

Le batteriocine sono molecole peptidiche di sintesi ribosomale che possono anche essere associate a lipidi o carboidrati. Sebbene, alcune batteriocine prodotte da batteri Gram-positivi (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) possiedono spettri di inibizione limitati ad alcuni ceppi appartenenti alla stessa specie del microrganismo produttore, la maggior parte di esse mostra un ampio spettro d'azione contro diverse specie batteriche sia Gram-positive che Gram-negative. L'attuale classificazione delle batteriocine si basa sia sulla loro natura chimica sia sul loro spettro d'azione; sulla base di queste caratteristiche sono attualmente state individuate **quattro classi**:

I

LANTIBIOTICI

Sono peptidi, attivi sulle membrane cellulari, contenenti amminoacidi **non tradizionali** come **lantionina** e **b-metil lantionina** oltre a residui deidratati. Appartengono a questa classe di batteriocine la **NISINA**, la **lattacina 481**, la **lattococcina S** e la **carnocina U149**.

II

Sono peptidi di piccole dimensioni (< 10 kDa), stabili a modesti trattamenti termici, che non contengono aa modificati. Queste batteriocine sono caratterizzate dalla presenza del motivo **Gly-Gly** (-1**⁺¹) **Xaa**, bersaglio del processamento post-traduzionale della pre-batteriocina. Appartengono a questa classe di batteriocine la **PEDIOCINA Ach/PA-1**, la **lattococcina A, B, M**, la **Leucocina A**, la **sakacina A, P** la **curvacina A**.

IIa

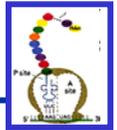
Attive contro **Listeria** caratterizzate dal motivo **YGNGV** nella regione N-terminale (**pediocin-like bacteriocins**)

IIb

Attività battericida dovuta all'azione di due peptidi, **lattococcina G, M** e **lattacina F**

IIc

Necessitano di residui ridotti di **Cys** per la loro attività, **lattococcina B**



III

Sono proteine **termosensibili** di dimensioni > 30 kDa. Appartengono a questa classe di batteriocine l'**helveticina J**, l'**helveticina V-1829**, l'**acidofilina A**, l'**lattacina A** e **B**.

IV

Sono proteine **complesse** associate a porzioni lipidiche o carboidratiche indispensabili per la loro attività. Appartengono a questa classe di batteriocine la **plantaricina S**, **leucocina S**, **lattacina 27** e **pediocina SJ-1**.

NISINA

Il termine **NISINA** deriva dalla vecchia nomenclatura tassonomica dei batteri in cui sono state individuate. Questi batteri, appartenenti oggi al genere **Lactococcus** era un tempo classificati come **Streptococcus** appartenenti al sierotipo **N**, da cui **NISINA** sta per "Group **N** Inhibitory Substance" dove il suffisso "**INA**" era quello comunemente utilizzato per gli antibiotici (all'epoca, 1928-44, il termine batteriocina non era stato ancora coniato). **Le NISINE** sono dei **Lantibiotici** prodotte da **Lactococcus lactis** subsp. **lactis** e **cremoris**.

La **BIOSINTESI** è suddivisa in tre steps:

1

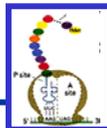
Modificazioni intracellulari post-traduzionali di alcuni **aa** della molecola peptidica (deidratazioni, formazioni di tioesteri e addizione di gruppi sulfidrilici)

2

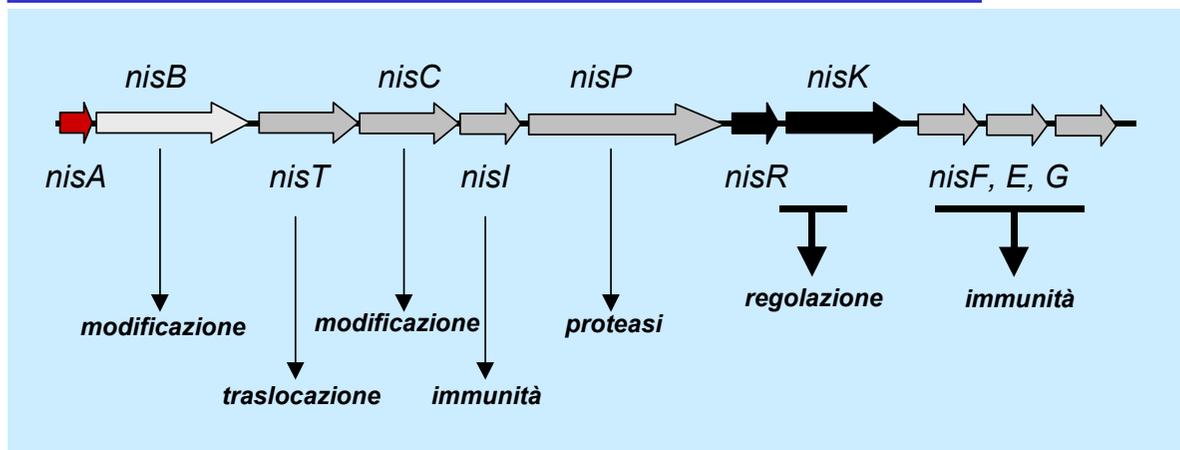
Trasporto del peptide attraverso la membrana citoplasmatica.

3

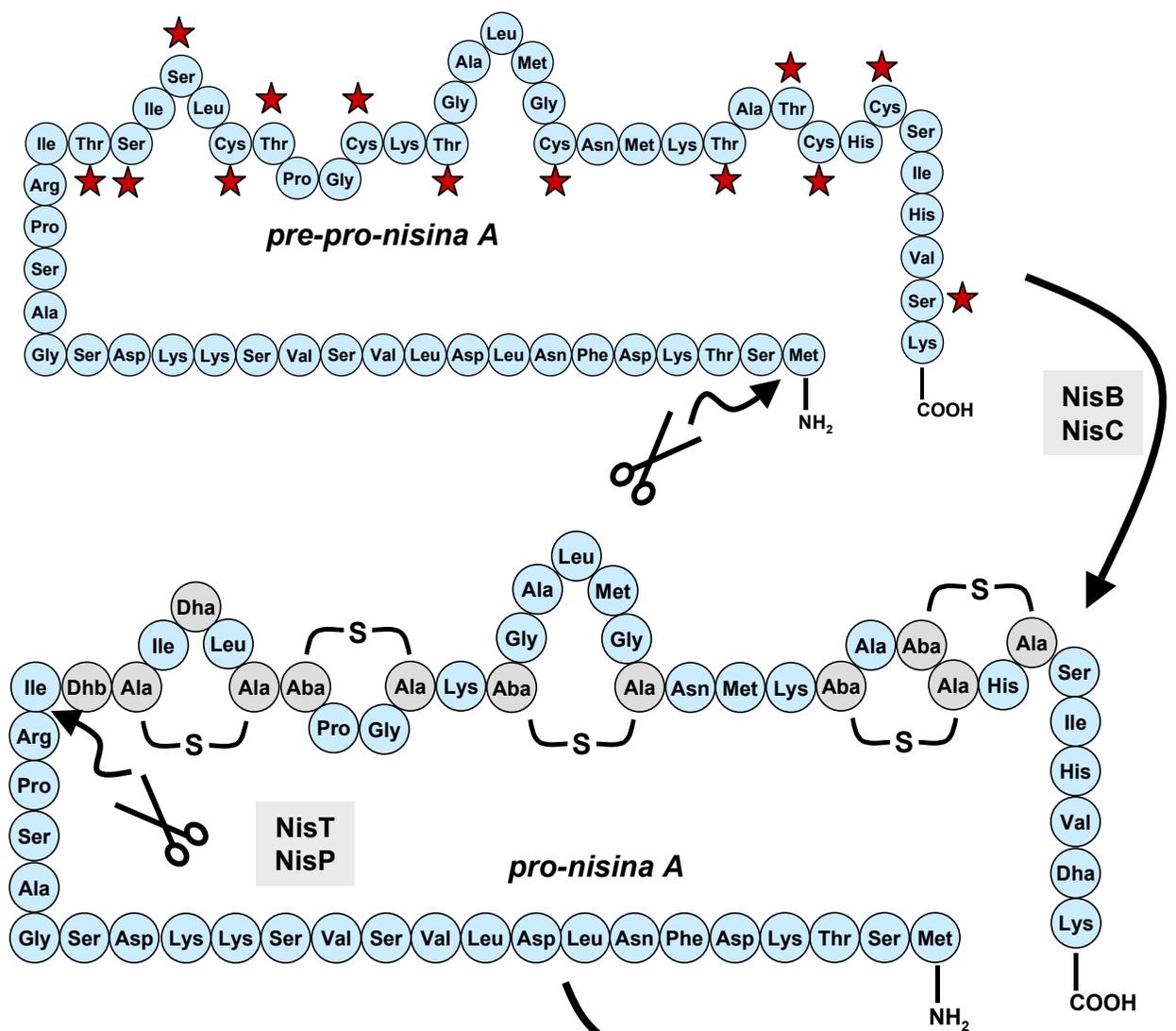
Azione proteolitica (attivazione) a carico della pre-nisina e asporto del peptide leader.

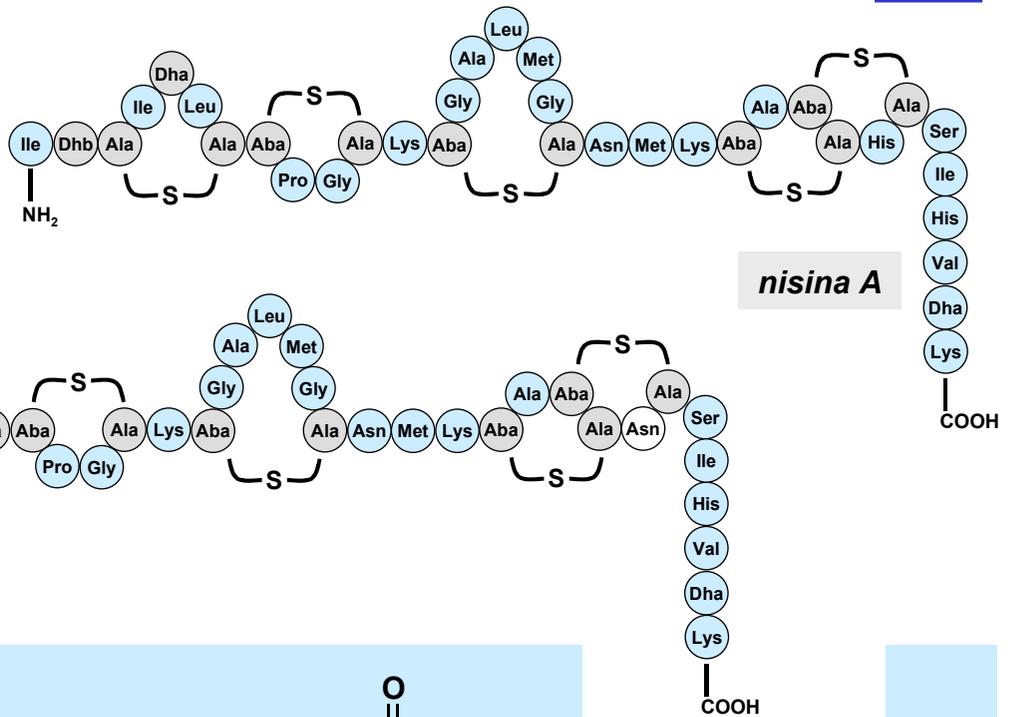
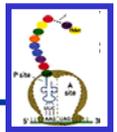


Organizzazione genica del cluster deputato alla sintesi di NISINA A



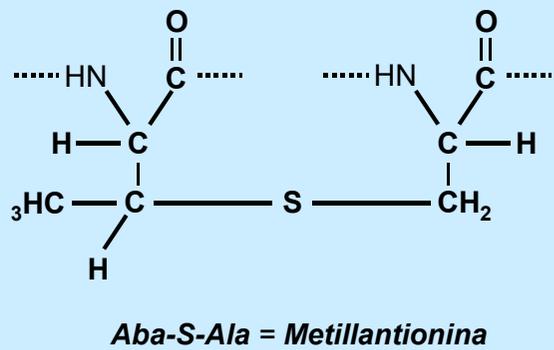
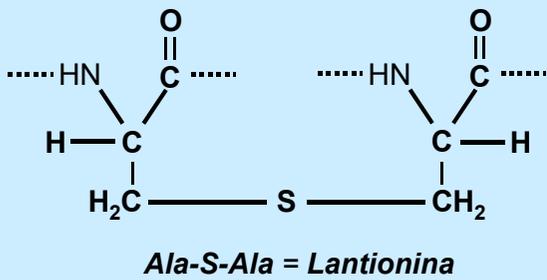
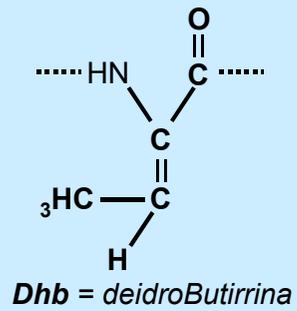
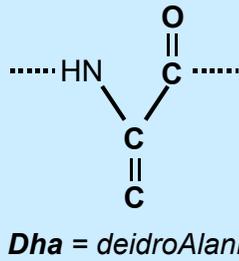
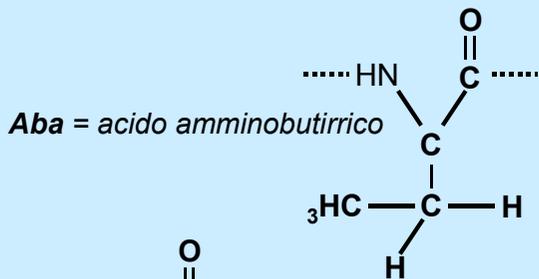
Modificazioni post-traduzionali della NISINA A

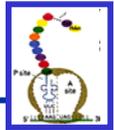




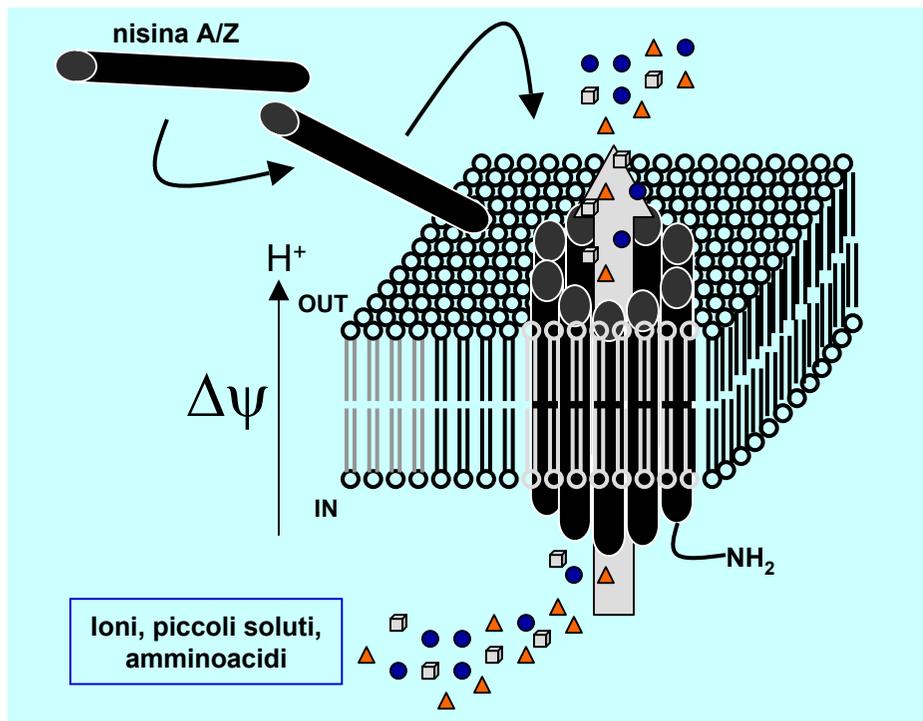
nisina Z

nisina A





Le nisine agiscono a livello della doppia membrana fosfolipidica cellulare organizzandosi in strutture complesse che alterano l'equilibrio osmotico e il potenziale di membrana della cellula.

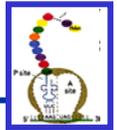


l'inserzione della nisina non avviene in regione specifiche della membrana cellulare

Le NISINE sono attive nei confronti di altri batteri lattici e soprattutto nei confronti di diverse specie di Clostridium (*C. botulinum*, *C. butyricum*) e anche di *Listeria*. Alcuni ceppi di clostridi possono essere resistenti alle nisine perché producono proteasi in grado di inattivare la molecola peptidica.

Tra le specie di interesse alimentare sensibili alle nisine ci sono:

- Alycyclobacillus acidoterrestris***
- Bacillus brevis***
- Bacillus cereus***
- Bacillus coagulans***
- Bacillus licheniformis***
- Enterococcus faecalis* e *faecium***
- Lactobacillus brevis***
- Lactobacillus casei***
- Lactobacillus plantarum***
- Lactobacillus helveticus***
- Lactobacillus lactis***
- Leuconostoc mesenteroides***
- Oenococcus oeni***
- Pediococcus***
- Micrococcus***
- Staphylococcus aureus***

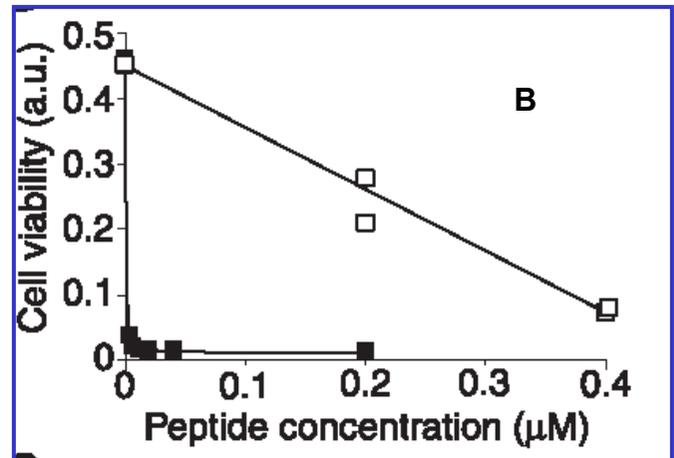


Use of the Cell Wall Precursor Lipid II by a Pore-Forming Peptide Antibiotic

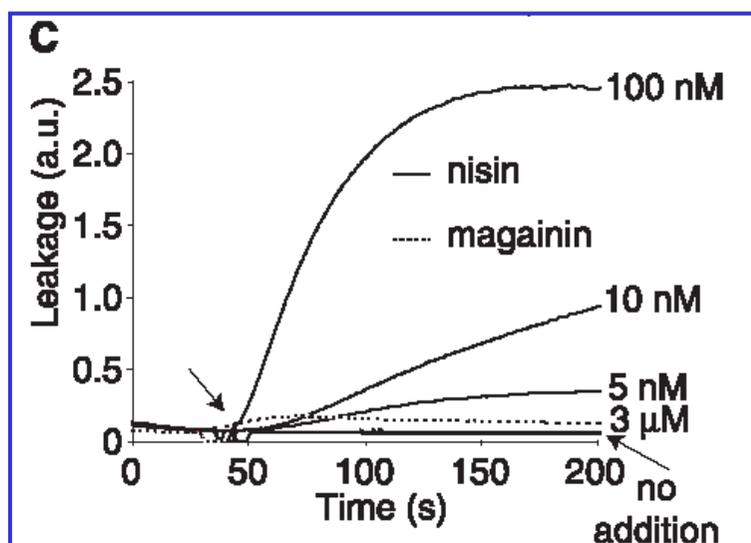
E. Breukink,^{1*} I. Wiedemann,² C. van Kraaij,³ O. P. Kuipers,⁴
H.-G. Sahl,² B. de Kruijff¹

Resistance to antibiotics is increasing in some groups of clinically important pathogens. For instance, high vancomycin resistance has emerged in enterococci. Promising alternative antibiotics are the peptide antibiotics, abundant in host defense systems, which kill their targets by permeabilizing the plasma membrane. These peptides generally do not act via specific receptors and are active in the micromolar range. Here it is shown that vancomycin and the antibacterial peptide nisin Z use the same target: the membrane-anchored cell wall precursor Lipid II. Nisin combines high affinity for Lipid II with its pore-forming ability, thus causing the peptide to be highly active (in the nanomolar range).

Activity of nisin and magainin in a cell viability assay. Nisin (closed squares) and magainin (open squares) were added at the specific concentrations to *M. flavus* cells in complex growth medium (18), and viability was determined by measuring the absorbance at 600 nm as described (19). (C) Activity of nisin and magainin toward intact *M. flavus* cells. The peptide activity was measured by monitoring the effect on the membrane potential with the fluorescent membrane potential-sensitive probe 3,3'-diethylthiocarbocyanine iodide [DiS-C₂(5)] (20). Cells were grown until mid-log phase, harvested, and washed once with a buffer solution of 250 mM sucrose, 5 mM MgSO₄, and 10 mM potassium phosphate (pH 7.0), then resuspended in the same buffer. Cells were added to the fluorescence cuvette at an optical density at 600 nm of 0.075 together with DiS-C₂(5) at 1 μM.



www.sciencemag.org SCIENCE VOL 286 17 DECEMBER 1999



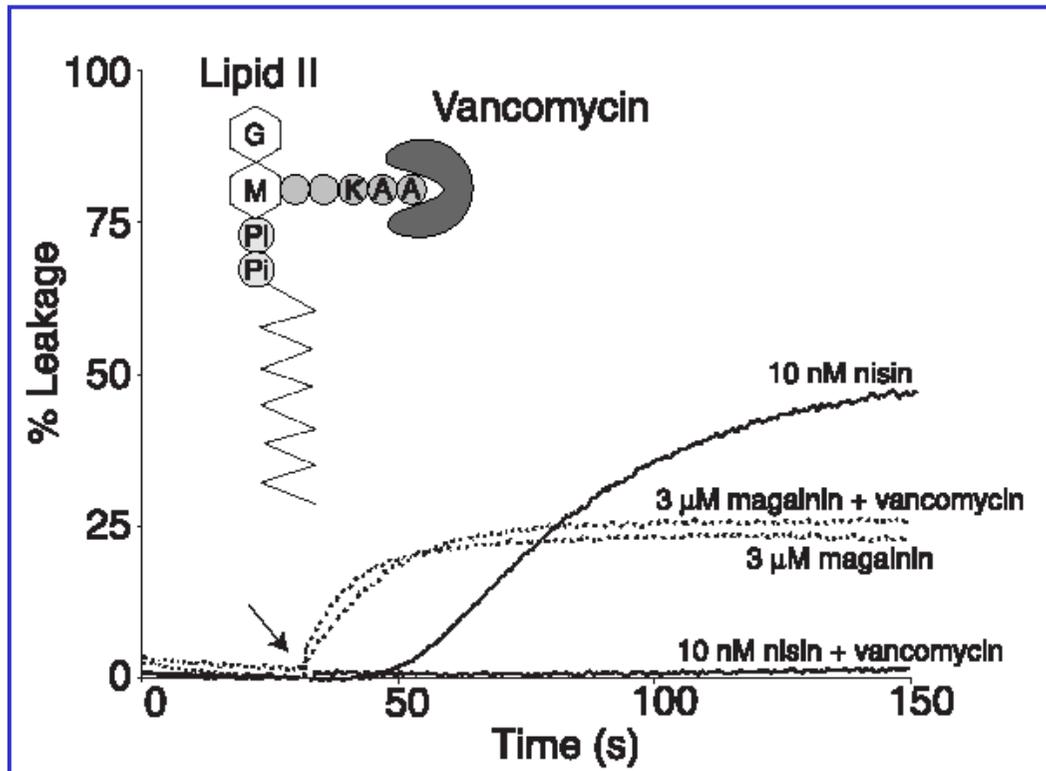
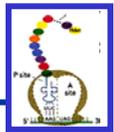


Fig. 2. Vancomycin blocks the activity of nisin against *M. flavus* cells. The activity of the peptides was monitored as described for Fig. 1. When present, vancomycin was added 2 min before the addition of nisin or magainin. Washing the cells after treatment with vancomycin gave similar results. The arrow marks the time point of peptide addition. Inset: Schematic structure of Lipid II with vancomycin bound to the COOH-terminal Lys-D-Ala-D-Ala sequence. The structure consists of a membrane-incorporated undecaprenyl moiety to which the amino sugar MurNAc is attached via a pyrophosphate. To the MurNAc (M) a pentapeptide is attached, of which the composition may slightly differ within different bacterial genera. The final subunit of Lipid II is GlcNAc (G). Pi, phosphate.

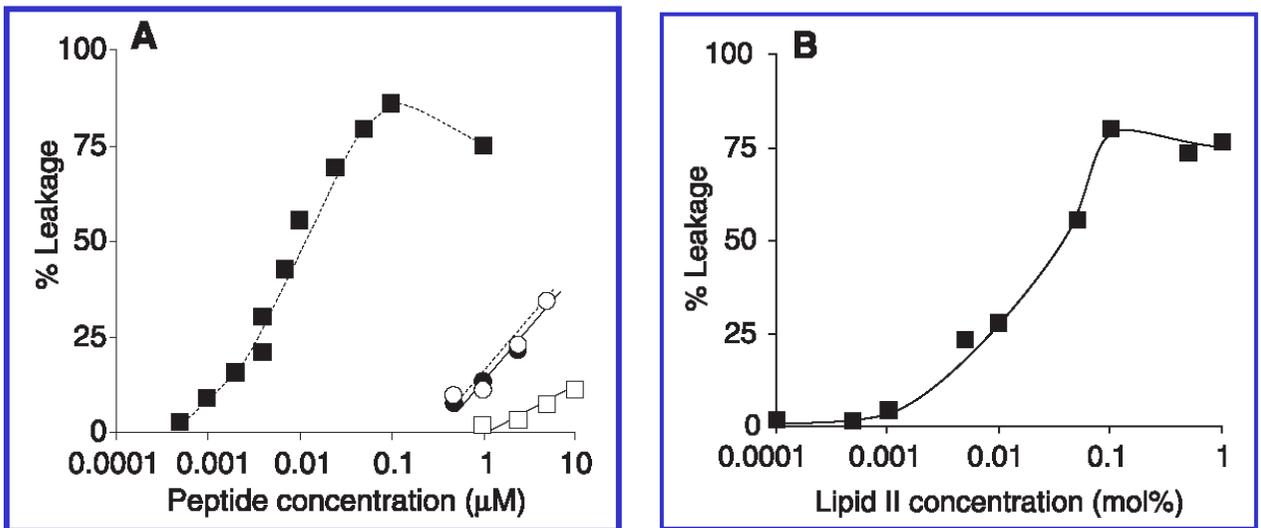
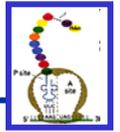
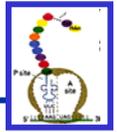
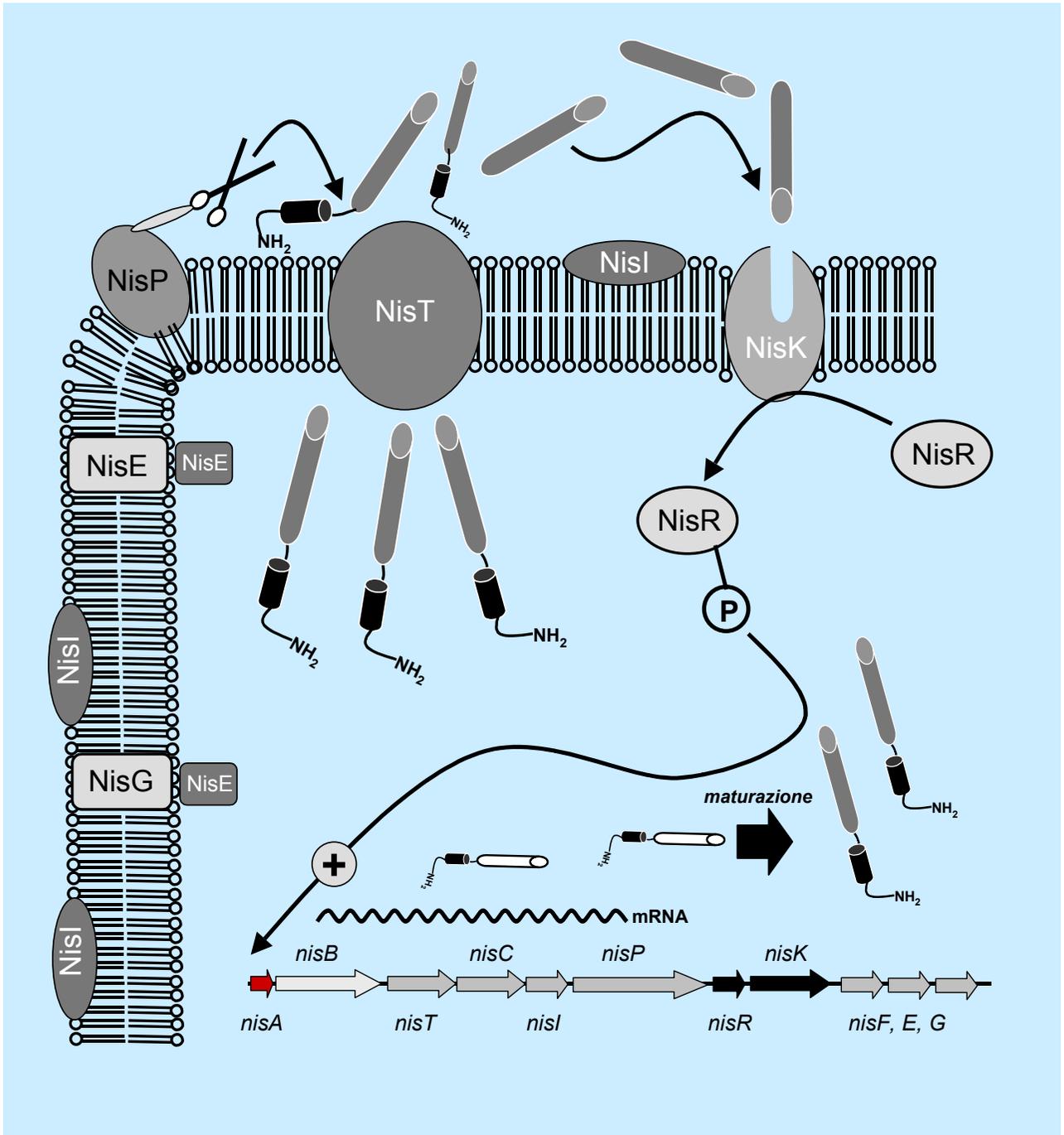
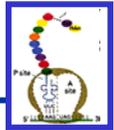


Fig. 4. (A) The presence of Lipid II in model membrane systems markedly increases the nisin activity. The activity of nisin (squares) and magainin (circles) was measured by monitoring the leakage of carboxyfluorescein from model membranes composed of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine in the presence (filled symbols) or absence (open symbols) of 0.065 mol % purified Lipid II. **(B)** Nisin activity is dependent on the concentration of Lipid II in the membrane. The activity of nisin (100 nM) was measured as described for (A).



La NISINA induce la sua biosintesi





La NISINA, applicazioni in ambito alimentare

La NISINA può essere addizionata agli alimenti in quantità variabili da 10 - 750 mg/Kg di prodotto commerciale che equivalgono a 0.25 - 18.7 μg nisina/g. La nisina viene generalmente addizionata ad alimenti acidi anche se esplica la sua attività a pH variabili da 3.5 a 8. In alcuni casi la nisina è stata addizionata anche nella formulazione di film siliconici, di PVC e in film biodegradabili derivati dal mais. Di seguito vengono elencati alcuni alimenti dove può essere prevista l'addizione di nisina:

Cibi in scatola

Formaggi

Formaggi fusi o trattati

Dessert pastorizzati preparati con latte

Ricotta

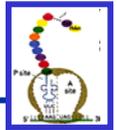
Prodotti derivati del latte

Preparazioni liquide a base di uovo

Nella preparazione della fermentazione della birra

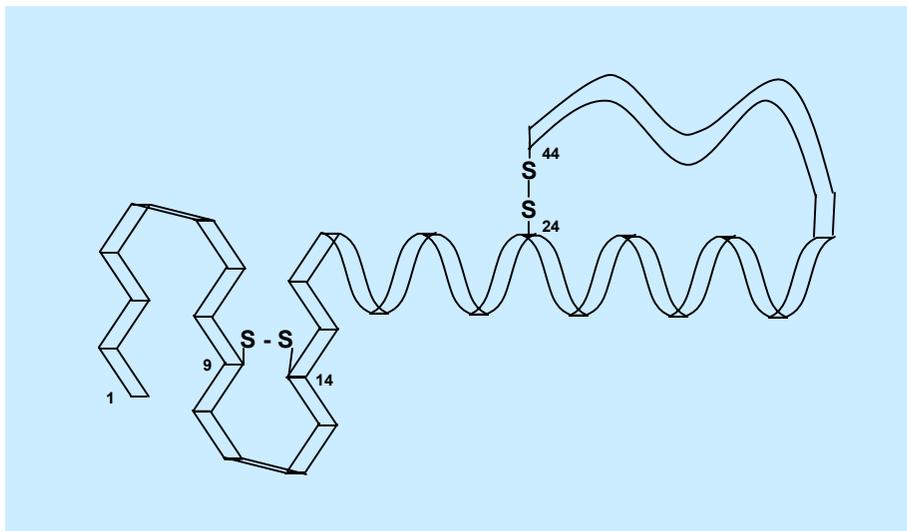
Succhi di frutta

Il limite d'uso per la NISINA nei paesi EU è di 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ di alimento

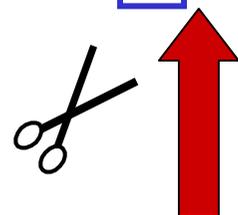


PEDIOCINA

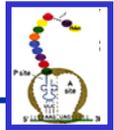
Il termine *Pediocina* è utilizzato per batteriocine prodotte dalle specie batteriche appartenenti al genere *Pediococcus* e aventi determinate caratteristiche molecolari. La più importante delle pediocine è la **Ach/PA-1** della quale diverse varianti sono state trovate in *Lactobacillus plantarum* e *Bacillus coagulans*. La pediocina **Ach/PA-1** è una batteriocina di **classe IIa** costituita da 44 aa. I determinanti genici di questa batteriocina sono sempre a livello plasmidico.



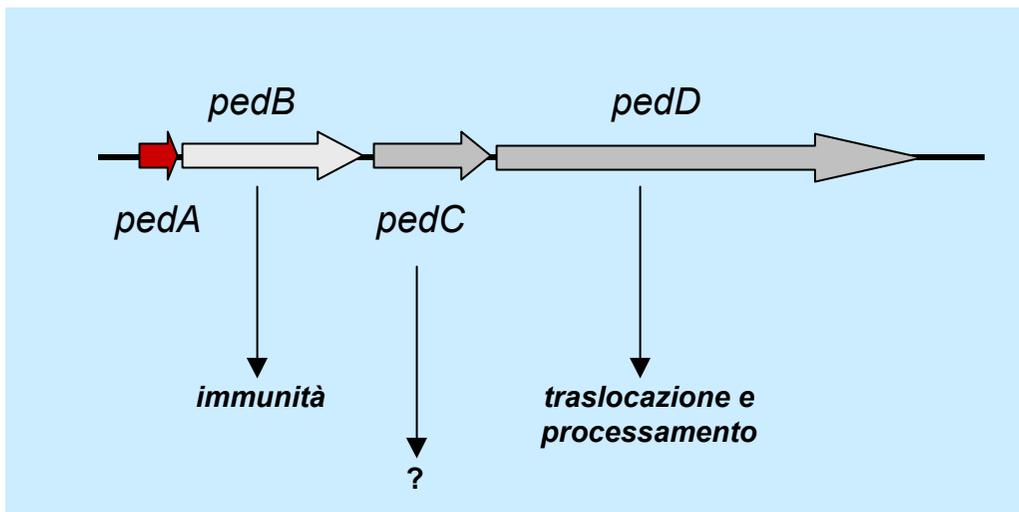
Pediocina Ach/PA-1		18 - M K K I E K L T E K E M A N I I G G K Y Y G
Leucocina A	24 -	M M N M K P T F S Y E Q L D N S A L E Q V V G G K Y Y G
Lattococcina A	21 -	M K N Q L N F N I V S D E E L S E A N G G K L T F
Lattococcina B	21 -	M K N Q L N F N I V S D E E L A E V N G G S L Q Y
Lattococcina M	21 -	M K N Q L N F E I L S D E E L Q G I N G G I R G T
Sakacina A	18 -	M M M V K E L S M T E L Q T I T G G A R S Y
Lactacina F	18 -	M K Q F N Y L S H K D L A V V V G G R N N V



**double glycine
processing site**

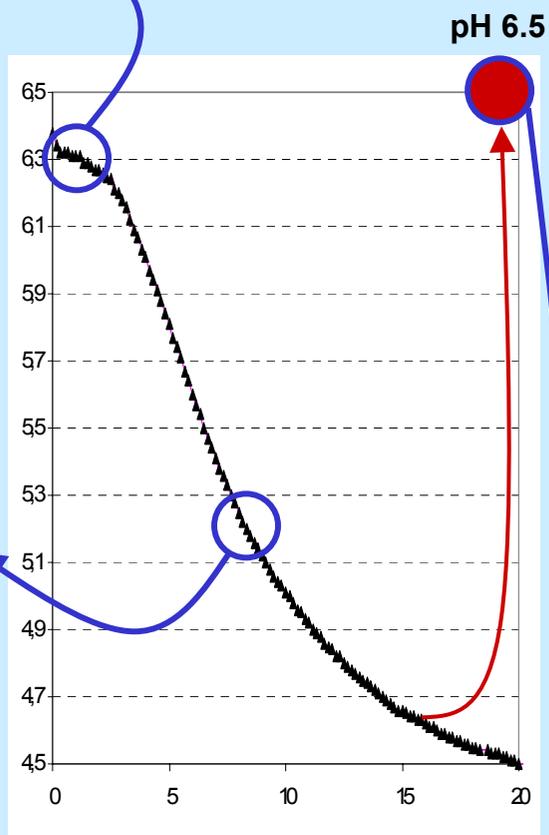
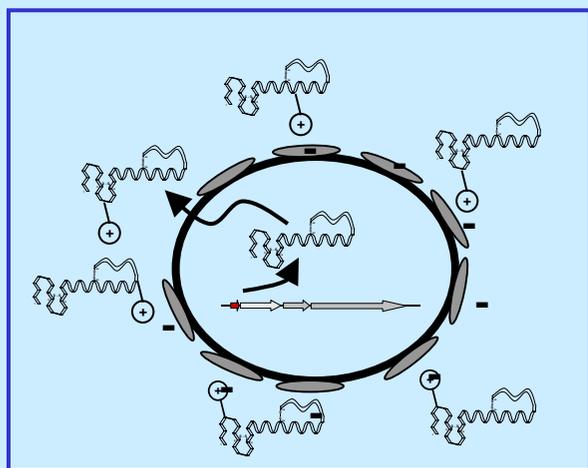
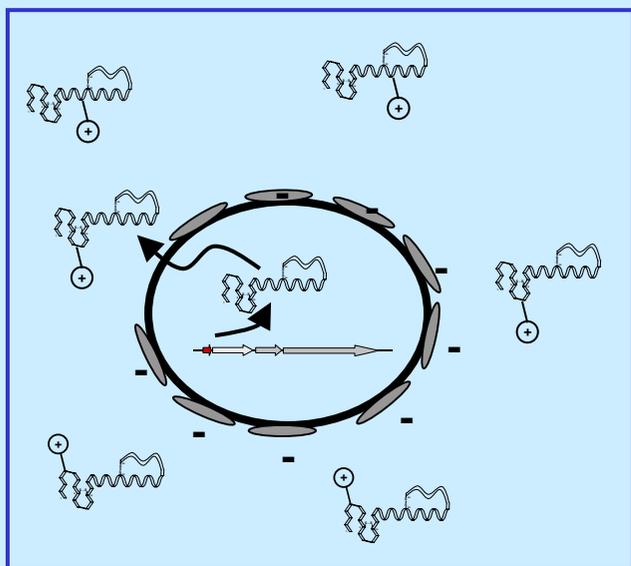
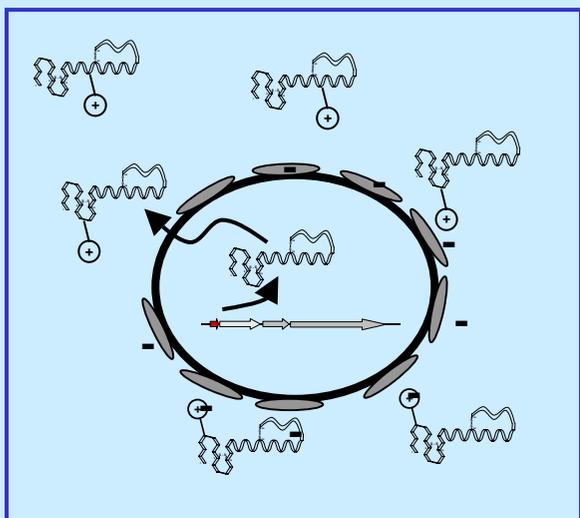
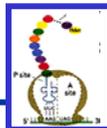


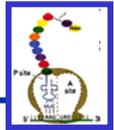
Organizzazione genica del cluster deputato alla sintesi della PEDIOCINA AcH/PA-1



L'operone pediocina è costituito da soli quattro geni che sono sempre stati individuati a livello plasmidico (pSRQ11 in *P. acidilactici* PAC1.0 e pSMB74 in *P. acidilactici* AcH). Attualmente, l'operone pediocina AcH/PA-1 è stato ritrovato in *P. acidilactici*, *P. parvulus*, *L. plantarum* e *B. coagulans* dimostrando l'ampia diffusione e quindi il vantaggio competitivo di questi determinanti genici. In tutte queste specie microbiche l'operone pediocina mostra un elevato grado di conservazione delle sequenze evidenziando solo rare mutazioni puntiformi nei geni *pedA*, *pedB* e *pedD*. La diffusione dell'operone pediocina in specie e generi differenti è legata anche alla capacità dei plasmidi pSRQ11 e pSMB74 (e delle sue varianti) di essere trasmesso per scambio genico orizzontale e di replicarsi in diversi background cellulari. Le dimensioni dei plasmidi che ospitano l'operone pediocina variano dalle 9.4 Kb alle 14 Kb. Sia la regolazione della biosintesi di questa importante batteriocina che i meccanismi che ne regolano l'acquisizione di immunità non sono stati ancora chiariti.

La pediocina è un peptide di 44 aa (4.6 kDa) con un p.i. di 9.6 costituito dal 25 % di aa non polari, il 56 % da aa polari, il 2.3 % da aa acidi e dal 15.9 % di aa basici; contiene inoltre 4 Cys e 1 Met. Queste caratteristiche fanno sì che la pediocina a pH > 6 possieda 3 cariche positive che raddoppiano a pH < 6. Questa molecola può quindi considerarsi un peptide cationico che a determinati pH (6.5) viene adsorbito sulla superficie delle cellule produttrici.





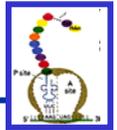
Caratteristiche fisico-chimiche della pediocina AcH/PA-1

sensibile a **Chimotripsina, Tripsina K, Termolisina**
resistente a **Tripsina R e Trombina**
resistente al riscaldamento a **80 °C per 60 min**
parzialmente inattivata dopo trattamento a **121 °C per 15 min**
attiva in un range di **pH da 3 a 9**
sensibile a fenomeni **ossidativi**

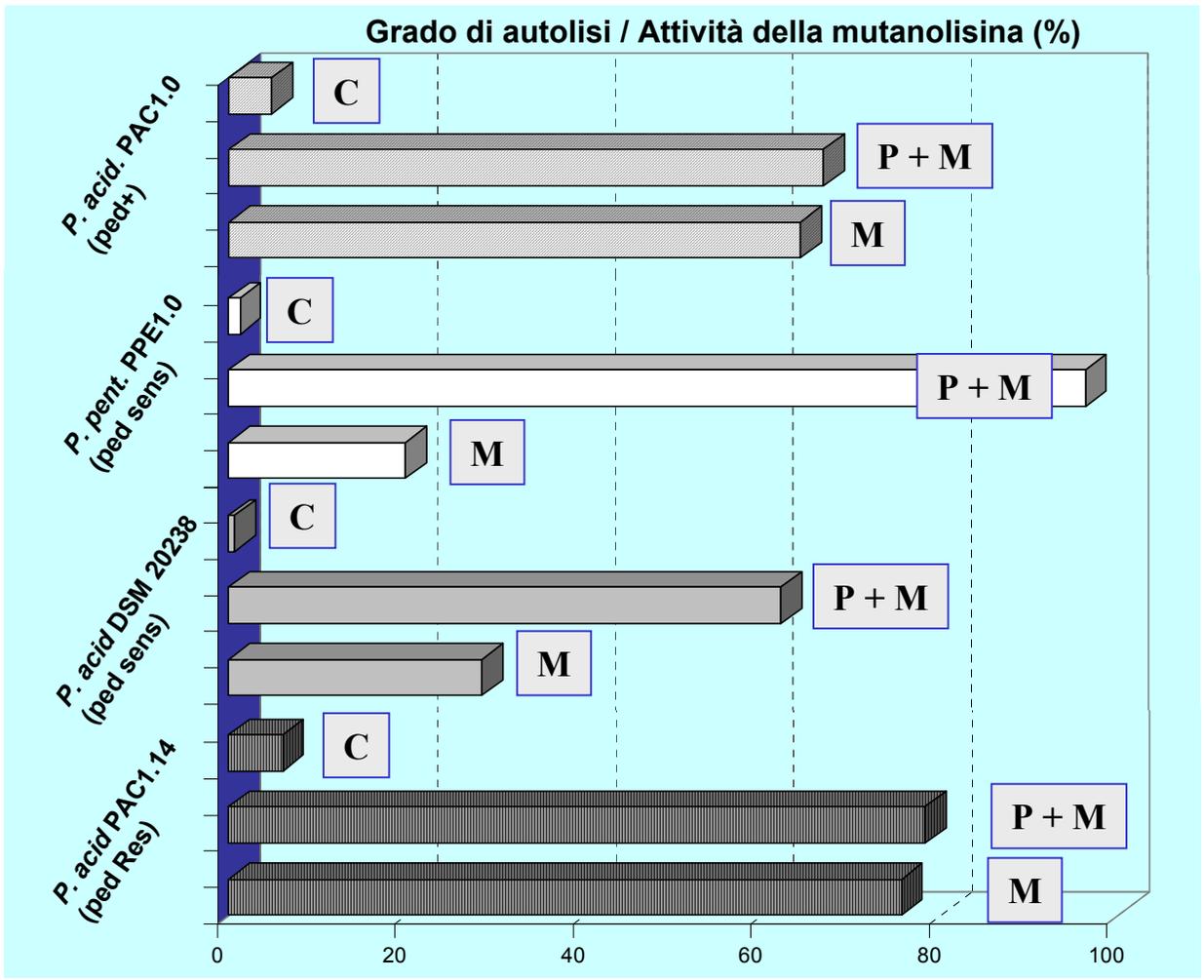
Meccanismo d'azione e ...

La pediocina e molte altre batteriocine della medesima classe (IIa), sono caratterizzate da una forte azione battericida nei confronti di **Listeria monocytogenes**. Come molte altre batteriocine anche la pediocina agisce modificando il potenziale di membrana attraverso la formazione di piccoli pori e la conseguente fuoriuscita di molecole (< 9400 Da). Alcuni dati sperimentali suggeriscono inoltre l'esistenza di "specie" molecolari che agiscono come **recettori** di membrana per la pediocina o come **protettori** di membrana dall'effetto battericida della batteriocina. Secondo recenti teorie, la pediocina non avrebbe necessità di **recettori** per legarsi alla membrana cellulare e l'affinità del peptide con i fosfolipidi sarebbe principalmente dovuta ad interazioni elettrostatiche del dominio N-terminale, in particolare è stato osservato un ruolo importante dell'His-12 che deprotonata (ad un pH ambientale maggiore di 6) riduce la capacità di legame della pediocina sulla membrana. Altri dati sperimentali evidenziano che all'aumentare della concentrazione di fosfolipidi carichi negativamente il legame della pediocina alla membrana aumenta.

L'utilizzo della **pediocina** come prodotto puro non è ancora stato regolamentato dalle organizzazioni governative americane (FDA e FSIS, Food and Drug Administration, Food Safety Inspection Service). Ciò nonostante esiste attualmente un prodotto commerciale contenente pediocina anche se non ne reca indicazione in etichetta.



Influenza dell'interazione tra peptidoglicano-idrolasi e batteriocina Ach/PA-1 nell'accelerare il fenomeno autolitico



Cellule raccolte in fase esponenziale, risospese in tampone MES in presenza di 50 AU/ml di pediocina Ach/PA-1 e di 1.5 U/ml di mutanolisina

P + M

Cellule raccolte in fase esponenziale, risospese in tampone MES in presenza di 1.5 U/ml di mutanolisina

M

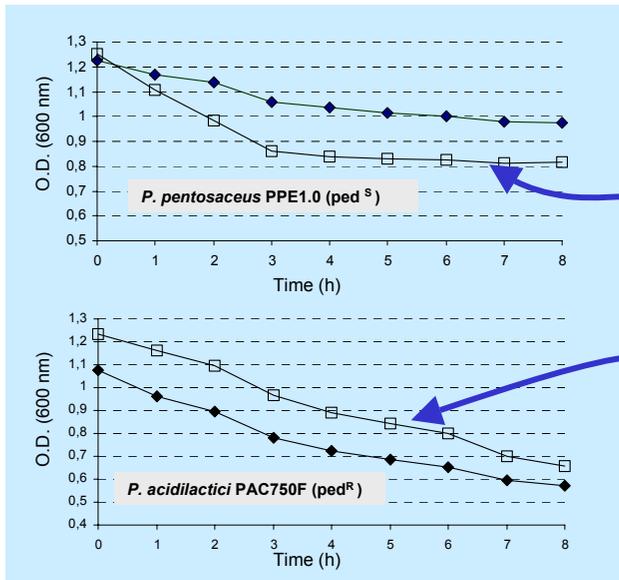
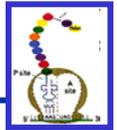
Cellule raccolte in fase esponenziale e risospese in tampone MES

C

M = mutanolisina

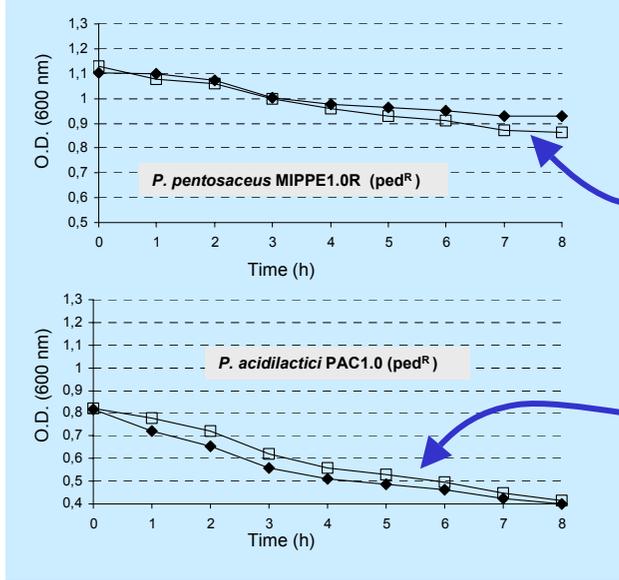
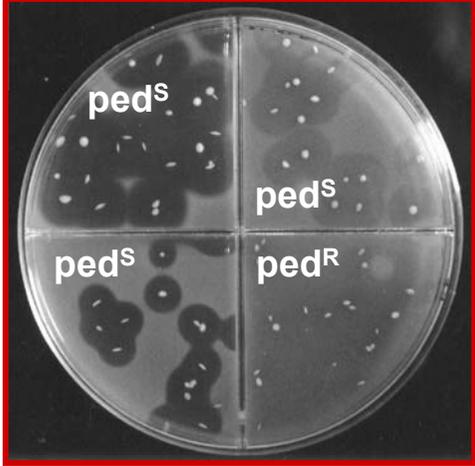
P = pediocina

C = controllo



+ 50 AU (ped)/ml

Decremento di O.D. (600 nm) in funzione del tempo (h) di cellule raccolte in fase esponenziale, risospese in tampone fosfato



+ 50 AU (ped)/ml