

Nur für persönlichen Gebrauch

Ulrich Schillinger, Rolf Geisen und
Wilhelm H. Holzäpfel, Bundesforschungsanstalt
für Ernährung, Karlsruhe

Bakteriozine von Milchsäurebakterien – Eigenschaften, Wirkungsmechanismen und Genetik

Viele Milchsäurebakterien (MSB) bilden neben antagonistisch wirksamen Stoffwechselprodukten wie organischen Säuren und Peroxiden Bacteriocine, die unter anderem gegen pathogene Bakterien in Lebensmitteln wirksam sein können. Wegen dieser Eigenschaften finden MSB-Bacteriocine besonderes Interesse im Hinblick auf eine mögliche Anwendung zur Lebensmittelkonservierung. Diese Bacteriocine bilden aufgrund ihrer chemischen Struktur und physikochemischen Eigenschaften drei Gruppen: kleine, hitzestabile, bis zu etwa 60 Aminosäuren lange Peptide, hitzeempfindliche Proteine mit einem Molekulargewicht von über 30 kDa und Glyko- beziehungsweise Glykolipoproteine. Das Wirkungsspektrum kann äußerst eng begrenzt sein, so daß nur wenige Stämme derselben Art gehemmt werden. Andererseits gibt es Bacteriocine wie das Nisin, die gegen viele Gram-positive Bakterien wirksam sind. Neben dem seit langem bekannten Nisin sind inzwischen über hundert Bacteriocine aus allen Gattungen der Milchsäurebakterien beschrieben worden. Durch intensive Untersuchung einiger dieser Substanzen wurden in den letzten Jahren umfangreiche neue Erkenntnisse bezüglich der Organisation der Bacteriocingene und des Wirkungsmechanismus gewonnen.

Einteilung der bekannten Bacteriocine von Milchsäurebakterien

Als Bacteriocine werden definitionsgemäß Peptide beziehungsweise Proteine bezeichnet, die eine bakterizide Aktivität vor allem gegen solche Bakterien aufweisen, die mit dem Bacteriocinproduzenten nahe verwandt sind [15]. Andererseits gibt es jedoch bei den Milchsäurebakterien (MSB) eine größere Anzahl von Bacteriocinen, die neben Milchsäurebakterien auch in Lebensmitteln vorkommende pathogene und toxischogene Gram-positive Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* oder *Clostridium botulinum* sehr effektiv unterdrücken können [5, 11, 27]. Dieses antagonistische Potential versucht man, bei der Konservierung bestimmter Lebensmittelanzuwenden [29]. Seit Klaenhammer 1988 eine Übersicht über die damals bekannten MSB-Bacteriocine verfaßte [15], ist ihre Zahl von etwa zwanzig auf über hundert gestiegen. Die Klassifizierung der Bacteriocine ist in Tabelle 1 dargestellt. Die meisten der bisher genauer untersuchten MSB-Bacteriocine gehören zur Klasse I.

Klasse I-Bacteriocine: kleine, hitzestabile Peptide

Das Molekulargewicht der Klasse I-Bacteriocine (Tab. 2) liegt zwischen 2500 und 6000 Da. Zu unterscheiden ist zwischen den sogenannten Lantibiotika (Ia) mit dem bekanntesten Vertreter Nisin und den nicht Lanthionin-haltigen Peptiden (Ib). Lantibiotika sind ribosomal synthetisierte Polypeptide, die die ungewöhnlichen Amino-

säuren Lanthionin, β -Methyl-Lanthionin, Dehydroalanin und Dehydrobutyrin enthalten [13]. Sie entstehen aus Precursormolekülen durch Abspaltung einer Leader-Region. Die untypischen Aminosäuren sind das Ergebnis posttranslationaler Modifikationen von Serin, Threonin und Cystein. Das am besten untersuchte Lantibiotikum ist Nisin [12]. Es ist ein zyklisches, aus 34 Aminosäuren bestehendes Peptid mit einem Molekulargewicht von 3353 Da; mehrere Moleküle können sich zu Di- oder Tetrameren zusammenlagern. Nisin tritt in den zwei natürlichen Varianten A und Z auf, die sich nur in einer Aminosäure unterscheiden: Im Nisin Z ist an Position 27 Histidin durch Asparagin ersetzt [22]. Nisin besitzt ein für MSB-Bacteriocine auffallend breites Wirkungsspektrum: Es ist gegen die meisten Gram-positiven Bakterien wirksam – besonders empfindlich sind Laktokokken. Bei Bazillen und Clostridien wird nicht nur das Wachstum der vegetativen Zellen, sondern auch das Auskeimen der Sporen gehemmt. Eine Destabilisierung der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien durch Chelatbildner wie EDTA kann die Aktivität von Nisin gegenüber diesen ansonsten resistenten Mikroorganismen erhöhen [31].

Klasse	Eigenschaften
I	Kleine membranaktive, hitzestabile Peptide (< 10kDa)
Ia	Lantibiotika
Ib	Nicht-lanthioninhaltige Peptide – gegen <i>Listeria</i> aktive Peptide (N-terminale Konsensussequenz: –Tyr–Gly–Asn–Gly–Val–Xaa–Cys–) – Bacteriocine, deren Wirksamkeit von der komplementären Wirkung zweier Peptide abhängt (Zwei-Komponenten-Bacteriocine) – thiolaktivierte Bacteriocine, die einen reduzierten Cysteinrest für ihre Aktivität benötigen
II	Große hitzeempfindliche Proteine (> 30 kDa)
III	komplexe Bacteriocine (benötigen eine Nicht-Protein-Komponente, z. B. einen Kohlenhydrat- oder Lipidrest für ihre Aktivität)

Tab. 1: Klassifizierung der Bacteriocine von Milchsäurebakterien (MSB)

Lantibiotika	Nisin	<i>L. lactis</i> <i>ssp. lactis</i>	gr ⁺ -Bakterien	3353	34	konjugatives 70 kB-Transposon	
	Lacticin 481	<i>L. lactis</i> <i>ssp. lactis</i>	MSB, <i>Cl. tyrobutyricum</i>	2901	27	konjugatives 70 kB-Transposon	
	Lactocin 5	<i>Lb. sake</i>	MSB	3769	33	50 kB-Plasmid	
	Carnocin U149	<i>C. piscicola</i>	MSB	4635	35-37		
Nicht-Lanthionon- haltige Peptide mit <i>Listeria</i> - Konsensussequenz	Carnobacteriocin B2	<i>C. piscicola</i>	MSB, <i>Listeria</i>	4969	48	61 kB-Plasmid	
	Bavaricin A	<i>Lb. bavaricus</i>	MSB, <i>Listeria</i>	3500- 4000	41		
	Curvacin A	<i>Lb. curvatus</i>	MSB, <i>Listeria</i>	5000 (?)	38-41	60 kB-Plasmid	
	Sakacin A	<i>Lb. sake</i>	MSB, <i>Listeria</i>	4308	41	60 kB-Plasmid	
	Sakacin P	<i>Lb. sake</i>	MSB, <i>Listeria</i> , <i>Brochothrix</i>		43	chromosomale DNA	
	Leucocin A	<i>Leuc. gallium</i>	MSB, <i>Listeria</i>	3932	37	11,6 kB-Plasmid	
	Mesentericin Y105	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>Listeria</i>	3666	36		
	Pediocin PA-1= Pediocin ACh	<i>Ped. acidilactici</i>	MSB u.a. gr ⁺	4629	44	8,9 kB-Plasmid	
	Zwei-Komponenten- -Bacteriocine	Lactacin F	<i>Lb. johnsonii</i>	Laktobazillen, <i>Ent. faecalis</i>	6300	57, 62	episomal und konjugativ
		Plantaricin A	<i>Lb. plantarum</i>	MSB	2682 (α) 2758 (β)	22 (α) 23 (β)	chromosomale DNA
Lactococcin G		<i>L. lactis</i>	Laktokokken (?)	4376 (α) 4109 (β)	39 (α) 35 (β)		
Thiol-aktivierte Bacteriocine	Lactococcin B	<i>L. lactis</i>	Laktokokken			60 kB-Plasmid	
Andere	Lactococcin A	<i>L. lactis</i> <i>ssp. cremoris</i>	Laktokokken	5783	54	60 kB-Plasmid	
	Diplococcin	<i>L. lactis</i> <i>ssp. cremoris</i>	Laktokokken	5300	51	konjugatives 81 kB-Plasmid	
	Lactacin B	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. delbrückii</i>	8100			
	Curvacin FS47	<i>Lb. curvatus</i>	Laktobazillen <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i>	4070	36-45		
	Carnobacteriocin A= Piscicolin 61	<i>C. piscicola</i>	MSB, <i>Listeria</i>	5052	53	75 kB-Plasmid bzw. 22 kB-Plasmid	

Tab. 2: MSB-Bacteriocine der Klasse I. gr⁺-Bakterien = Gram-positive Bakterien, MSB = Milchsäurebakterien

Die ebenfalls zur Klasse I zählenden nicht Lanthionin-haltigen Peptide weisen eine Reihe von strukturellen Gemeinsamkeiten auf. Wie die Lantibiotika werden auch sie als Precursormoleküle synthetisiert, die eine N-terminale Leader-Sequenz von

18 oder 21 Aminosäuren aufweisen. Bei allen bisher untersuchten Bacteriocinen dieser Klasse wurden zwei aufeinanderfolgende Glycinreste unmittelbar vor der Spaltstelle (processing site) des Precursormoleküls identifiziert. Dies deutet auf einen ge-

meinsamen Prozessierungsmechanismus dieser kleinen hydrophoben Peptide hin. Das N-terminale Ende des Prepeptids beginnt meist mit einem Methionin, gefolgt von einem Lysinrest, und die aktive Form des Bacteriocins weist am N-Terminus ei-

nen Lysin- oder einen Argininrest auf [7]. Diese Peptide werden im Gegensatz zu den Lantibiotika nicht mehr posttranslational modifiziert. Das aktive („reife“) Molekül besteht bei den Bacteriocinen dieser Klasse aus 35 bis etwa 60 Aminosäuren und kann

Wirkung oder Spezifität des Bacteriocins in Zusammenhang gebracht wird [16]. All diese von sehr unterschiedlichen Milchsäurebakterien gebildeten Bacteriocine weisen Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz auf (Abb. 1). Sakacin A ist mit Curvacin A

cin PA-1 und eine 39 %ige Homologie zu Leucocin A [20].

Zu den nicht Lanthionin-haltigen Peptiden der Klasse I gehören auch Bacteriocine, für deren Aktivität das Zusammenwirken zweier Peptide notwendig ist (Tab. 2). So

	1	10	20	30	40	50																																																			
LEUCOCIN A	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	T	K	S	G	C	S	V	N	W	G	E	A	F	S	A	G	V	H	R	L	A	N	G	N	G	F	W																					
MESENTERICIN Y105	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	T	K	S	G	C	S	V	N	W	G	E	A	F	S	A	G	V	H	R	L	A	N	G	N	G	F	W																					
SAKACIN A	R	S	Y	G	N	G	V	H	C	T	K	S	G	C	S	V	N	W	G	E	A	F	S	A	G	V	H	R	L	A	N	G	N	G	F	W																					
SAKACIN P	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	T	K	S	G	C	S	V	N	W	G	E	A	F	S	A	G	V	H	R	L	A	N	G	N	G	F	W																					
PEDIOCIN PA-1	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	T	K	S	G	C	S	V	N	W	G	E	A	F	S	A	G	V	H	R	L	A	N	G	N	G	F	W																					
CARNOBACTERIOCIN B2	V	N	Y	G	N	G	V	S	C	S	K	T	K	C	S	V	N	W	G	Q	A	F	Q	L	E	R	Y	T	A	G	T	N	S	F	V	S	G	V	A	S	G	A	G	S	I	G	R	R	P								
PISCICOLIN 61	D	Q	H	S	D	G	V	N	Y	G	K	G	S	S	L	S	K	G	G	A	K	C	G	L	S	I	V	G	G	L	A	T	I	P	S	G	P	L	G	W	L	A	G	A	A	G	V	I	N	S	C	M	K				
CURVATICIN FS47	Y	T	A	K	Q	C	L	Q	A	I	G	S	C	D	I	A	G	T	G	A	G	A	G	G	P	A	G	A	F	V	G	A	X	V	X	I							
LACTOCOCCIN A	K	L	T	F	I	Q	S	T	A	A	G	D	L	Y	N	T	N	T	H	L	Y	V	Y	Q	Q	T	Q	N	A	F	G	A	A	N	T	I	V	N	G	W	M	G	G	A	A	G	G	F	G	L	H	H					
LACTACIN F	R	N	N	W	Q	T	N	V	G	G	A	V	G	S	A	N	I	G	A	T	V	G	G	T	I	C	G	P	A	C	A	V	A	G	A	H	Y	L	P	I	L	W	T	G	V	T	A	A	T	G	G	F	G	K	I	R	K

Abb. 1: Aminosäuresequenzen von Bacteriocinen der Klasse I. Identische Aminosäuren sind umrandet. Die Sequenz von Curvaticin FS47 ist nur bis zur 38. Aminosäure bekannt. Die Sequenzdaten sind der Literatur entnommen.

amphiphile Helices mit unterschiedlicher Hydrophobizität und β -Faltblattstruktur bilden.

Ein großer Teil der nicht Lanthionin-haltigen Bacteriocine der Klasse I gehört zu den gegen *Listeria* aktiven Peptiden, die im N-terminalen Bereich eine gemeinsame Sequenz (-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-) aufweisen, die direkt mit der bakteriziden

identisch [28], und Leucocin A unterscheidet sich von Mesentericin Y105 lediglich durch einen zusätzlichen Tryptophanrest am C-terminalen Ende und in zwei weiteren Aminosäuren [10]. Auch die von unterschiedlichen Arbeitsgruppen untersuchten Pediocine AcH und PA-1 von *Pediococcus acidilactici* erwiesen sich als identisch. Bavaricin A zeigt eine 66 %ige Homologie mit Pedio-

ergänzen sich beim Lactococcin G das α - und β -Peptid in ihrer bakteriziden Wirkung. Ein Mischungsverhältnis von etwa 8:1 ergibt eine im Vergleich zu den einzelnen Peptiden 5fach höhere Aktivität [23]. Beim Plantaricin A wirken zwei nahezu identische Peptide zusammen, die sich nur durch eine zusätzliche Aminosäure unterscheiden [24]. Auch Lactacin F von *Lactobacillus johnsonii*

Dieses Lehrbuch setzt Standards!

Alberts, B. et al.

Molekularbiologie der Zelle

Übersetzung herausgegeben von L. Jaenicke
 3. Auflage

1995. L., 1600 Seiten mit
 1400 Abbildungen davon
 700 in Farbe und 50 Tabellen.
 Gebunden. Ca. DM 148.00.
 ISBN 3-527-30055-4
 (VCH, Weinheim)

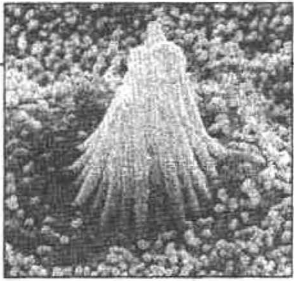
Das Standard-Lehrbuch der molekularen Zellbiologie jetzt durchgehend vierfarbig!
 Wiederum wurde der Inhalt völlig neu bearbeitet und dabei den aktuellen Entwicklungen des Fachgebiets angepaßt. Das erfolgreiche didaktische Konzept konnte durch Einbe-

ziehung zusätzlicher Druckfarben und graphisch hervorragende Aufarbeitung weiter verfeinert werden. Der flüssige, lockere Stil der Übersetzung macht das Lernen zu einem echten Lese-Erlebnis!

Aus Rezensionen zur zweiten Auflage:
 Dieses Buch ist erneut ein großer Wurf; die in den vergangenen Jahren aufgekommene starke Konkurrenz konnte noch einmal abgeschüttelt werden, "this is the real thing!"

Die „Molekularbiologie der Zelle“ hat schon bei ihrem ersten Erscheinen Traumnöten der Kritik erhalten.
 Mehr Lob läßt sich nicht anhäufen, außer vielleicht mit der Aussage, daß dieses Buch mit der Reifung noch schöner geworden ist... Lesevergnügen und Bildung, im besten Sinne des Wortes, sind garantiert.

Nachrichten aus Chemie,
 Technik und Laboratorium



Ihre Bestellung richten Sie bitte an Ihre Buchhandlung oder an:

VCH, Postfach 10 11 61,
 D-69451 Weinheim,
 Telefax 0 62 01 - 60 61 84

VCH, Hardstrasse 10,
 Postfach, CH-4020 Basel
 Telefax 0 61 - 2 71 06 18

gehört zu dieser Gruppe aus Zwei-Komponenten-Bacteriocinen. Das Lactacin F-Operon enthält die Struktur Gene für zwei Peptide, die sich in ihrer Wirkung ergänzen. Die Bildung eines aktiven Komplexes aus dem LafA- und dem LafX-Peptid ist mit einer Erweiterung des Wirkungsspektrums ver-

wesentlich weniger bekannt als über die Peptid-Bacteriocine der Klasse I. Mit Ausnahme des von *Enterococcus faecalis* S-48 gebildeten Bacteriocins werden sie von Laktobazillen produziert. Die Proteine werden in der Regel durch Erhitzen auf Temperaturen über 80°C irreversibel denaturiert. Das Mo-

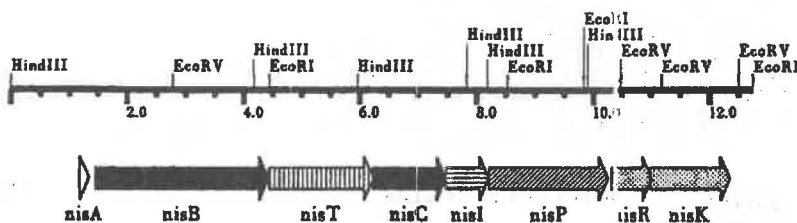


Abb. 2: Genkarte des Nisin-Operons von *L. lactis* 6F3 mit den bekannten acht Genen sowie verschiedenen Restriktionsschnittstellen. Die Zahlen entsprechen Kilobasen. (nach [8])

bunden: Das LafA-Peptid ist nur gegen *Lactobacillus helveticus* aktiv – durch die Kombination mit dem LafX-Peptid erhält das Lactacin F seine Aktivität gegen *Lactobacillus delbrueckii* und gegen *Enterococcus faecalis* [2].

Klasse II-Bacteriocine: große, hitzeempfindliche Proteine mit Molekulargewicht von mehr als 30 kDa

Diese Klasse umfaßt bisher nur wenige Bacteriocine (Tab. 3), und über diese ist

lekulargewicht liegt über 30 kDa. In wäßriger Lösung bilden diese Proteine, jedoch offensichtlich Aggregate von wesentlich höherem Molekulargewicht, zum Beispiel von mehr als 300.000 kDa beim Helveticin J. Bacteriocine dieser Klasse zeigen ein sehr enges Wirkungsspektrum, das sich auf nahe verwandte Bakterien beschränkt. Besonders extrem ist dies beim Caseicin 80 und beim Enterocin S-48, die jeweils nur gegen Stämme der eigenen Spezies Aktivität zeigen [25].

Klasse III-Bacteriocine: Lipid- und/oder Kohlenhydratanteil essentiell für Aktivität

Zu dieser Klasse gehört das bereits 1967 von DeKlerk und Smit beschriebene Bacteriocin von *Lactobacillus fermentum*, das sowohl einen Lipid- als auch einen Zuckeranteil enthält [4]. Wie aus Tabelle 3 zu ersehen, wurden weitere Bacteriocine als Glyko- oder Glykolipoproteine beschrieben. In den meisten Fällen beruht diese Zuordnung allerdings nur auf der beobachteten Sensitivität gegenüber α -Amylase und lipolytischen Enzymen und wurde durch keine weiteren Untersuchungen bestätigt.

Bacteriocine wirken primär an der cytoplasmatischen Membran

Detaillierte Studien über den möglichen Wirkungsmechanismus von MSB-Bacteriocinen liegen bisher nur für das Nisin, Lactococcin A und B sowie Lactacin F vor. Am besten untersucht ist das Nisin. Bei der Behandlung von sensitiven Zellen mit Nisin und anderen Lantibiotika erfolgt ein rascher Austritt von Ionen, zum Beispiel K^+ , und kleinen Molekülen wie Aminosäuren oder ATP aus dem Cytoplasma, verbunden mit einem gleichzeitigen Abfall des Membranpotentials. Der durch Nisin induzierte Ionenefflux ist vom Energiezustand der Mem-

Bacteriocin	Produzent	Wirkungsspektrum	Charakteristika	
Klasse II	Caseicin 80	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. casei</i>	40 kDa, IEP = pH 4,5, Mitomycin C-induzierbar
	Helveticin J	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. delbrückii</i>	37 kDa, Mitomycin C-induz., chromosom. Determinanten
	Helveticin V-1829	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. delbrückii</i>	chromosomale Determinanten
	Enterocin S-48	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Ent. faecalis</i>	80 kDa-Protein, bakteriolytisch
Klasse III	Fermenticin	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>	hitzebeständiges Glykolipoprotein (56,7% Mannose)
	Lactocin 27	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. helveticus</i>	hitzebeständiges Glykoprotein, 12,4 kDa
	Plantaricin S	<i>Lb. plantarum</i>	MSB, <i>Micrococcus Propionibact.</i> , <i>Clostridium</i>	hitzebeständiges Glykoprotein, ca. 2,5 kDa
	Leucocin S	<i>Leuc. paramesenteroides</i>	MSB, <i>Listeria</i> , <i>Staph. aureus</i> , <i>Clostridium</i>	α -Amylase-sensitiv, hitzestabil, bakteriostatisch
	Carnocin 54	<i>Leuc. carnosum</i>	MSB, <i>Listeria</i>	α -Amylase-sensitiv, hitzestabil, ca. 4 kDa
	Pediocin SJ-1	<i>Ped. acidilactici</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Clostridium</i>	α -Amylase-sens., hitzestab., ca. 4 kDa, 4,6 mDa-Plasmid

Tabelle 3: MSB-Bacteriocine der Klassen II (hitzeempfindliche Bacteriocine mit Molekulargewicht > 30 kDa) und III (komplexe Bacteriocine)

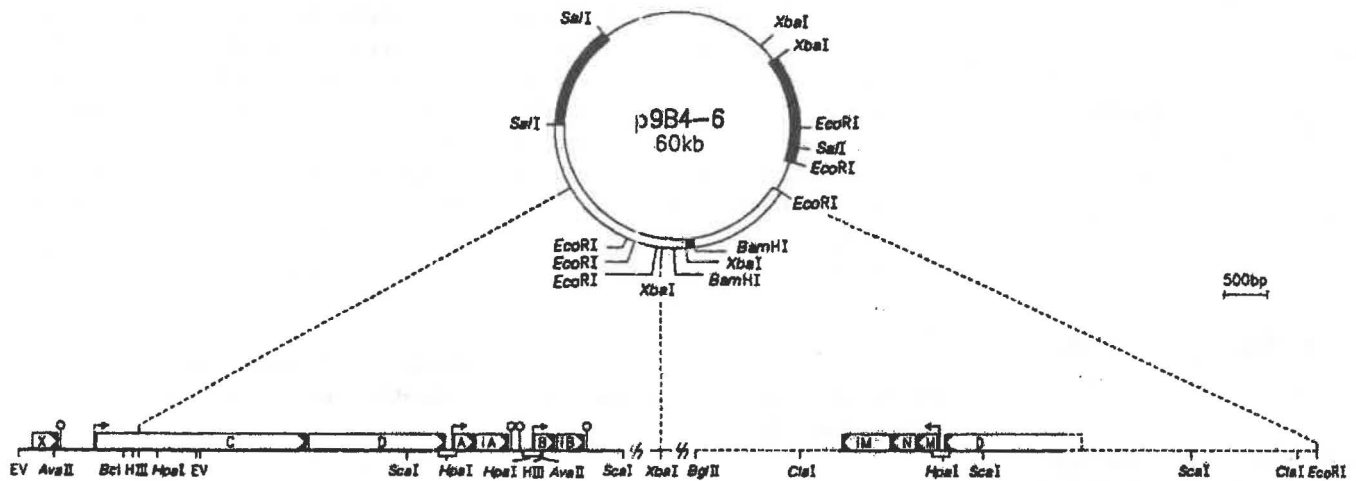


Abb. 3: Restriktionskarte des Plasmids p9B4-6 aus *L. lactis* 9B4. Das vergrößert gezeichnete DNA-Fragment zeigt die wahrscheinliche Anordnung der Lactococcin A-, B- und M-Operons, die aus den Einzeldaten der drei untersuchten Subspezies von *L. lactis* abgeleitet wurde. Die gestrichelte Linie gibt die Bereiche an, von denen keine Sequenzdaten bekannt sind. Die Transkription der Lactococcin-Operons erfolgt in Pfeilrichtung. Die zwei kleinen Rechtecke unterhalb der Basislinie entsprechen den im Text erwähnten identischen upstream-Bereichen. Die gebogenen Pfeile geben Transkriptionsstartpunkte wieder, während die offenen Kreise Terminationsregionen darstellen (nach [17]).

bran beziehungsweise der Zelle abhängig und offenbar die Folge der Bildung von Porenkanälen durch die cytoplasmatische Membran, die durch Zusammenlagerung von Nisinmolekülen entstanden sind. Dabei ist der hydrophobe Teil der amphiphilen Peptide dem Membraninneren zugewandt, während der hydrophile Teil die Innenseite des Kanals bildet. Die Fähigkeit zur Porenbildung hängt von der Zusammensetzung der Membranphospholipide und vom Membranpotential ab, was den Unterschied in der Empfindlichkeit verschiedener Bakterien erklären könnte.

Es gibt Hinweise auf einen zweiten Wirkungsmechanismus des Nisins, an dem die für Lantibiotika typischen Dehydroamino-säurereste wie Dehydroalanin und Dehydrobutyrin beteiligt sind. Durch Reaktion mit freien Sulfhydrylgruppen von Zellmembranproteinen kann das Auskeimen von *Bacillus*- oder *Clostridium*-Sporen gehemmt werden [21]. Durch die hydrophoben Eigenschaften des Nisinmoleküls kommt eine Wechselwirkung mit der Membran zustande, die zur Bildung von Porenkanälen und/oder zu Reaktionen mit freien Sulfhydrylgruppen führt. Möglicherweise machen solche kovalenten Wechselwirkungen das Vorhandensein eines spezifischen Membranrezeptors überflüssig und induzieren eine aktive Konformation des Nisins, die für die Einlagerung in die Membran erforderlich ist [16].

Im Gegensatz zu Nisin ist die Wirkung des nicht Lanthionin-haltigen Bacteriocins Lactococcin A unabhängig vom Energiezustand der Membran, das heißt von dem Vorhandensein einer protonenmotorischen Kraft. Interessanterweise kommt es bei sehr hohen Konzentrationen des Bacteriocins auch bei den ansonsten unempfindlichen Zellen des Lactococcin-Produzenten zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials („Immunity breakdown“). Der *Lactococcus*-Stamm weist demnach Immunität gegenüber dem von ihm gebildeten Bacteriocin nur bis zu einer bestimmten Konzentration auf. Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, daß ein membranassoziiertes Rezeptormolekül an der hohen Spezifität des Lactococcins A beteiligt ist [34]. Lactococcin B ist nur aktiv, wenn das Cystein in Position 24 nicht oxidiert ist. Der reduzierte Zustand von Cystein-24 ist möglicherweise für die Erkennung eines Membranrezeptors essentiell oder beeinflusst dessen Struktur derart, daß die Einlagerung der Bacteriocinmoleküle und die Porenbildung gefördert wird [36].

Auch das Zwei-Komponenten-Bacteriocin Lactacin F induziert bei Zellen von *Enterococcus faecalis* ATCC 19443 eine sofortige Freisetzung von K^+ , eine Depolarisierung der cytoplasmatischen Membran und die Hydrolyse des internen ATP. Ähnlich wie bei den Lactococcinen wird für die Porenbildung keine protonenmotorische Kraft benö-

tigt, und es wird eine Beteiligung von Rezeptoren an der sehr spezifischen Wirkung dieser Peptide angenommen [1].

Operonstrukturen der Bacteriocin-Gene: Acht Gene bilden das Nisingencluster

Während sich das Nisingencluster auf einem chromosomal integrierten 70 kb-Transposon (Tn5276) befindet [26], sind die Gene der nicht zu den Lantibiotika gehörenden Klasse I-Bacteriocine meist auf Plasmiden verschiedener Größe lokalisiert. Sie werden zum Teil von gemeinsamen Promotoren transkribiert. Für die Biosynthese des Nisins werden aufgrund des Gehaltes an ungewöhnlichen Aminosäuren neben den Genen, die für das Bacteriocin selbst, die Immunität, die Transportfunktion sowie regulatorische Funktionen kodieren, auch Gene für weitere modifizierende Enzyme benötigt. Insgesamt wurden acht Gene (*nisA*, *nisB*, *nisC*, *nisI*, *nisK*, *nisP*, *nisR*, *nisT*) identifiziert, die einen DNA-Bereich von rund 11 kb umfassen [8] (Abb. 2).

Die Sequenzierung des aus verschiedenen *L. lactis*-Stämmen isolierten Strukturgens für Prenisin, *nisA*, ergab nur Differenzen in den flankierenden DNA-Regionen. Vor *nisA* konnten keine promotorähnlichen Sequenzen nachgewiesen werden. Da upstream von *nisB* ebenfalls kein Promotor, downstream von *nisB* jedoch ein Terminator identifiziert werden konnte, wird davon aus-

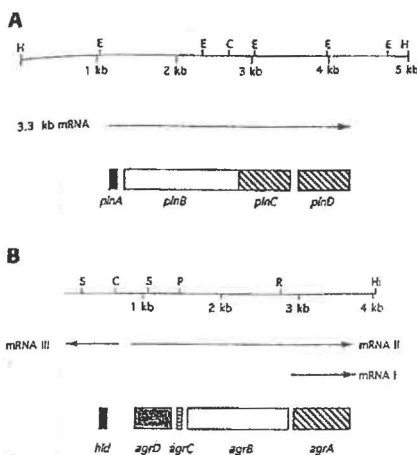


Abb. 4: Organisation des Plantaricin A-Operons (A) und des *agr*-Genclusters aus *Staphylococcus aureus* (B). Restriktionsstellen: C, Clal; E, EcoRI; H, HindIII; Hi, HincII; P, PstI; R, RsaI; S, SspI. Offene Leseraster: *plnA* und *hld* kodieren für die Vorläuferproteine von Plantaricin und δ -Lysin; *plnB* und *agrB* kodieren für Proteine, die zur Familie der Proteinkinasen gehören; *plnC*, D und *agrA* kodieren für sogenannte „Response Regulator“-Proteine, während die Genprodukte von *agrD* und *agrC* unbekannte Funktionen besitzen. Die Pfeile zeigen bekannte mRNA-Transkripte dieser Regionen an (nach [6]).

gegangen, daß beide Gene als polycistronische mRNA transkribiert werden [30]. Aufgrund von Strukturanalysen wird angenommen, daß NisB ein membranassoziiertes Protein ist, das bei der enzymatischen Modifikation von Nisin eine Rolle spielt. NisT kann für ein Protein von 600 Aminosäuren mit einem angenommenen Molekulargewicht von 69 kDa kodieren. Downstream von *nisT* liegt ein weiterer ORF (*nisC*), der teilweise mit *nisT* überlappt. Er besitzt eine Kodierungskapazität für ein Protein von 414 Aminosäuren mit einem angenommenen Molekulargewicht von 47,3 kDa. Die Genprodukte von *nisI* und *nisC* könnten bei der Reifung der Lantibiotika eine Rolle spielen.

Auf der 3'-Seite von *nisC* befinden sich noch vier weitere offene Leseraster [8, 19, 35]: NisI ist ein Lipoprotein und determiniert die Immunität gegen Nisin. Der Mechanismus der Immunität ist noch unklar, da aber NisI mit seinen Lipoproteinanteilen an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert ist, könnte die Immunität durch direkte Wechselwirkung mit dem Nisinmolekül hervorgerufen werden, möglicherweise durch Verhinderung der Nisinaggregatbildung [8]. Der Transkriptionsstart von *nisP* überlappt mit dem 3'-Ende von *nisI*. Das Gen kodiert für ein potentielles Protein von

682 Aminosäuren. Die deduzierte Aminosäuresequenz besitzt eine N-terminale Signalsequenz und zeigt weiterhin Homologie zu Proteasen des Subtilisin-Typs. Die Protease wird wahrscheinlich zur Abspaltung des Leaderpeptids während der Reifung des Nisins benötigt. Die angenommenen Genprodukte von *nisR* und *nisK* besitzen große Homologien zu Proteinen von Zweikomponenten-Signaltransduktionssystemen. NisK ähnelt dabei den in diesen Regulationssystemen vorkommenden Histidinkinasen.

Drei Lactococcinen kodieren die Lactococcine A, B und M

Die Operons der Lactococcine aus *L. lactis* wurden parallel in verschiedenen Subspezies dieser Art charakterisiert; sie befinden sich jeweils gemeinsam auf dem gleichen Plasmid (Abb. 3). Die Operons der Lactococcine A und B bestehen jeweils aus dem Bacteriocinstrukturgen (*lcnA* bzw. *lcnB*) und dem Immunitätsgen (*lciA* bzw. *lciB*), während das Operon von Lactococcin M ein weiteres offenes Leseraster (*lcnN*) besitzt. Sowohl *lcnM* als auch *lcnN* sind für die Akti-

Leseraster gefunden [32]: *LcnD* kodiert für ein potentielles Protein von 52,5 kDa, und *lcnC* besitzt eine Kodierungskapazität für ein Protein von 78,8 kDa. Beide Gene gehören zum *lcnA*-Operon. Das bedeutet, daß nach der Transkription neben der mRNA, die die Gene *lcnA* und *lciA* trägt und deren Startpunkt unmittelbar upstream von *lcnA* liegt, eine polycistronische mRNA mit den Genen *lcnC*, D, A und B gebildet wird. *LcnD*-homologe Sequenzen wurden auch upstream von *lcnM* gefunden.

Ein Signalpeptid-unabhängiges Transportsystem exkretiert die Lactococcine

Da Mutanten mit einem Defekt in *lcnC* bzw. *lcnD* Bacteriocin-negativ sind, werden beide Gene für die Bacteriocinaktivität benötigt. Die potentiellen Aminosäuresequenzen von *lcnC* und D zeigen Ähnlichkeit mit Proteinen, die an der Signalpeptid-unabhängigen Exkretion bestimmter Proteine beteiligt sind, wie zum Beispiel Hämölysin und Colicin E aus *E. coli*. Für diesen Sekretionsmechanismus wird ein ATP-abhängiger Membrantranslokator benötigt, der mit seinem hydrophoben N-Terminus an die

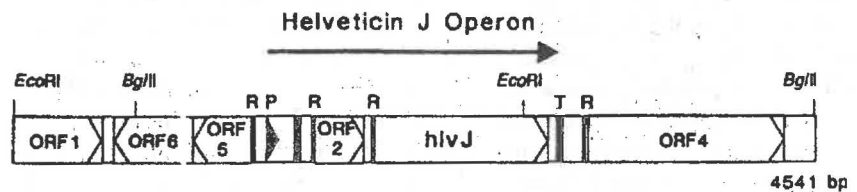


Abb. 5: Organisation des Helveticin J-Operons von *Lactobacillus helveticus* 481. P, Promotor; T, rho-unabhängiger Terminator; R, ribosomale Bindungsstelle. Einige Restriktionsschnittstellen sind angegeben (nach [16]).

vität von Lactococcin M erforderlich. *LciM* kodiert für das Immunitätsprotein.

Die 5'-Sequenzen aller drei Operons, einschließlich der Promotor- und Signalsequenzen, sind bis zur universellen GG-Prozessierungsstelle nahezu identisch. Ungeachtet des identischen 5'-Promotorbereiches zeigten Primer-Extension-Analysen jedoch, daß sich die Startpunkte der mRNAs des *lcnA*-Operons und des *lcnM*-Operons um zwei Kilobasen unterscheiden [33]. Die Sequenzbereiche downstream von der Leaderpeptid-Prozessierungsstelle, das heißt die Strukturgene der Lactococcine A, B und M sind unterschiedlich. Upstream des *lcnA*-Operons wurden noch zwei weitere offene

Membran gebunden ist und mit dem Großteil des Moleküls in das Cytoplasma hineinragt. Außerdem ist für diese Proteine eine C-terminale Konsensussequenz charakteristisch, die ATP binden kann. Diese Konsensussequenz wurde auch bei *LcnC* gefunden.

Assoziation der Strukturgene von Plantaricin A und Sakacin A mit Proteingenen, die zu Zweikomponenten-Signaltransduktionssystemen homolog sind

Für die Expression von Plantaricin A aus *Lactobacillus plantarum* C11 wird ein Transkript gebildet, das neben dem Strukturgen für Plantaricin (*plnA*) die Gene *plnB*, C und

D enthält (Abb. 4, oben). Die möglichen Genprodukte von *plnB*, C und D zeigen Ähnlichkeiten zu Proteinen, die im „Accessory Gene Regulatory System“ (*agr*) aus *Staphylococcus aureus* vorkommen (Abb. 4, unten). Das *agr*-Operon reguliert die Synthese verschiedener extrazellulärer Proteine, von denen viele eine Rolle in der Pathogenese von Staphylokokkeninfektionen spielen [9]. *PlnB* stimmt zu 25 % mit *agrB* überein, und *PlnC* und D sind untereinander sehr ähnlich und zu 33% mit *agrA* identisch. Plantaricin zeigt außerdem Gemeinsamkeiten mit einem zum Gencluster des *agr*-Systems gehörenden Peptid (δ -Lysin), das bei Aktivierung des *agr*-Systems verstärkt transkribiert wird. Es handelt sich bei beiden um kleine kationische Peptide von 22 beziehungsweise 26 Aminosäuren, die offenbar ohne Mitwirkung eines typischen Signalpeptids exkretiert werden. Es wird außerdem angenommen, daß beide Toxine Poren in Membranen bilden können.

Bei dem Sakacin A-produzierenden Stamm *Lactobacillus sake* Lb 706 wurde durch Komplementationsversuche mit Sakacin-

Minusmutanten ein Gen identifiziert (*sakB*), das neben dem Sakacinstrukturgen (*sakA*) für die Bacteriocinbildung von Bedeutung ist [3]. Die deduzierte Aminosäuresequenz des SakB-Proteins zeigt eine große Ähnlichkeit mit jener des AgrB-Protein: Es besitzt ebenfalls an Position 240 einen Histidinrest, der wahrscheinlich als Phosphorylierungsstelle dient. Außerdem sind beide Gene innerhalb einer 12 bp-Sequenz fast 100 %ig identisch.

Helveticin J von *Lactobacillus helveticus* ist chromosomal kodiert

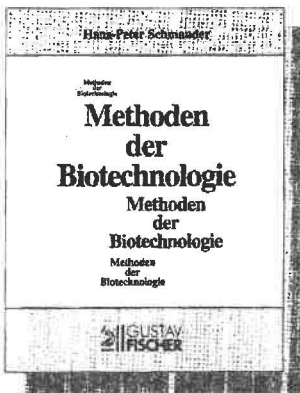
Helveticin J ist das einzige Bacteriocin der Klasse II, dessen Strukturgen einschließlich der angrenzenden DNA-Bereiche näher analysiert wurde [14] (Abb. 5). Innerhalb des sequenzierten Bereiches liegen sechs offene Leseraster. Unmittelbar upstream vom Strukturgen (*hkJ*) befindet sich ein weiteres offenes Leseraster (ORF 2). Upstream von diesem liegt eine promotorähnliche Sequenz, während downstream vom *hkJ*-Gen ein rho-unabhängiger Terminator lokal-

isiert ist. Diese Befunde, wie auch Northern Blot-Analysen weisen darauf hin, daß beide Gene auf einer Transkriptionseinheit abgelesen werden. Die Funktionen der möglichen Genprodukte der andern offenen Leseraster sind nicht bekannt.

Ausblick

Die Bacteriocinforschung hat in den letzten Jahren zweifelsohne erhebliche Fortschritte gemacht. Es gelang, sowohl die Struktur vieler MSB-Bacteriocine als auch die Organisation der verantwortlichen Gene aufzuklären. Durch das relativ enge Wirkungsspektrum sind der praktischen Anwendung in der Lebensmittelkonservierung noch Grenzen gesetzt. Die Suche nach Substanzen mit einer größeren Wirkungsbreite wird daher weiterhin von Bedeutung sein. MSB-Bacteriocine mit einer Aktivität auch gegen Gram-negative Bakterien wie Salmonellen oder *Campylobacter* wären für den Einsatz zur besseren Absicherung verschiedener Lebensmittel wünschenswert, sind bisher jedoch noch nicht bekannt.

BUCH TIP



Methoden der Biotechnologie

Herausgegeben von Prof. Dr. Hans -Peter SCHMAUDER, Jena.
Bearbeitet von 16 Fachwissenschaftlern.

1994. 291 S., 53 Abb., 32 Tab., kt. DM 78,- ISBN 3-334-60836-0

Inhalt: Einleitung · Naturwissenschaftliche Grundmethoden der Biotechnologie · Bioreaktionstechnik · Aufarbeitungstechniken · Spezialtechniken · Statistische Versuchsplanung, Versuchsauswertung und Modellübertragung (Scale-up) · Sachregister

Bei dem Aufstieg und den Fortschritten der Biotechnologie in den letzten Jahrzehnten ist es unerlässlich, fachübergreifende Aus- und Weiterbildungsprogramme anzubieten, wobei das interdisziplinäre Arbeitsgebiet eine enge Kooperation zwischen Naturwissenschaftlern und Ingenieuren voraussetzt. Daraus erwuchs die Notwendigkeit, ein Methodenbuch zu entwickeln, das Basisverfahren und Experimente aus wichtigen Bereichen der Biotechnologie für das praktische Training im Studium und in der postgradualen Fortbildung nach einheitlichem Versuchsaufbau präsentiert. Nach Darstellung der naturwissenschaftlichen Grundmethoden (Analysemethoden, Stammisolierung, mikrobielle Gentechnik) wird auf die Bioreaktionstechnik und verschiedene Aufbereitungsverfahren eingegangen. An Spezialtechniken werden u.a. mikrobielle Sensoren sowie tierische und pflanzliche Zell- und Gewebekulturen vorgestellt. Abgerundet wird die Darstellung durch ein Kapitel über statistische Versuchsplanung, Versuchsauswertung und Modellübertragung.

Ein besseres Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehungen sollte die Entwicklung von maßgeschneiderten Bacteriocinen ermöglichen, die nicht nur eine höhere Aktivität und ein breiteres Wirkungsspektrum aufweisen, sondern sich auch durch bessere Löslichkeit und größere Stabilität auszeichnen. Methoden des Proteinengineering wurden bereits bei Nisin angewendet. Mit Hilfe der synthetisch hergestellten Analoga zu Nisin A und Z konnte die Bedeutung einzelner Aminosäurereste für die Aktivität des Moleküls erkannt werden. So sind zum Beispiel die Dehydroalaninreste in Position 2 und 5 für die antibakterielle Aktivität essentiell, während das Dehydroalanin in Position 33 dafür nicht benötigt wird [37]. Die Fortschritte in der Molekularbiologie von Milchsäurebakterien ermöglichen die Anwendung von gentechnischen Methoden, um beispielsweise die Bacteriocinproduktion einzelner Stämme zu erhöhen. Durch Einführung des Bacteriocingens auf einen „high copy number“-Vektor unter die Kontrolle eines effektiven Promotors kann Überproduktion des Bacteriocins erreicht werden, wie es für Nisin gezeigt wurde [18]. Eine andere Strategie ist die Übertragung der Fähigkeit zur Bacteriocinbildung auf Stämme mit wertvollen technologischen Eigenschaften, die bereits erfolgreich als Starterkulturen zum Beispiel in der Milchindustrie eingesetzt werden. Ob gentechnisch veränderte Stämme in Lebensmitteln Akzeptanz finden werden, erscheint zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings sehr fraglich. Der Einsatz natürlicher bacteriocinogener Milchsäurebakterien als Schutzkulturen in Lebensmitteln erscheint realistischer.

Literatur

- [1] Abee, T., Klaenhammer, T. R., Letellier, L. (1994): Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms pore complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1006-1013
- [2] Allison, G. E., Fremaux, C., Klaenhammer, T. R. (1994): Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176: 2235-2241
- [3] Axelsson, L., Holck, A., Birkeland, S., Aukrust, T., Blom, H. (1993): Cloning and nucleotide sequence of a gene from *Lactobacillus sake* Lb706 necessary for sakacin A production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2868-2875
- [4] Dekker, H. C., Smit, J. A. (1967): Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. *J. Gen. Microbiol.* 48: 309-316
- [5] De Vuyst, L., Vandamme, E. J. (eds.) (1994): Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Blackie Academic and Professional, London*
- [6] Diep, D. B., Havarstein, L. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F. (1994): The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 160-166
- [7] Dodd, H. M., Gasson, M. J. (1993): Bacteriocins of lactic acid bacteria. p. 211-251. In: Gasson, M. J. and de Vos, W. M. (eds.) *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic and Professional, London*
- [8] Engelke, G., Gutkowská-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelman, M., Entian, K.-D. (1994): Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 814-825
- [9] Gross, R. (1992): Umweltbedingte Regulation bakterieller Pathogenität - ein Überblick. *BioEngineering* 8 (5-6): 69-76
- [10] Hechard, Y., Derijar, B., Letellier, F., Cernaïmpo, Y. (1992): Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2725-2731
- [11] Hoover, D. G., Steensen, L. R. (eds.): Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Academic Press, New York*
- [12] Hurst, A. (1981): Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27: 85-123
- [13] Jung, G., Sahl, H.-G. (eds.): Nisin and novel lantibiotics. *ESCOM, Leiden*
- [14] Joerger, M. C., Klaenhammer, T. R. (1990): Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 4:1 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *Bacteriol.* 171: 6339-6347
- [15] Klaenhammer, T. R. (1988): Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimik* 70: 337-349
- [16] Klaenhammer, T. R. (1993): Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86
- [17] Kok, J., Holo, H., van Belkum, M. J., Haandrikman, A. J., Nes, I. F. (1993): Nonnisin bacteriocins in *Lactococci*: Biochemistry, genetics, and mode of action, pp. 121-150. In: Hoover, D. G. and Steenson, L. R. (eds.) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic Press, New York*
- [18] Kuipers, O. P., Yap, V. M. G. J., Rollema, H. S., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., de Vos, W. M. (1991): Expression of wild type and mutant nisin genes in *Lactococcus lactis*. p. 250-260. In: Jung, G. and Sahl, H.-G. (eds.) *Nisin and novel lantibiotics. ESCOM, Leiden*
- [19] Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., de Vos, W. M. (1993): Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIF* of *Lactococcus lactis*: requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for immunity. *Eur. J. Biochem.* 216: 281-291
- [20] Larsen, A. G., Vogen, F. K., Josephsen, J. (1993): Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour dough: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M140. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 113-122
- [21] Morris, S. L., Walsh, L. C., Hansen, J. N. (1984): Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *J. Biochem. Chem.* 259: 13590-13594
- [22] Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J., de Vos, W. M. (1991): Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* 201: 581-584
- [23] Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L. S., Sletten, K., Nes, I. F. (1993): A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 5686-5692
- [24] Nissen-Meyer, J., Larsen, A. G., Sletten, K., Daeschel, M., Nes, I. F. (1993): Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1973-1978
- [25] Rammelsberg, M., Müller, E., Radler, F. (1990): Caseicin 80 - purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Arch. Microbiol.* 154: 249-252
- [26] Rauch, P. J. G., de Vos, W. M. (1992): Characterisation of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion into *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 174: 1280-1287
- [27] Schillinger, U. (1990): Bacteriocins of lactic acid bacteria. p. 55-74. In: Bills, D. D. and Kung, S.-D. (eds.) *Biotechnology and Food Safety. Butterworth-Heinemann, Boston*
- [28] Schillinger, U., Lücke, F.-K. (1989): Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 349-353
- [29] Schillinger, U., Kaya, M., Lücke, F.-K. (1991): Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 473-478
- [30] Steen, M., Chung, Y. J., Hansen, J. N. (1991): Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1181-1188
- [31] Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A., Klaenhammer, T. R. (1991): Nisin treatment for the inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3613-3615
- [32] Stoddard, G. W., Petzel, J. P., van Belkum, M. J., Kok, J., McKay, L. L. (1992): Molecular analysis of the lactococcal A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1952-1961
- [33] Van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Jeeninga, R. E., Kok, J., Venema, G. (1991a): Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 492-498
- [34] Van Belkum, M. J., Kuipers, O. P., de Vos, W. M., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N., Abee, T. (1991b): The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.* 173: 7934-7941
- [35] Van der Meer, J. R., Polman, J., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. P., de Vos, W. M. (1993): Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serin protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 2578-2588
- [36] Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A. J., Lenhouts, K. J., Kok, J., Konings, W. N., Venema, G. (1993): Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1041-1048
- [37] Wakamiya, T., Fukase, K., Sano, A., Shimbo, K., Kitazawa, M., Horimoto, S., Fujita, H., Kubo, A., Maeshiro, Y., Shiba, T. (1991): Studies on chemical synthesis of the lantionine peptide nisin. p. 189-203. In: Jung, G. and Sahl, H.-G. (eds.) *Nisin and novel lantibiotics. ESCOM, Leiden*



Ulrich Schillinger

Korrespondenzadresse

Dr. Ulrich Schillinger, Dr. Rolf Geisen
Prof. Dr. Wilhelm H. Holzäpfel
Institut für Hygiene und Toxikologie
Bundesforschungsanstalt für Ernährung
Engesser Straße 20
D-76131 Karlsruhe