

## Mikrobiologisch-genetische Ressourcen – Identität der bacteriocinogenen *Lactobacillus sakei* Stämme LTH673 und BAFF-Lb85

Microbial genetic resources – Identity of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* strains LTH673 and BAFF-Lb85

L. KRÖCKEL

### Zusammenfassung

Im Rahmen der Sicherung mikrobiologisch-genetischer Ressourcen und der Rückverfolgbarkeit technologisch und wissenschaftlich eingesetzter Mikroorganismen stellt sich zunehmend die Frage, inwieweit verschiedene Stämme einer Art eindeutig voneinander unterscheidbar sind. Aufgrund vorausgegangener molekulargenetischer Untersuchungen gab es die Vermutung, dass die beiden Sakacin P produzierenden *Lactobacillus sakei* Stämme Lb674 und LTH673 identisch sind. Beide Stämme besitzen ein identisches Sakacin P Gencluster mit einem darauf folgenden ebenfalls identischen Sakacin Q Operon, in welchem ein Pseudogen, *orf5*, mit einer identischen Rasterschubmutation lokalisiert ist. Während die Herkunft von Lb674 gut dokumentiert ist, konnte die Geschichte von LTH673 aus den Literaturquellen nicht nachvollzogen werden. Recherchen ergaben nun, dass es sich bei LTH673 allem Anschein nach um einen Stamm handelt, der ursprünglich an der ehemaligen Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach aus Rohwurst isoliert und in die dortige Stammsammlung in 1976 als *Lb. sakei* Lb85 aufgenommen worden ist. In der vorliegenden Arbeit wurden die Stämme Lb85 und Lb674 phänetisch und genetisch vergleichend untersucht. Trotz weitgehender Übereinstimmungen in vielen Merkmalen war es möglich, beide Stämme anhand ihrer unterschiedlichen Koloniemorphologie sowie ihrer BOX-rep-APD- und M13-RAPD-Profile voneinander zu unterscheiden. Vor allem aufgrund der Übereinstimmung der Nukleotidsequenz zwischen Lb85 und LTH673 im Bereich der Rasterschubmutation von *orf5* scheinen sich die Ergebnisse der Recherche, aus der die Identität beider Stämme hervorgeht, auch durch objektive Daten zu bestätigen.

### Summary

Within the scope of the preservation of microbial genetic resources and the traceability of technologically and scientifically used strains the question how different strains of one species can be unambiguously differentiated from each other is becoming increasingly important. Results from previous molecular genetic studies of the two well-known sakacin P producing strains *Lactobacillus sakei* Lb674 and LTH673 gave rise to speculations that both strains might be identical. The sakacin P gene cluster is completely identical in both strains. The same is true for an adjacent downstream sakacin Q operon which harbours a pseudogene, *orf5*, with an identical frameshift mutation. While the origin of Lb674 is well documented, the history of LTH673 could not be retraced from available literature sources. New evidence now strongly suggests that strain LTH673 was originally isolated at the former Federal Centre for Meat Research at Kulmbach (BAFF) from raw fermented sausage and deposited into the BAFF strain collection in 1976 as *Lb. sakei* Lb85. In the present work comparative studies on phenetic and genetic traits of the *Lb. sakei* strains Lb85 und Lb674 were performed. In spite of extensive matches in many traits it was possible to differentiate both strains on the basis of their colony morphology as well as their BOX-rep-APD and M13-RAPD profiles. Mainly because of the identical nucleotide sequences in the vicinity of the frameshift mutation in *orf5* in both, Lb85 and Lb673, the results of the investigation revealing the identity of both strains appear to be confirmed.

---

**Schlüsselwörter** mikrobiologisch-genetische Ressourcen – Rückverfolgbarkeit – Starter- und Schutzkulturen – Milchsäurebakterien – *Lactobacillus sakei*

**Key Words** microbial genetic resources – traceability – starter and protective cultures – lactic acid bacteria – *Lactobacillus sakei*

---

## Einleitung

Milchsäurebakterien der Art *Lactobacillus sakei* spielen eine herausragende Rolle in der Mikrobiologie von Fleisch und Fleisch-erzeugnissen. Die Forschung der vergan- genen 20 Jahre hat gezeigt, dass Stämme dieser Art zur dominanten Mikroflora tradi- tionell hergestellter Rohwürste, von Reife- beutfleisch und vorverpackten Con- venience-Produkten wie Brühwurst- und Kochschinkenaufschnitt gehören. Aus- gewählte Stämme leisten heute als Starter- und Schutzkulturen einen wichti- gen Beitrag zur Herstellung sicherer Fleischerzeugnisse im Rahmen der Bio- konservierung von Rohwürsten. Andere können als Schutzkulturen die Vermeh- rung unerwünschter Rekontaminanten auf vorverpackten, kühl gelagerten Aufschnitt- waren unterdrücken. Einige Stämme be- sitzen zudem die Fähigkeit zur Bildung von Bacteriocinen, z.B. Sakacin A und Sakacin P, die einen zusätzlichen Schutz gegen die Vermehrung der in diesem Milieu konkurrierenden humanpathogenen Bakterienart *Listeria monocytogenes* bieten (KRÖCKEL, 2003). Zwei *Lb. sakei* Stämme aus der Sammlung der früheren Bundesanstalt für Fleischforschung (BAFF), Lb706 und Lb674, gehören zu- sammen mit LTH673, einem Stamm aus der Sammlung des Instituts für Lebens- mitteltechnologie der Universität Hohen- heim, zu den bekannteren fleischassozii- erten, bacteriocinogenen Milchsäure- bakterien. Zu den Sakacin P Produzenten BAFF-Lb674 und LTH673 liegen sehr detaillierte molekulargenetische Unter- suchungen vor (HÜHNE *et al.*, 1996; BRURBERG *et al.*, 1997). Dabei hat sich gezeigt, dass die organisatorische Struktur und die Nukleinsäuresequenz des Sakacin P-Operons in beiden Stämmen zu 100 % identisch sind. Darüberhinaus weisen sie die gleiche Rasterschubmutation in einem offenen Leserahmen stromabwärts auf (MATHIESEN *et al.*, 2005). Es lag daher die Vermutung nahe, dass es sich in beiden Fällen um ein und denselben Stamm han- delt, der bei Aufnahme in die jeweilige Sammlung lediglich eine neue Stamm- bezeichnung erhielt. Während die Herkunft von Lb674 relativ gut dokumentiert ist, war aus den Literaturangaben nicht zu ent-

nehmen, wer den Stamm LTH673 in wel- chem Zusammenhang isolierte.

Im Rahmen der Sicherung mikrobiolo- gisch-genetischer Ressourcen und der Rückverfolgbarkeit technologisch und wis- senschaftlich eingesetzter Mikroorganismen sowie zur Vermeidung von Doppel- forschung stellt sich zunehmend die Frage, inwieweit verschiedene Stämme einer Art eindeutig voneinander unter- scheidbar sind. Bei phänetisch und gene- tisch sehr ähnlichen Stämmen ist der Ein- satz polyphasischer Differenzierungsme- thoden unerlässlich. Molekularen „Finger- abdrücken“ kommt dabei eine zuneh- mende Bedeutung zu. Häufig gelingt eine Unterscheidung nur durch Kombination verschiedener Fingerabdrücke. Von gro- ßer Bedeutung ist auch eine möglichst ge- naue Dokumentation der Ursprungsdaten (Herkunft, Isolator, Jahr der Isolierung, etc.).

Bei BAFF Lb674 handelt es sich um ein Isolat, das 1982 von vakuumverpacktem Lammfleisch nach Lagerung (5 Wochen -1 °C, 3 Wochen 1 °C) von B.G. Shaw und C.D. Harding isoliert wurde (SHAW und HARDING, 1984) und in 1985 aus der AFRC-Sammlung (AFRC Meat Research Institute, Langford, Bristol, UK) mit ge- änderter Bezeichnung von F.K. Lücke be- zogen und in die BAFF-Sammlung auf- genommen wurde. Die ursprüngliche Stammbezeichnung war AFRC LV69.

Der Stamm LTH673 soll nach Angaben von TICHACZEK (1993) und NEUMEYER (1997) aus Rohwurst isoliert worden sein, wobei auf BANTLEON (1987) verwiesen wird. Bei BANTLEON (1987) kommt die Stammbezeichnung LTH673 allerdings nicht vor. Die Nachfrage ergab, dass A. Bantleon zwar mit dem Stamm ge- arbeitet, ihn aber nicht selbst isoliert hat (A. BANTLEON, persönliche Mitteilung 2004). Die bei BANTLEON (1987) erwähn- ten *Lb. sakei* Stämme Ls2 bis Ls13 wurden bereits von KAGERMEIER (1981) untersucht, werden dort aber nicht als Ls- Nummern geführt, sondern in der Original- nummerierung von W. Holzapfel. Sie ge- langten um 1986 in die Hohenheimer Sammlung (A. BANTLEON, persönliche

Mitteilung 2004). Den Recherchen zufolge ist der Stamm LTH673 identisch mit dem Stamm Ls3 bei BANTLEON (1987) und dieser wiederum mit dem *Lb. sakei* Stamm 85 bei KAGERMEIER (1981). Ein Teil der Arbeit von A. Kagermeier wurde damals an der BAFF durchgeführt. W. Holzapfel hat in 1980 eine Liste von Milchsäurebakterien erstellt, die von ihm in 1976 während eines Aufenthaltes an der BAFF isoliert und in die Stammsammlung der BAFF eingestellt wurden, insgesamt 546 Stämme. Diese Liste enthält auch einen *L. sakei* Stamm Lb85, welcher aus einer nicht näher beschriebenen Salami isoliert wurde.

Da der Stamm Lb85 nach wie vor in der Sammlung der BfEL-Kulmbach vorliegt, sollte überprüft werden, ob es sich dabei tatsächlich um den Stamm LTH673 handeln könnte.

## Material und Methoden

**Bakterien.** Die *Lactobacillus sakei* Stämme BAFF-Lb674 und BAFF-Lb85 wurden der Stammsammlung der BfEL-Kulmbach als Lyophilisate in Magermilch entnommen. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C in MRS-Bouillon oder auf MRS-Agar (pH6.5, ohne Acetat). Bacteriocinbildung wurde bei 25 °C untersucht.

**Untersuchungen zum Phänotyp.** Der Nachweis der Bacteriocinproduktion erfolgte im Agardiffusionstest mit *Listeria innocua* Li1 und *Listeria ivanovii* Li4 als Indikatorstämmen wie zuvor beschrieben (KRÖCKEL, 1993). Morphologische und metabolische Merkmale wurden nach SCHILLINGER und LÜCKE (1987) im miniaturisierten Mikrotiterplattensystem bestimmt. Zur Erfassung von Unterschieden im Koloniebild wurden die Stämme auf MRS-Agar (pH6.5) vereinzelt und bei 25 °C inkubiert. Nach 5, 7, 9, 12 16 und 28 Tagen wurde die Koloniemorphologie visuell ausgewertet.

**Untersuchungen zum Genotyp.** Genetische Fingerprints wurden mittels BOX-rep-APD und M13-RAPD erstellt (KRÖCKEL, 1997; KRÖCKEL *et al.*, 2003). Zum Nachweis des Sakacin P Genclusters (HÜHNE *et al.*,

1996) und zur Überprüfung der Organisation der *spp*-Gene wurden ausgewählte Regionen des Sakacin P Genclusters mittels geeigneter Primer amplifiziert (Tab. 1). Zur Überprüfung der DNA-Sequenz von *orf5* im Bereich der Rasterschubmutation (Position 1208 in den von MATHIESEN *et al.* (2005) angegebenen Sequenzen GenBank AJ844594 und AJ844595) wurde ein 264 bp langer DNA-Abschnitt (Pos. 1134-1397 in AJ 844594) mittels Standard-PCR amplifiziert und sequenziert (Fa. Sequiserve, Vaterstetten).

Tab. 1: Primerbindungsstellen innerhalb des Sakacin P Genclusters und Amplikongrößen. Positionen nach HÜHNE *et al.* (1996)

Primer	Position	Amplikongröße
MBB12	spiA 3241-3257	1213 bp
MBRR13	spiT 4438-4454	
MF4B2	sppR 2180-2196	686 bp
M3R12	sppA 2850-2866	
MB12	sppA 2974-2989	283 bp
MSRR12	spiA 3241-3257	

## Ergebnisse

Der Stamm Lb85 konnte mehr als 25 Jahre nach seiner Aufnahme in die BAFF-Sammlung reaktiviert werden und stand somit für eine phänetische und genetische Überprüfung zur Verfügung.

**Phänotyp.** Der Stamm *Lb. sakei* Lb85 produzierte wie aufgrund der Recherchen erwartet ein anti-listerielles Bacteriocin. Die zellfreien Überstände der Übernachtskulturen ergaben für *Lb. sakei* Lb85 und *Lb. sakei* Lb674 im Agardiffusionstest identische Hemmhofdurchmesser gegen die Indikatorstämmen: 17 mm gegen *Listeria innocua* Li1 und 24 mm gegen den sensitiveren Stamm *Listeria ivanovii* Li4.

Die Fermentationsmuster beider Stämme waren nicht sicher unterscheidbar: Äsculin, Arabinose, Arginin, Galactose, Amygdalin, Melibiose, Ribose, Saccharose und Salicin wurden stets von beiden Stämmen fermentiert. Lactose, Mannitol, Melezitose,

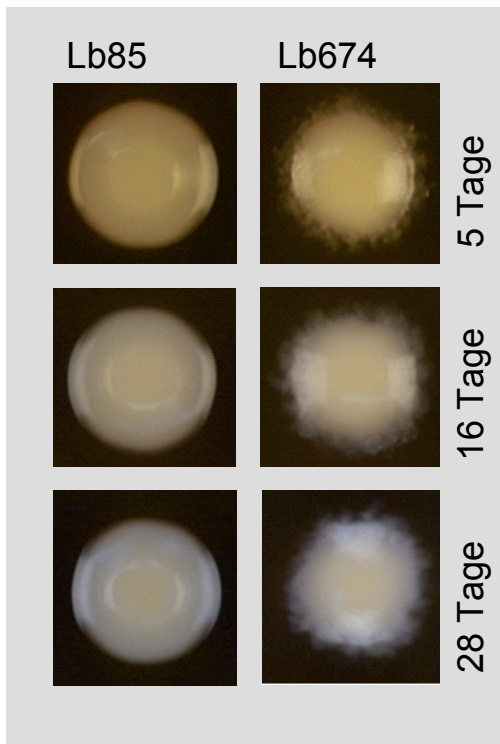


Abb. 1: Koloniemorphologie der *Lb. sakei* Stämme Lb85 und Lb674 auf MRS(pH6.5)-Agar bei 25 °C

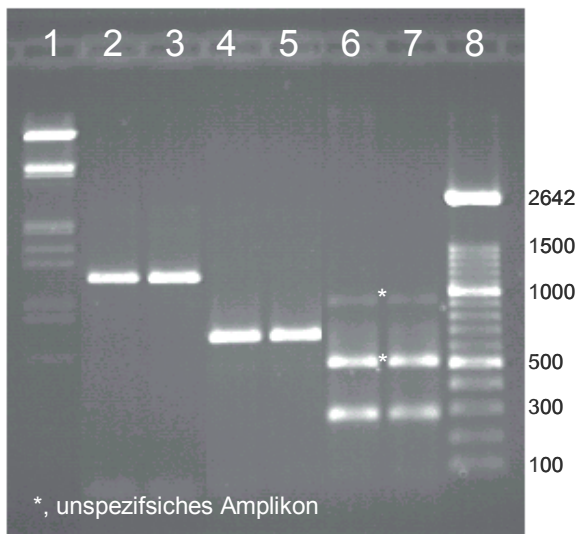


Abb. 2: PCR-Amplifikation überlappender Genbereiche innerhalb des Sakacin P Operons von Lb85 (syn. LTH673) und Lb674 (syn. LV69). 1, Lambda *EcoRI/HindIII*; 2, Lb 85; 3, Lb 674; 4, Lb 85; 5, Lb 674; 6, Lb 85; 7, Lb 674; 8, 100-bp Leiter. Primerbezeichnung (Position nach HÜHNE *et al.*, 1996), Amplicongröße: MBB12 (*spiA* 3241-3257) / MBRR13 (*spiT* 4438-4454), 1213 bp; MF4B2 (*sppR* 2180-2196) / M3R12 (*sppA* 2850-2866), 686 bp; MB12 (*sppA* 2974-2989) / MSRR12 (*spiA* 3241-3257), 283 bp

Rhamnose, Sorbitol und Xylose waren bei beiden Stämmen stets negativ. Unterschiedliche Ergebnisse wurden für die Merkmale Cellobiose, Gluconat, Maltose, Raffinose und Trehalose erhalten, wobei nur bei Cellobiose ein klarer Unterschied zwischen Lb85 (negativ) und Lb674 (positiv) vorlag. Der Vergleich mit BANTLEON (1987) und KRÖCKEL (1992) zeigte jedoch, dass auch dieses Merkmal bei beiden Stämmen unsicher ist.

Die Koloniemorphologie beider Stämme erscheint unterschiedlich: Lb85 zeigt einen glattrandigen Kolonietyp, bei Lb674 erscheinen die Kolonien am Rande unregelmäßig (gefranst) (Abb. 1). Unterschiede waren nach 5 Tagen gut erkennbar und blieben auch nach längerer Inkubation erhalten.

Zusätzliche Hinweise auf die Verschiedenheit beider Stämme kommen aus vergleichenden Untersuchungen mittels FTIR-Spektroskopie (L. AXELSSON, persönliche Mitteilung 2004; OUST *et al.*, 2004).

**Genotyp.** Die für die Sakacin P-Produktion verantwortlichen Gene liegen in der gleichen Orientierung vor wie bei LTH673 und Lb674 (Abb. 2). Damit war klar, dass LTH673 und Lb85 mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Isolat her identisch sind. Die unspezifischen Amplicons in Spur 6 und 7 (Abb. 2) waren nach Anpassung der Annealing-Temperatur nicht mehr sichtbar.

Untersuchungen zur Bacteriocinproduktion in *Lb. sakei* Lb674 haben ergeben, dass stromabwärts des Sakacin P Genclusters *sppK-sppR-sppA-spiA-sppT-sppE* ein induzierbarer Promotor liegt, unter dessen Einfluss die Expression eines zweiten Bacteriocins, Sakacin Q, und dessen Immunitätsprotein stehen, sowie zwei weitere Gene mit bislang unbekannter Funktion, *orf4* und ein Pseudoimmunitätsgen, *orf5*. Letzteres enthält eine Rasterschubmutation in Position 1208 in den von MATHIESEN *et al.* (2005) angegebenen Sequenzen (GenBank AJ844594 und AJ844595). Um abzuklären, ob diese Mutation auch bei Lb85 vorliegt, wurde ein 264 bp umfassender DNA-Abschnitt (Pos.

1134-1397 in AJ844594) amplifiziert und sequenziert. Die erhaltene Sequenz war zu 100 % identisch mit den entsprechenden Bereichen der Sequenzen AJ844594 und AJ844595, ein weiteres Indiz für die Identität von LTH673 und Lb85.

Da beide Stämme, Lb85 (syn. LTH673) und Lb674 (syn. LV69), in Kulmbach vorlagen, war nicht sicher auszuschließen, dass im Rahmen einer Verwechslung oder Kontamination Lb674 ebenfalls mit Lb85 identisch war. Die 100%ige Übereinstimmung der für die Bacteriocinproduktion kodierenden Genbereiche könnte dafür einen Anhaltspunkt liefern. Es wurde daher geprüft, ob neben den phänetischen Differenzen auch Unterschiede in den BOX-rep-APD- und M13-RAPD-Profilen beider Stämme vorliegen. Die genetischen Fingerprints von Lb85 und Lb674 zeigten ein hohes Maß an Übereinstimmung (BOX-rep-APD, 85 %; M13-RAPD, 93 %), die BOX-PCR ließ jedoch eine Unterscheidung der Amplikonprofile in drei Positionen zu (1700, 650 und 400 bp), die M13-RAPD in einer Position (1380 bp) (Abb. 3).

## Diskussion

Rezente Untersuchungen haben gezeigt, dass zum einen die Anzahl der von einem einzelnen Stamm produzierten Bacteriocine beträchtlich variiert und zum anderen eine beachtliche genetische Flexibilität hinsichtlich der Organisation der Bacteriocin-Genorte existiert (EIJSink *et al.*, 2002; CASAUS *et al.*, 1997). So produziert *Lactobacillus sakei* 5, ein Isolat aus Malz, neben Sakacin P zusätzlich zwei weitere Bacteriocine, Sakacin T und Sakacin X. Die strukturellen und regulatorischen Gene für Sakacin T und Sakacin X sind Teil des Sakacin TX Locus, welcher aus zwei benachbarten, aber gegenläufig orientierten Genclustern besteht (VAUGHAN *et al.*, 2004). Einzelne Gene des Sakacin P Clusters finden sich auch in Bacteriocin-negativen *Lb. sakei* Isolat. In Stamm Lb790 etwa finden sich homologe, zum Teil durch Mutation nicht funktionell gewordene Gene zu *sppK*, *sppR*, *sppT* und *sppE* (MORETTO *et al.*, 2005).

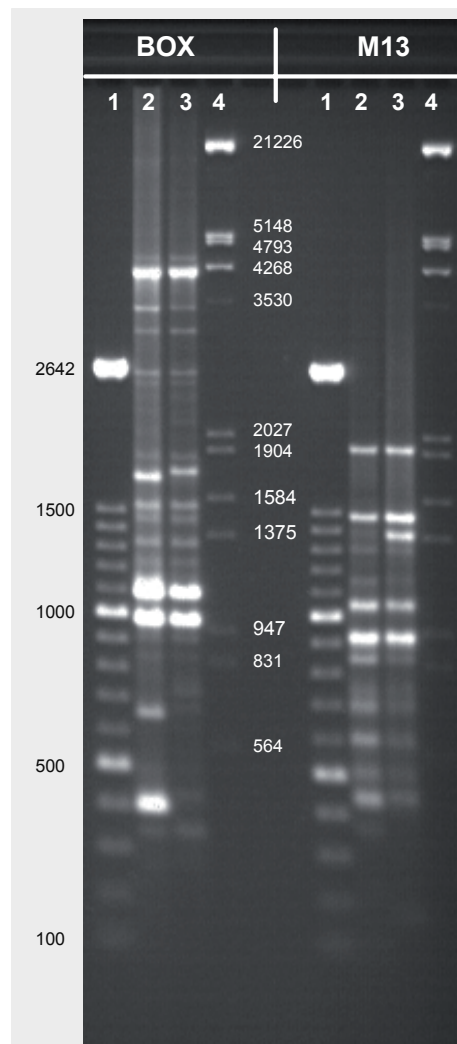


Abb. 3: Genetischer Fingerabdruck Sakacin P produzierender *Lactobacillus sakei* Stämme mittels BOX-rep-APD and M13-RAPD. Spur 1, 100-bp Leiter; Spur 2, Lb 85 (syn. LTH 673); Spur 3, Lb 674 (syn. LV69); Spur 4, Lambda *EcoRI/HindIII*

Für den Sakacin P Produzenten *Lactobacillus sakei* I151, isoliert aus natürlich fermentierter Italienischer Rohwurst aus der „Friuli Venezia Giulia“-Region, wurde das Sakacin P Cluster nun ebenfalls sequenziert (URSO *et al.*, 2006a,b). Dabei wurde eine Übereinstimmung von >99 % mit der von HÜHNE *et al.* (1996) angegebenen Sequenz berichtet. Die Sequenz von URSO *et al.* (2006) ist am 5'-Ende 291 Nukleotide und am 3'-Ende 182 Nukleotide kürzer. Sie umfasst mit 7124 Nukleotiden 473 Nukleotide weniger als die Referenzsequenz. Während nach BRURBERG *et al.*

(1997) das Sakacin P Gencluster von LTH673 zu 100 % identisch mit dem von BAFF-Lb674 ist, zeigt I151 je einen Nukleotidaustausch in *sppT* und *sppE*, die sich in beiden Fällen auch auf die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Exportproteine SppT (konservativer Austausch) und SppE (nicht-konservativer Austausch) auswirken. Da nur zwei von 7124 Nukleotiden abweichen, lässt sich für den angegebenen Sequenzbereich auf eine Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz von 99,97 % schließen. Wie bei Lb674 und Lb85 ist auch bei I151 das Sakacin P Gencluster auf dem Bakterienchromosom lokalisiert.

Die Organisation der Gene des Sakacin P Clusters scheint bei Sakacin P produzierenden *Lb. sakei* Stämmen generell identisch zu sein. Wie bei Lb85, Lb674 und I151 wurden ähnliche Ergebnisse wie in Abbildung 2 gezeigt auch mit den *Lb. sakei* Isolaten Lb1046 (gemischtes Hackfleisch aus Metzgerei, Kulmbach 1991), Lb1048 (gemischtes Hackfleisch aus Metzgerei, Bayreuth 1991) und Lb1049 (Rinderlende aus Metzgerei, Kronach 1991) gefunden (KRÖCKEL, unveröffentlicht). Die Organisation des Genclusters kann daher nicht alleine als Hinweis für die Identität zweier Isolate dienen.

Mittels FTIR-Spektroskopie lassen sich innerhalb der Art *Lb. sakei* mehrere Cluster unterscheiden (OUST *et al.*, 2004). So findet sich z. B. der Sakacin A Produzent *Lb. sakei* Lb706 in einem anderen Cluster als der Sakacin P Produzent *Lb. sakei* LTH 673 und der wiederum in einem anderen Cluster als der Sakacin P Produzent *Lb. sakei* Lb1048. Der Stamm Lb1048 wurde in 1991 von L. Kröckel aus Hackfleisch (50 % Rind, 50 % Schwein) einer Bayreuther Metzgerei isoliert (KRÖCKEL, 1997; <http://www.genres.de/mgrdeu/>). Er wird bei OUST *et al.* (2004) als Lb16 und bei HOLCK *et al.* (1994) als *Lb. sake* 16 bezeichnet.

Der Stamm Lb85 wurde bislang nicht in die Datensammlung der MGRDEU (Mikrobiologisch-genetische Ressourcen

Deutschland, <http://www.genres.de/mgrdeu/>) aufgenommen, da nur spärliche Informationen zu diesem Stamm vorlagen. Dies hat sich durch die nun vorliegenden Recherchen und Untersuchungen geändert. Der BfEL stehen damit zwei genetisch sehr gut charakterisierte Sakacin P-Stämme für weitere Studien zur Verfügung. Im Rahmen der Recherchen wurde auch die Zuordnung weiterer von BANTLEON (1987) und KAGERMEIER (1981) untersuchter *Lb. sakei* Stämme aus der BAFF-Sammlung möglich (Tab. 2).

Tab. 2: *Lactobacillus sakei* Stämme der BAFF-Sammlung und ihre Stammbezeichnung bei BANTLEON (1987) und KAGERMEIER (1981)

BANTLEON (1987)	KAGERMEIER (1981)	BAFF-Sammlung (HOLZAPFEL, 1976)
Ls2	83	Lb 83
Ls3	85	Lb 85
Ls4	86	Lb 86
Ls5	93	Lb 93
Ls6	429	Lb 429
Ls7	441	Lb 441
Ls8	450	Lb 450
Ls9	488	Lb 488
Ls10	489	Lb 489
Ls11	9/3	keine Entsprechung
Ls12	M28/5	
Ls13	M38/3	

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen zum einen, dass Lb85 und LTH673 identische Stämme sind und dass es sich bei Lb85 und Lb674 um verschiedene Stämme handelt, die beide Sakacin P produzieren. Unterschiede sind sowohl im Phänotyp als auch in den BOX-rep-APD- und M13-RAPD-Profilen nachweisbar. Zum anderen wird deutlich, welchen unschätzbaren Wert gut geführte Mikroorganismensammlungen und sorgfältige Aufzeichnungen für die Wissenschaftsgemeinschaft haben.

## Literatur

- Bantleon, A. (1987) *Lactobacillus sake* und *Lactobacillus curvatus* als Starterkulturorganismen für die Rohwurstreifung. Dissertation, Universität Hohenheim.
- Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink V.G.H. (1997) Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.* 26, 347-360.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E., Holo, H. (1997) Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143, 2287-2294.
- Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F. (2002) Production of Class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Anton. Leeuw.* 81, 639-654.
- Holck, A., Axelsson, L., Hühne, K., Kröckel, L. (1994) Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. *FEMS Microbiol. Lett.* 115, 143-150.
- Hühne, K., Axelsson, L., Holck, A., Kröckel, L. (1996) Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. *Microbiology* 142, 1437-1448.
- Kagermeier, A. (1981) Taxonomie und Vorkommen von Milchsäurebakterien in Fleischprodukten. Dissertation, Universität München.
- Kröckel, L. (1992) Bacteriocine von Milchsäurebakterien für Fleischerzeugnisse. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung* 31 (116), 207-215.
- Kröckel, L. (1993) Sakacin 674 – Ein Bacteriocin aus *Lactobacillus sake* Lb674. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung* 32 (122), 430-435.
- Kröckel, L. (2003) Nutzbarmachung mikrobiologisch-genetischer Ressourcen zur Biokonservierung von Fleischerzeugnissen. In: G. Rahmann & H. Nieberg (Hrsg.) *Ressortforschung für den ökologischen Landbau 2002*. Landbauforschung Völkenrode – FAL Agricultural Research, Braunschweig (ISBN 3-933140-81-1), Sonderheft 259, 65-69.
- Kröckel, L. (1997) Differenzierung von *Lactobacillus sake* und *L. curvatus* mittels BOX-rep-APD. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung* 36 (137), 286-294.
- Kröckel, L., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Bantleon, A., Ludwig, W. (2003) *Lactobacillus versmoldensis* sp. nov., isolated from raw fermented sausage. *Int. J. System. Evolution. Microbiol.* 53, 513-517.
- Mathiesen, G., Hühne, K., Kröckel, L., Axelsson, L., Eijsink, V.G.H. (2005) Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*, showing strong translational coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Appl. Environ. Microbiology* 71, 3565-3574.
- Moretro, T., Naterstad, K., Wang, E., Aasen, I.A., Chaillou, S., Zagorec, M., Axelsson, L. (2005) Sakacin P non-producing *Lactobacillus sakei* strains contain homologues of the sakacin P gene cluster. *Res. Microbiol.* 156 (9), 949-960.
- Neumeyer, B. (1997) Wirkung bakteriozinbildender Milchsäurebakterien auf das Wachstum von Listerien in Fleisch und Fleischprodukten. Dissertation, Universität Hohenheim.
- Oust, A., Moretro, T., Kirschner, C., Narvhus, J.A., Kohler, A. (2004) FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *J. Microbiol. Meth.* 59, 149-162.
- Schillinger, U., Lücke, F.-K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol* 4, 199-208.
- Shaw, B.G., Harding, C.D. (1984) A numerical taxonomical study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. *J. Appl. Bacteriol.* 56, 25-40.
- Tichaczek, P. (1993) Charakterisierung der Bacteriozine Curvacin A aus *Lactobacillus curvatus* LTH1174 und Sakacin P aus *L. sake* LTH673. Dissertation, Universität Hohenheim.
- Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., Cocolin, L. (2006a) Sequencing and expression analysis of the sakacin P bacteriocin produced by a *Lactobacillus sakei* strain isolated from naturally fermented sausages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 (4), 480-485.
- Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., Cocolin, L. (2006b) Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. *Int. J. Food Microbiol.* 110 (3), 232-239.
- Vaughan, A., O' Mahony, J., Eijsink, V.G.H., O'Connell-Motherway, M., van Sinderen, D. (2004) Transcriptional analysis of bacteriocin production by malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *FEMS Microbiology Letters* 235, 377-384.

