**, 1189–1198 (2007)
 73. Perez R.H., Ishibashi N., Inoue T., Himeno K., Masuda Y., Sawa N., Zendo T., Wilaipun P., Leelawatcharamas V., Nakayama J., Sonomoto K.: Functional analysis of genes involved in the biosynthesis of enterocin NKR-5-3B, a novel circular bacteriocin. *J. Bacteriol.* **198**, 291–300 (2016)
 74. Perez R.H., Sugino H., Ishibashi N., Zendo T., Wilaipun P., Leelawatcharamas V., Nakayama J., Sonomoto K.: Mutations near the cleavage site of enterocin NKR-5-3B prepeptide reveal new insights into its biosynthesis. *Microbiology*, **163**, 431–441 (2017)
 75. Pandey N., Malik R.K., Kaushik J.K., Singroha G.: Gassericin A: a circular bacteriocin produced by lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1977–1987 (2013)
 76. Potter A., Ceotto H., Coelho M.L., Guimarães A.J., Bastos M.: The gene cluster of aureocyclin 4185: the first cyclic bacteriocin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, **160**, 917–928 (2014)
 77. Rose A.S., Bradley A.R., Valasatava Y., Duarte J.M., Prlić A., Rose P.W.: Web-based molecular graphics for large complexes. ACM Proceedings of the 21st International Conference on Web3D Technology (Web3D '16), 185–186 (2016)
 78. Rose A.S., Hildebrand P.W.: NGL Viewer: a web application for molecular visualization. *Nucl. Acids. Res.* **43**, W576–W579 (2015)
 79. Samyn B., Martínez-Bueno M., Devreese B., Maqueda M., Gálvez A., Valdivia E., Coyette J., Van Beeumen J.: The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* **352**, 87–90 (1994)
 80. Sánchez-Barrena M.J., Martínez-Ripoll M., Gálvez A., Valdivia E., Maqueda M., Cruz V., Albert A.: Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *J. Mol. Biol.* **334**, 541–549 (2003)
 81. Sawa N., Zendo T., Kiyofuji J., Fujita K., Himeno K., Nakayama J., Sonomoto K.: Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1552–1558 (2009)
 82. Scholz R., Vater J., Budiharjo A., Wang Z., He Y., Dietel K., Schwecke T., Herfort S., Lasch P., Borriss R.: Amylocyclin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* **196**, 1842–1852 (2014)
 83. Sobrino-Lopez A., Viedma-Martínez P., Abriouel H., Valdivia E., Gálvez A., Martín-Belloso O.: The effect of adding antimicrobial peptides to milk inoculated with *Staphylococcus aureus* and processed by high-intensity pulsed-electric field. *J. Dairy Sci.* **92**, 2514–2523 (2009)
 84. Towle K.M., Vederas J.C.: Structural features of many circular and leaderless bacteriocins are similar to those in saposins and saposin-like peptides. *Med. Chem. Commun.* **8**, 276–285 (2017)
 85. van Belkum M.J., Martin-Visscher L.A., Vederas J.C.: Cloning and characterization of the gene cluster involved in the production of the circular bacteriocin carnocyclin A. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **2**, 218–225 (2010)
 86. van Belkum M.J., Martin-Visscher L.A., Vederas J.C.: Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiol.* **19**, 411–418 (2011)
 87. Wirawan R.E., Swanson K.M., Kleffmann T., Jack R.W., Tagg J.R.: Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology*, **153**, 1619–1630 (2007)
 88. Zendo T.: Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 893–899 (2013)