

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Antimikrobiální vlastnosti nových enterocinů
Pavlína Francová

Bakalářská práce
2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

Beru na vědomí, že v souladu s §47b zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č.9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 6. 2017

Pavλίna Francová

Poděkování

Mé poděkování patří Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval.

ANOTACE

První část práce je věnovaná bakteriocinům, tj. antimikrobiálně působícím peptidům, a to převážně jejich dělení a charakteristice jednotlivých skupin. Druhá část bakalářské práce je zaměřená již konkrétněji na enterociny – bakteriociny produkované enterokoky. V této části se text zabývá hlavně vlastnostmi a využitím nově objevených enterocinů.

KLÍČOVÁ SLOVA

bakteriociny, enterociny, antimikrobiální působení, peptidy, kažení potravin

TITLE

Antimicrobial properties of new enterocines

ANNOTATION

The first part of the thesis is devoted to bacteriocins, ie antimicrobial-acting peptides, mainly their division and the characteristics of individual groups. The second part of the bachelor thesis is focused more specifically on enterocines - bacteriocins produced by enterococci. In this part it deals mainly with properties and utilization of newly discovered enterokines.

KEYWORDS

bacteriocins, enterocins, antimicrobial effects, peptides, food spoilage

OBSAH

OBSAH	6
SEZNAM OBRÁZKŮ	7
SEZNAM TABULEK	9
SEZNAM ZKRATEK	10
ÚVOD	11
1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BAKTERIOCINŮ	12
2 HISTORIE A SOUČASNOST V DĚLENÍ BAKTERIOCINŮ	14
2.1 TŘÍDA I – LANTIBIOTIKA	16
2.1.1 <i>Ia</i> podtřída	16
2.1.2 <i>Ib</i> podtřída	18
2.2 TŘÍDA II	20
2.2.1 Podtřída <i>Ia</i> – pediocinové	20
2.2.2 Podtřída <i>Ib</i> – dvoupeptidové	21
2.2.3 Podtřída <i>Ic</i>	22
2.3 DALŠÍ SPECIÁLNÍ TŘÍDY BAKTERIOCINŮ	23
2.3.1 Bakteriociny bez vedoucího peptidu	23
2.3.2 Kruhové (cirkulární) bakteriociny	23
3 ENTEROKOKY – PRODUCENTI ENTEROCINŮ	25
3.1 TESTOVÁNÍ PRODUKCE A ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚČINKŮ ENTEROCINŮ	27
4 „NOVÉ“ ENTEROCINY	32
4.1 DURANCIN	32
4.2 HIRANCIN	36
4.3 ENTEROLYSIN A	38
4.4 BAKTERIOCIN ST4SA	42
4.5 ENTEROCIN P	46
4.6 ENTEROCIN LD3	50
4.7 ENTEROCIN TW21	52
4.8 MUNDTICIN	53
4.9 ENTEROCIN HF	54
ZÁVĚR	55
POUŽITÁ LITERATURA	56

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1	Struktura lanthioninu (1), struktura methyllantioninu (2) (Bilkova <i>et al.</i> , 2011)	16
Obrázek č. 2	Struktura nisinu (de Kruijff <i>et al.</i> , 2008)	17
Obrázek č. 3	Struktura nisinu (Jack <i>et al.</i> , 1995)	17
Obrázek č. 4	Vytvoření póru působením nisinu na cílovou buňku (Jun-ichi Nagao, 2009)	18
Obrázek č. 5	Struktura mersacidinu (Guder <i>et al.</i> , 2000)	19
Obrázek č. 6	Ovlivnění syntézy petidoglykanu působením mersacidinu (Guder <i>et al.</i> , 2000)	19
Obrázek č. 7	Struktura leucocinu A se zvýrazněnou strukturou Y-G-N-G-V (Upraveno dle Lohans and Vederas, 2012)	20
Obrázek č. 8	Vytvoření póru bakteriocinem (Upraveno dle Garneau <i>et al.</i> , 2002)	22
Obrázek č. 9	Změny na bakteriální buňce <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> vlivem enterocinu NKR-5-3B (Grande <i>et al.</i> , 2005)	24
Obrázek č. 10	Antimikrobiální aktivita konvenčních antibiotik a antimikrobiálních peptidů (Upraveno dle Sang and Blecha, 2008)	26
Obrázek č. 11	Testování antimikrobiální aktivity enterocinu (Hassan <i>et al.</i> , 2017)	28
Obrázek č. 12	Zbytková antimikrobiální aktivita durancinu po působení různého pH a různých teplot (Hu <i>et al.</i> , 2008)	35
Obrázek č. 13	Účinek enterolysinu A na kmen <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> (Upraveno dle Khan <i>et al.</i> , 2013)	39
Obrázek č. 14	Narušení buňky <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> působením Enterolysinu A (Upraveno dle Khan <i>et al.</i> , 2013)	40
Obrázek č. 15	Schéma štěpení buněčné stěny působením enterolysinu A (Khan <i>et al.</i> , 2013)	41
Obrázek č. 16	<i>Enterococcus faecium</i> bez ošetření bakteriocinem ST4SA (A), po 1 hodině po ošetření bakteriocinem ST4SA (B) (Knoetze <i>et al.</i> , 2008)	42
Obrázek č. 17	Kostní cement bez přidání bakteriocinu ST4SA (1), po přidání bakteriocinu ST4SA (2) (Staden <i>et al.</i> , 2011)	44
Obrázek č. 18	Vznik inhibičních zón v důsledku produkce bakteriocinu ST4SA den první (1.), den osmý (2), den třináctý (3.) (Upraveno dle Staden <i>et al.</i> , 2011)	45

Obrázek č. 19	Uvolňování bakteriocinu z kostního cementu vzhledem k původnímu množství proteinu (Upraveno dle Staden <i>et al.</i> , 2011)	45
Obrázek č. 20	Podobnost v aminokyselinových sekvencích enterocinu TW21, hiracinu JM79 a durancinu GL (Upraveno dle Chen <i>et al.</i> , 2013)	52
Obrázek č. 21	Stuktura enterocinu HF (Arbulu <i>et al.</i> , 2015).....	54

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1	Vybrané kmeny bakterií, které produkují bakteriociny (upraveno dle McAuliffe <i>et al.</i> , 2001, Settanni and Corsetti, 2008, Hammami <i>et al.</i> , 2013, Bilkova <i>et al.</i> , 2011).....	13
Tabulka č. 2	Dělení II skupiny dle Klaenhammera (1993).....	14
Tabulka č. 3	Výsledná antimikrobiální aktivita hirancinu po působení teploty, enzymů a pH u hirancinu (Sánchez <i>et al.</i> , 2008).....	29
Tabulka č. 4	Velikosti inhibičních zón vzniklé působením různých vnějších podmínek (Chen <i>et al.</i> , 2013).....	30
Tabulka č. 5	Inhibiční účinek durancinu na testované kmeny (Yanagida <i>et al.</i> , 2005).....	33
Tabulka č. 6	Fungicidní účinek durancinu (Belguesmia <i>et al.</i> , 2013).....	34
Tabulka č. 7	Aktivita hirancinu po působení vnějších podmínek (De Kwaadsteniet <i>et al.</i> , 2006).....	37
Tabulka č. 8	Antimikrobiální účinky <i>Enterococcus faecalis</i> a purifikovaného enterolysinu A (Hickey <i>et al.</i> , 2003).....	38
Tabulka č. 9	Průměry inhibičních zón vzniklé u testovaných kmenů vlivem bakteriocinu ST4SA (Upraveno dle Knoetze <i>et al.</i> , 2008).....	43
Tabulka č. 10	Antimikrobiální aktivita enterocinu P (Braňek <i>et al.</i> , 2017).....	47
Tabulka č. 11	Minimální inhibiční koncentrace enterocinu P v závislosti na použitém indikátorovém kmeni (Cintas <i>et al.</i> , 1997).....	48

SEZNAM ZKRATEK

AMK	aminokyseliny
ATP	adenosintrifosfát
CFU/ml	jednotky tvořící kolonie vztažené na mililitr (z angl. <i>colony forming units</i>)
Dha	dehydroalanin
Dhb	dehydrobutyrin
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
GRAS	obecně uznáváno jako bezpečné (z angl. <i>generally recognized as safe</i>)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
LD ₅₀	střední letální dávka (dávka, která způsobí úhyn 50 % testovaných jedinců do 24 hodin od expozice)
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie s detektorem doby letu (z ang. <i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
SEM	skenovací elektronový mikroskop (z angl. <i>scanning electro microscope</i>)
SRP	povrchová plasmonová rezonance (z angl. <i>surface plasmon resonance</i>)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie (z angl. <i>transmission electron microscopy</i>)
VRE	vancomycin-rezistentní enterokoky

ÚVOD

V poslední 50 letech došlo k dramatickému zvýšení rezistence bakterií k antibiotikům. Výzkum a vývoj nových antibiotik však bohužel není schopný produkovat nová antibiotika stejným tempem, a proto nám tyto bakteriální infekce s odolností proti antibiotikům výrazně komplikují léčbu. Obzvláště znepokojivé se pak staly vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE). V roce 2013 centra pro kontrolu a prevenci oznámila, že 30 % nosokomiálních enterokokových infekcí je vankomycin rezistentních. Nejčastěji způsobují enterokokové nosokomiální infekce druhy *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. Oba tyto druhy vykazují přirozenou rezistenci k několika druhům antibiotik jako např. k betalaktamasám nebo aminoglykosidům. Navíc mají schopnost přenášet rezistenci k jiným druhům jako je *Staphylococcus aureus*. Proto je nutné vyvinout nové metody ochrany proti těmto infekcím.

Antimikrobiální peptidy, které označujeme jako bakteriociny jsou produkty bakterií, které vykazují účinky proti blízce příbuzným druhům. Bakteriociny je také možné použít k ochraně potravin před patogeny. Díky své rozmanitosti poskytují i potenciální využití v lékařství (McClintock *et al.*, 2016; Riley, 2009).

1 Základní charakteristika bakteriocinů

Bakteriociny jsou charakterizované jako ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy nebo proteinové komplexy, které produkují hlavně Gram-pozitivní, ale i Gram-negativní bakterie. Na základě této skutečnosti je můžeme dělit do dvou velkých podskupin. Bakteriociny Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií se liší počtem genů zapojených do biosyntézy, kdy k produkci bakteriocinů pocházejících z Gram-pozitivních bakterií je nutné do biosyntézy zapojit daleko více těchto genů.

Bakteriociny produkuje celá řada mikroorganismů (tabulka č. 1), protože mechanismus vzniku je poměrně jednoduchý. Geny pro biosyntézu bakteriocinů jsou uloženy na plasmidech, chromozomech nebo transpozonech. Obvykle jsou bakteriociny syntetizovány jako inaktivní prepeptidy (Soliman *et al.*, 2011; Nes *et al.*, 1996). Bakteriociny vykazují úzké spektrum účinku, působí tedy jen na blízkce příbuzné druhy bakterií, čímž se liší od antibiotik, které většinou působí na mnohem širší skupinu různých bakterií (Riley, 2009).

Gratia (1925) poprvé identifikoval antimikrobiální protein izolovaný z bakterie *Escherichia coli*. Tento bakteriocin byl pojmenován kolicin. Nisin byl pak první bakteriocin, který se používal pro komerční účely, a to již od roku 1969.

Používání bakteriocinů jako bio-konzervačních látek pro potraviny začal před necelými 40 lety. V těchto letech se studie zaměřovaly na inhibici kažení potravin a lidských patogenů spojených s potravinami (např. zeleninou) pomocí bakteriocinů a jejich aplikaci, jakožto náhradu za chemické složky a antibiotika (Collins *et al.*, 2010). Protože množství chemických prostředků, které se používají na ochranu potravin proti bakteriím, způsobuje znehodnocení potravin (kažení) a má řadu vedlejších účinků pro konzumenty. Z tohoto důvodu výrazně vzrostl v několika posledních desetiletích zájem o přírodní látky, které by způsobily inhibici právě těchto bakterií, bez výrazných vedlejších účinků. Bakteriociny tuto podmínku splňují. V gastrointestinálním traktu jsou inaktivovány pomocí enzymů, jako je trypsin a pepsin, takže nemění mikroflóru zažívacího traktu. Značná část bakterií mléčného kvašení a jejich produkty (bakteriociny) jsou tedy zdravotně nezávadné a staly se tak vhodné pro užití v potravinářství (Gaaloul *et al.*, 2015; Cleveland *et al.*, 2001).

Tabulka č. 1 Vybrané kmeny bakterii, které produkují bakteriociny (upraveno dle McAuliffe et al., 2001, Settanni and Corsetti, 2008, Hammami et al., 2013, Bilkova et al., 2011)

Kmen produkující bakteriocin	Bakteriociny
<i>Bacillus subtilis</i>	Subtilin, Subpeptin
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Piscicolin 126
<i>Carnobacterium maltoromaticum</i>	Carnocyclin A
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cytolysin
<i>Escherichia coli</i>	Colicin, Microcin
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidophilucin A
<i>Lactobacillus bavaricus</i>	Bavaricin A
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricin
<i>Lactococcus lactis</i>	Lacticin 481
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisin A, Nisin Z
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocin PA-1
<i>Ruminococcus gnavus</i>	Ruminococcin C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Epidermin, Epicidin, Epilancin
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Gallidarmin
<i>Staphylococcus hominis</i>	Hominicin
<i>Streptococcus mutans</i>	Mutacin 1140
<i>Streptococcus salivarius</i>	Salivaricin A
<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	Duramycin

2 Historie a současnost v dělení bakteriocinů

První dělení bakteriocinů bylo publikováno již v roce 1993 Todd R. Klaenhammerem, který dělil bakteriociny do následujících skupin. V první skupině (skupina lantibiotik) se objevují malé bakteriociny s molekulovou hmotností do 5 kDa, které obsahují ve své struktuře neobvyklé aminokyseliny lanthionin a β -methyl lanthionin. Mezi zástupce této skupiny je možno řadit nisin nebo lacticin 481.

Do II. skupiny Klaenhammer řadil menší bakteriociny, jejichž molekulová hmotnost nepřesahuje 10 kDa, které jsou tepelně stabilní a neobsahují lanthionin ve své struktuře. Tuto skupinu dále dělil do 3 podskupin, jejichž krátkou charakteristiku popisuje tabulka č. 2.

Tabulka č. 2 Dělení II skupiny dle Klaenhammera (1993)

II skupina	Účinky a vlastnosti	Zástupci
IIa	antimikrobiálními účinky, konstantní N-koncová část	sakacin P, curvacin A
IIb	dvoupeptidové	lactococcin G a M
IIc	thiolem aktivované peptidy vyžadující redukci cysteinových zbytků pro svoji aktivitu	lactococcin B

Bakteriociny III. skupiny jsou charakterizovány jako termolabilní proteiny s velikostí do 30 kDa. Jako zástupce této skupiny je uveden helveticin J.

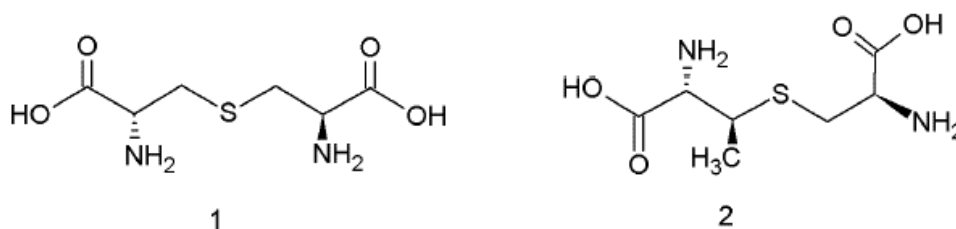
Do IV. skupiny byly řazeny bakteriocinové komplexy (protein s několika chemickými strukturami např. lipidy nebo karbohydráty). Charakteristickým zástupcem IV. skupiny je plantaricin S nebo lactocin 27. Již v roce 2001 byla tato skupina považována za artefakty, nikoliv za další skupinu bakteriocinů (Cleveland *et al.*, 2001).

Bakteriociny produkované Gram-negativními bakteriemi jsou rozdělené do dvou skupin. Do první skupiny řadíme koliciny, tedy bakteriociny v rozmezí 25-80 kDa. Druhou skupinu nazýváme mikrocin, jejichž molekulová hmotnost není větší než 10 kDa. Mikrocin

mohou být dále rozděleny do dvou tříd. *I* třída mikrocinů má molekulovou hmotnost <5 kDa a bakteriociny v této skupině jsou post-translačně modifikovány. Pro své antimikrobiální působení využívají specifické intracelulární cíle. Naproti tomu mikrocin *II* třídy nejsou modifikovány a jejich molekulová hmotnost je v rozmezí 7-10 kDa. Jejich antimikrobiální působení je způsobeno interakcí s bakteriálními membránami (Pons *et al.*, 2002).

2.1 Třída I – lantibiotika

Do I. třídy řadíme malé bakteriociny s molekulovou hmotností <5 kDa, které ve své struktuře obsahují 19-37 AMK. Mezi aminokyselinami nalézáme i méně obvyklé jako je lanthionin a methyllanthionin, jejichž struktura je vyobrazena na obrázku č. 1 (Bilkova *et al.*, 2011).



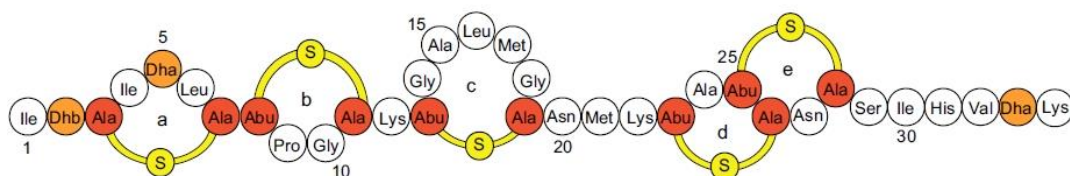
Obrázek č. 1 Struktura lanthioninu (1), struktura methyllanthioninu (2) (Bilkova *et al.*, 2011)

První třídu bakteriocinů dále dělíme do dvou podtříd.

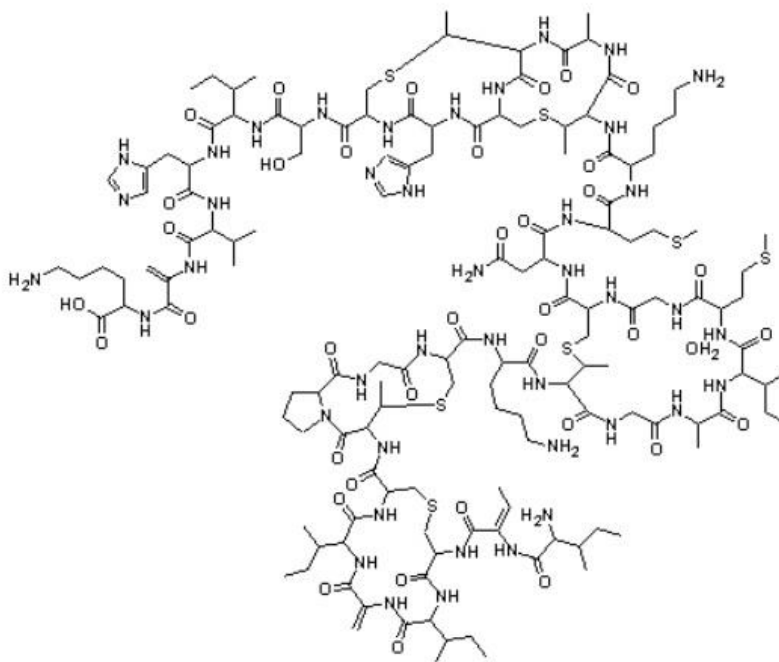
2.1.1 Ia podtřída

Prvním objeveným bakteriocinem z této skupiny byl nisin. Nisin je produkován určitými kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. V praxi ho pak můžeme hledat pod označením E234, jako aditivní látku v potravinářství. Použití nisinu, jako konzervačního prostředku, je povoleno pro zrající a tavené sýry, ale pouze v množství do 12,5 mg/kg. U některých sýrů může být přítomen také v důsledku přírodních fermentačních procesů.

Nisin, jehož struktura je na obrázku č. 2 a na obrázku č. 3, má 34 aminokyselinových zbytků. Nenasycené aminokyseliny dehydroalanin (Dha) a dehydrobutyrin (Dhb) se tvoří post-translační dehydratací serinových (v případě Dha) a threoninových (z případě Dhb) zbytků. Tyto nenasycené aminokyselinové zbytky mohou dále reagovat se sousedními nukleofilními skupinami. Atakem thiolové skupiny blízkého cysteinového zbytku vzniká thioetherový můstek. Reakce dehydroalaninu a cysteinového zbytku vytváří lanthionin. Reakcí s dehydrobutyrimem vzniká methyllanthionin (Bilkova *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2011).



Obrázek č. 2 Struktura nisinu (de Kruijff et al., 2008)



Obrázek č. 3 Struktura nisinu (Jack et al., 1995)

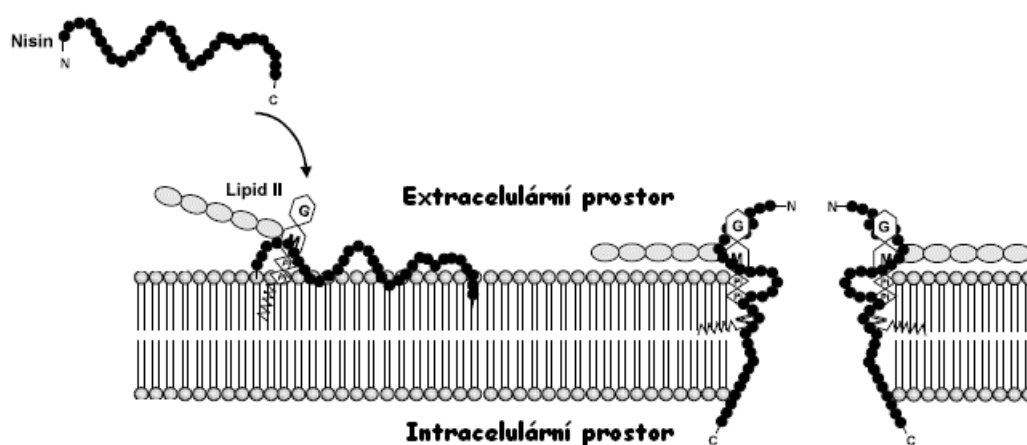
Nisin je do značné míry používán v potravinářském průmyslu jako antibotulinické činidlo při výrobě sýrů, omáček a konzerv. Tento bakteriocin vykazuje široké spektrum antimikrobiálních účinků proti *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a dalším patogenním a podmíněně patogenním bakteriím (Rilla et al., 2004).

Pokud je nisin podáván orálně, jeho LD₅₀ se odhaduje na 950 mg/kg, což nepředstavuje toxický efekt pro člověka (Jozala et al., 2007).

Nisin může působit několika antimikrobiálními mechanismy. Ke vzniku tzv. „non-targeted“ pórů dochází v případech, kdy se nisin vyskytuje v mikromolárních koncentracích. Vznikem těchto pórů dochází k narušení fosfolipidové dvojvrstvy v důsledku interakce polární části molekuly (C konce) bakteriocinu iontovými silami s polární hlavičkou fosfolipidů v membráně. Za této situace se může N-konec (hydrofobní část) bakteriocinu zasunout dovnitř membrány a následně se C-konec nisinu přemístí z vnější do vnitřní strany membrány. Dochází k tvorbě póru, tedy dochází ke ztrátě membránového potenciálu a malé molekuly jako ATP a AMK unikají z molekuly.

Při nanomolární koncentraci nisinu je mechanismus jeho účinku obdobný. Dochází opět k tvorbě póru, ale v důsledku specifického navázání nisinu na prekurzor glykoproteinu (lipidu II), který je vázán v membráně citlivé buňky. Interakce N-konce nisinu s lipidem II umožní konformační změnu molekuly. V důsledku této změny se dostává C-konec nisinu do buňky. Interakce nisinu s lipidem II stabilizuje transmembránovou orientaci nisinu a současně se inhibuje syntéza peptidoglykanu. Tento způsob antimikrobiálního působení je znázorněn na obrázku č. 4.

Do této bakteriocinů skupiny řadíme například i salivaricin A, lacticin 481 a mutacin (Bilkova *et al.*, 2011).

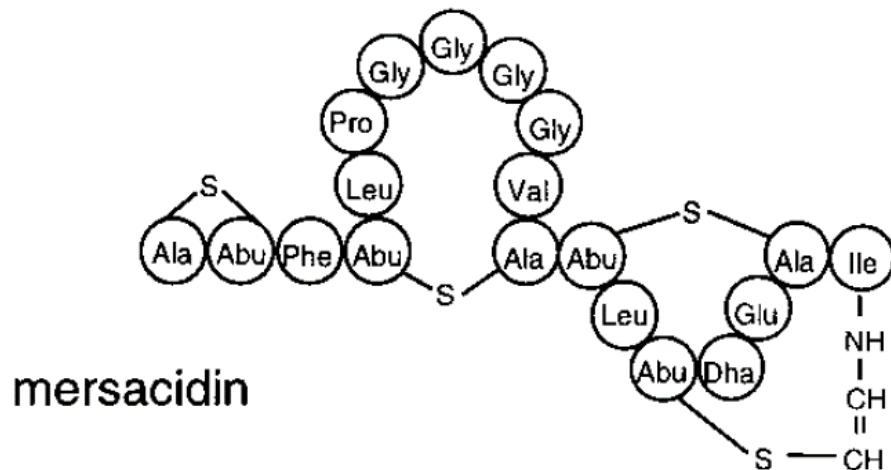


Obrázek č. 4 Vytvoření póru působením nisinu na cílovou buňku (Jun-ichi Nagao, 2009)

2.1.2 *Ib* potřída

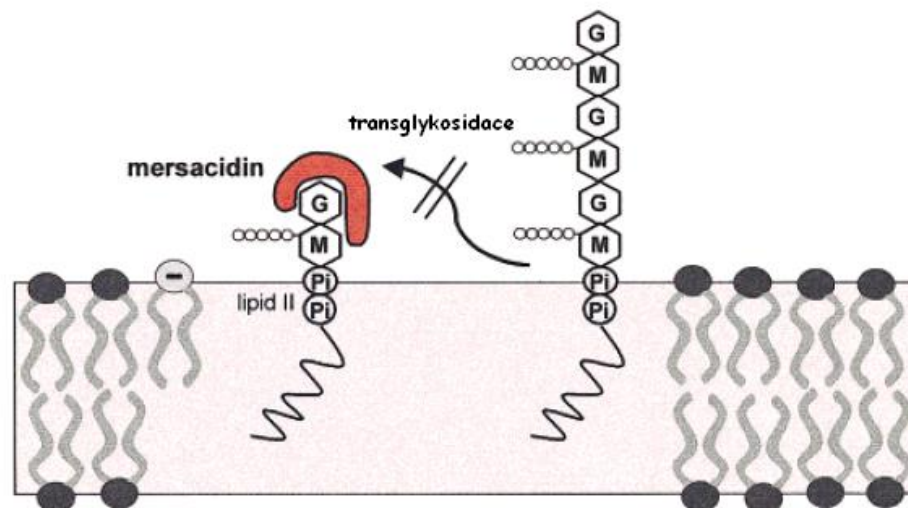
Starší literatura uvádí jako způsob antimikrobiálního působení *Ib* podtřídy bakteriocinů inhibici enzymů, které se podílejí na tvorbě buněčné stěny. Dnes již víme, že jejich účinek je velice podobný účinkům bakteriocinů podskupiny *Ia*. Do *Ib* podtřídy lantibiotik zahrnujeme např. mersacidin nebo lacticin 3147 (Bilkova *et al.*, 2011).

Mersacidin, jehož struktura je zobrazena na obrázku č. 5, je produkován některými kmeny *Bacillus* a je aktivní proti blízkým druhům Gram-pozitivních bakterií zahrnující také methicilin-resistentní *S. aureus* (MRSA) (Chatterjee *et al.*, 1992).



Obrázek č. 5 Struktura mersacidinu (Guder et al., 2000)

Baktericidní účinek mersacidinu je způsoben inhibicí syntézy peptidoglykenu (viz obrázek č. 6). Peptidoglykanová polymerační síť umístěná na vnější straně membrány zajišťuje pevnost a tvar bakterie. Mersacidin zabraňuje syntéze peptidoglykanu během transglykosylační reakce. Při této reakci dochází k převedení monomerního peptidoglykanového prekurozoru (lipidu II) spojeného s buněčnou membránou, na polymerní peptidoglykan. Dochází tedy ke snížení tloušťky buněčné stěny, později k zastavení růstu citlivé buňky a pomalé indukci lyzace. Ostatní makromolekulární procesy nejsou inhibovány (Brötz H et al., 1995; Brötz H et al., 1998; de Kruijff et al., 2008).



Obrázek č. 6 Ovlivnění syntézy peptidoglykanu působením mersacidinu (Guder et al., 2000)

2.2 Třída II

Bakteriociny této skupiny mají molekulovou hmotnost <10 kDa, jsou tepelně stabilní a nemodifikované (Chen *et al.*, 2013).

Druhou třídu bakteriocinů můžeme dále dělit do tří podtříd.

2.2.1 Podtřída IIa – pediocinové

Podtřída IIa bakterionů je nejobsáhlejší podtřídou druhé skupiny. Bakteriociny patřící do této skupiny mají silné antilisteriální účinky. Studie zahrnující několik stovek kmenů *Listeria monocytogenes* prokázaly, že téměř 100 % kmenů bylo usmrceno bakteriociny nebo bakteriemi mléčného kvašení, které tyto bakteriociny produkují. Je však nutné podotknout, že koncentrace bakteriocinů potřebná k usmrcení nejcitlivějšího a nejméně citlivého kmene *Listeria monocytogenes* se liší i více než stonásobně.

Pediocinové bakteriociny podtřídě IIa sdílejí celkovou aminokyselinovou sekvenční podobnost ze 40–70 %. Všichni zástupci této skupiny mají na svém N-konci jednotnou aminokyselinovou sekvenci Y-G-N-G-V/L, která je patrná z obrázku č. 7. Jmenovitě se jedná o aminokyseliny tyrosin, glycin, asparagin, glycin a valin popř. leucin.

Metodou nukleární magnetické rezonance (NMR) bylo zjištěno, že N-koncová část je strukturně stabilizována disulfidickým můstkem a zprostředkovává vazbu na povrch cílových buněk elektrostatickou interakcí. Zatímco C-terminální konec proniká do hydrofobní části membrán cílových buněk a způsobuje narušení membrány následně způsobující buněčnou smrtí.



Obrázek č. 7 Struktura leucocinu A se zvýrazněnou strukturou Y-G-N-G-V (Upraveno dle Lohans and Vederas, 2012)

Mezi zástupce této skupiny řadíme Enterocin P (blíže popsán v kapitole 4.5), který inhibuje i další Gram-pozitivní patogeny jako je *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* nebo *Staphylococcus aureus*, což částečně platí i pro další zástupce z této skupiny.

Dále sem můžeme řadit Enterocin T, bakteriocin produkovaný kmenem *Enterococcus* sp. 812, který je možné izolovat z čerstvé brokolice. Částečná sekvence N-koncové části, kterou se povedlo analyzovat je následující:

NH₂-A-T-Y-Y-G-N-G-V-Y-X-D-K-K-K-X-W-V-E-W-G-Q-A.

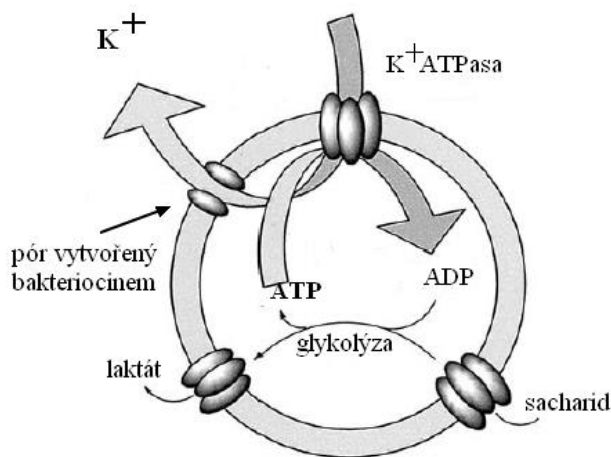
Antimikrobiální aktivita enterocinu T byla prokázána proti *Listria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei* ssp. *sakei*, *Lactobacillus lactis* ssp. *cremoris* nebo *Streptococcus thermophilus*. Bakteriocin je zcela neúčinný proti *Escherichia coli*, *Vibrio vulnificus*, *Weisella minor* nebo *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* (Chen *et al.*, 2013).

Dále do této skupiny můžeme také zařadit bakteriocin 31, bakteriocin T8, enterocin SE-KA, enterocin T a některé další (Nes and Holo, 2000; Ju *et al.*, 2015).

2.2.2 Podtřída *IIB* – dvoupeptidové

Do této podtřídy druhé skupiny řadíme bakteriociny, které jsou tzv. dvoupeptidové, kde dva odlišné peptidy působí synergicky a zabezpečují tím antimikrobiální účinek bakteriocinu proti jiným mikroorganismům, a to již v pikomolárních či nanomolárních koncentracích. Pokud testujeme tyto peptidy samostatně, nemají žádný nebo jen malý antimikrobiální účinek, v tomto případě musíme již použít vyšší koncentrace (Soliman *et al.*, 2011).

Účinek dvoupeptidových bakteriocinů u senzitivních bakterií vede ke zvýšení propustnosti membrány pro malé molekuly v důsledku vytvoření pórů. Dochází ke kolapsu transmembránového potenciálu, k rychlému vyčerpání ATP v buňce a efluxu draselných iontů z buňky ven. Smrt buňky nastává zbytečným cyklem absorpce draslíku v kombinaci se zvýšenou ATP hydrolyzou pomocí ATPasy, jak je možno vidět na obrázku č. 8 (Nes and Holo, 2000).



Obrázek č. 8 Vytvoření póru bakteriocinem (Upraveno dle Garneau *et al.*, 2002)

U dvoupeptidových bakteriocinů nalzáme podobnost v sekvenci aminokyselin, konkrétně se jedná o sekvenci GxxxG, kde x představuje jakékoliv aminokyseliny ohraničené glycínem, popř. sekvenci AxxxxA, zde se v krajních pozicích objevuje alanin. Tento motiv se v sekvenci peptidu objevuje jednou nebo dvakrát a souží k interakci mezi komplementárními peptidy.

Mezi zástupce řadíme např. lactococcin G a plantaricin S (Soliman *et al.*, 2011).

2.2.3 Podtřída *Iic*

V roce 1986 se do *Iic* skupiny řadily malé a tepelně stabilní peptidy, které se dále dělí do dvou skupin na thiolbiotika a cystibiotika. Thiolbiotika obsahují dva cystinové zbytky, naproti tomu cystibiotika obsahují tento zbytek jen jeden. Do této skupiny se dále řadil např. lactococcin A, divergicin A a acidocin B.

Od roku 2002 se do této skupiny zařazovaly ostatní bakteriociny, které „nezapadaly“ do žádné z předešlých podtříd druhé třídy. Tato skupina tedy neměla žádné speciální znaky, které by byly shodné pro celou skupinu (Joerger and Klaenhammert, 1986, Héchar nad Sahl, 2002; Klaenhammer, 1993).

2.3 Další speciální třídy bakteriocinů

2.3.1 Bakteriociny bez vedoucího peptidu

Bakteriociny patřící do této skupiny jsou produkovány Gram-pozitivními bakteriemi. Zvláštností u zástupců skupiny je, že jsou syntetizovány bez N-terminálního úseku, který je označován jako vedoucí. Bez přítomnosti N-koncové sekvence neprobíhají žádné post-translační modifikace, které u ostatních bakteriocinů standardně probíhají.

Většina bakteriocinů patřících do této skupiny je zpočátku produkována s N-terminálem, který je během dozrání bakteriocinu proteolyticky štěpen určitými proteasami. Vedoucí peptid hraje důležitou roli při produkci a exportu bakteriocinu, ochraně organismu producentů, atd. Export bakteriocinů bez N-koncové sekvence je pravděpodobně zprostředkován specializovanými transportéry ABC.

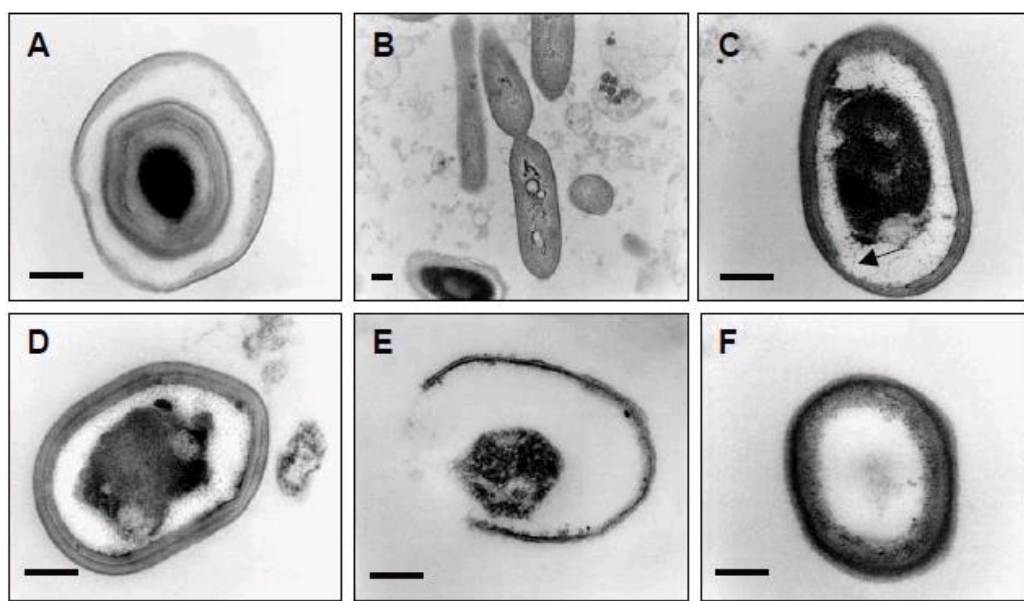
Mezi pozitivní vlastnosti bakteriocinů bez vedoucího peptidu patří silná inhibice mnoha bakterií, včetně potravinových patogenů, jako je *Listeria* nebo *Clostridium* ssp. Bakteriociny této skupiny jsou také účinné proti enterokokům rezistentním k vankomycinu (VRE) a methicilin rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA). VRE i MRSA jsou bakterie, které spojujeme s tzv. nosokomiálními infekcemi, tedy infekcemi pocházejícími z nemocničního prostředí (Lohans *et al.*, 2013).

2.3.2 Kruhové (cirkulární) bakteriociny

Obecně mají kruhové bakteriociny ve své sekvenci 35-70 aminokyselin. Tyto bakteriociny vznikají jako lineární prekurzory a až později dochází k cyklizaci. Touto cyklizací dochází ke zvyšování stability při působení pH, tepla, ale i proteolytického trávení ve srovnání s lineárními bakteriociny, což v praxi znamená, že tyto bakteriociny jsou schopné přežít i pasterizaci a další procesy konzervování potravin. Předpokládá se, že i jejich širší antimikrobiální aktivita vzhledem k lineárním bakteriocinům je způsobena cyklickými strukturami. Kvůli těmto vlastnostem jsou cirkulární bakteriociny zdrojem antimikrobiální aktivity, kterou je možno použít pro bezpečnost potravin a zdraví lidí (Hemu *et al.*, 2016; Samyn *et al.*, 1994).

První kruhový bakteriocin byl objeven již v roce 1994, konkrétně se jednalo o enterocin AS-48. Tento enterocin je zajímavý tím, že dokáže narušit endospory. Tato schopnost byla ověřena na bakterii *Alicyclobacillus acidoterrestris*, bakterii která je zodpovědná za kažení ovocných šťáv. Na obrázku č. 9/A můžeme vidět bakteriální buňku

s endosporou bez ošetření bakteriocinem. Na obrázku 9/B stejná buňka, jako v předchozím případě, avšak po inkubaci 24 hodin. Na obrázku 9/C vidíme šipkou označenou degradaci bakteriální buňky po ošetření bakteriocinem po 15 minutách působení, na dalších obrázcích (9/D, E) vidíme bakteriální buňku po 8 hodinovém ošetření a obrázek 9/F ukazuje, jak vypadá buňka po 24 hodinách působení enterocinu (Grande *et al.*, 2005).



Obrázek č. 9 Změny na bakteriální buňce *Alicyclobacillus acidoterrestris* vlivem enterocinu NKR-5-3B (Grande *et al.*, 2005)

Mezi další zástupce této skupiny můžeme řadit enterocin NKR-5-3B. Tento enterocin je jeden z pěti peptidů (NKR-5-3A, Z, B a C), které jsou produkovány kmenem *Enterococcus faecium* a které jsou klasifikovány jako bakteriociny. Enterocin NKR-5-3B obsahuje 64 aminokyselinových zbytků a jeho molekulová hmotnost činí 6,313 kDa. Tento bakteriocin vykazuje poměrně široké spektrum antimikrobiální aktivity. Zvláště účinný je proti bakteriálním kmenům rodu *Bacillus* a *Enterococcus*. Žádnou antimikrobiální aktivitu naopak nevykazuje proti Gram-negativním bakteriím jako *Escherichia coli* nebo *Salmonella* (Himeno *et al.*, 2015).

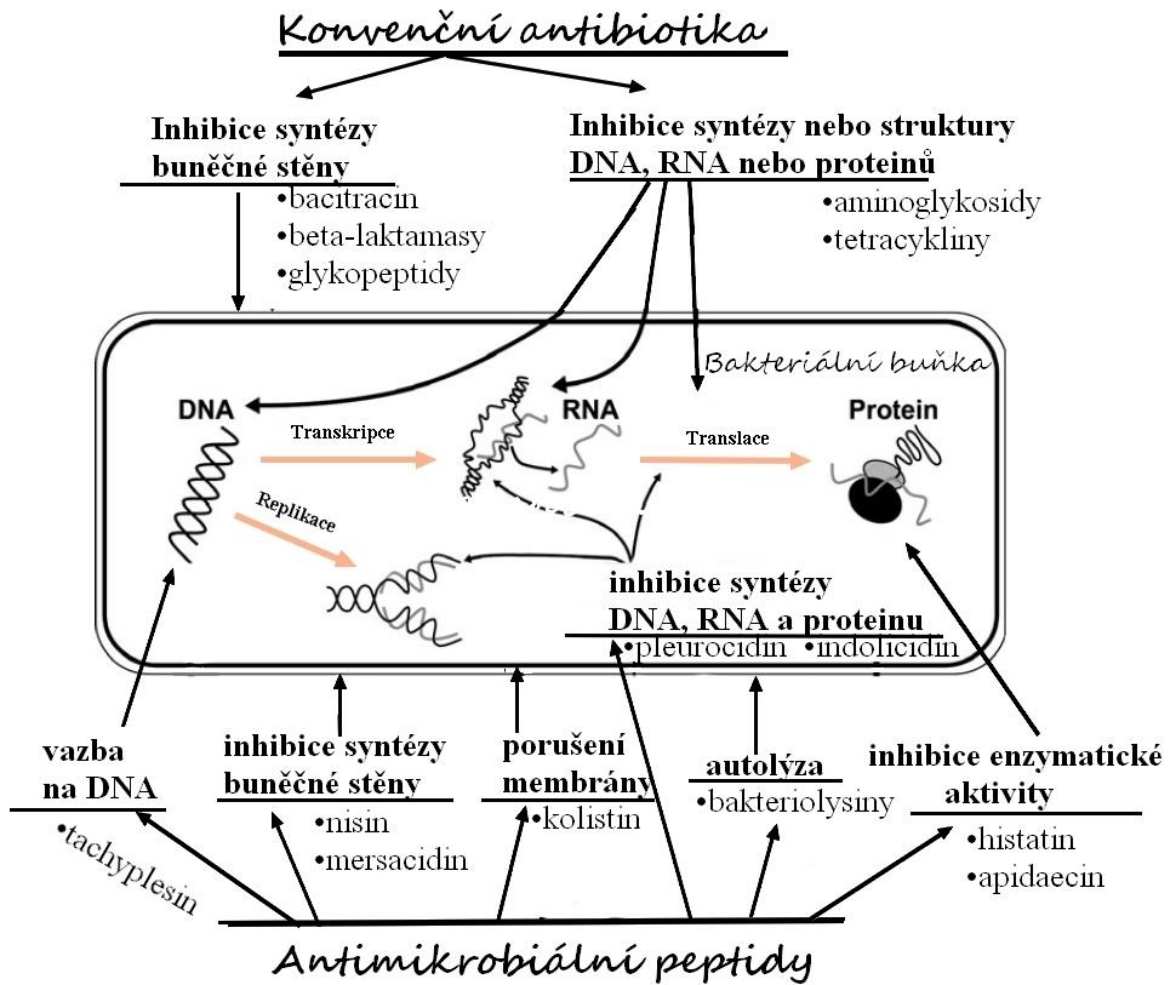
3 Enterokoky – producenti enterocinů

Enterokoky jsou Gram-pozitivní všudypřítomné bakterie, které jsou společně s laktobacily a bifidobakteriemi považovány za tzv. probiotické bakterie. Enterokoky jsou nedílnou součástí potravy a jsou ve velkém množství přítomné v gastrointestinálním traktu lidí i zvířat. Jejich přítomnost není neobvyklá ani v environmentálním prostředí (půda, povrchové vody nebo rostliny). Enterokoky jsou také zodpovědné za charakteristickou vůni a chuť tradičně vyráběných sýrů, kde jsou ve vysokém zastoupení součástí mléčné mikroflóry. Dle některých názorů se enterokoky v minulosti dostaly do sýrů kontaminací organického odpadu, vody nebo zpracovatelského zařízení.

Řada enterokoků je však spojena i s nosokomiálními infekcemi. Tyto infekce se obtížně léčí v důsledku značné rezistence k některým antibiotikům. V některých případech dochází k rezistenci ke všem dostupným a použitelným antibiotikům (Shankar *et al.*, 2004; Mojsova *et al.*, 2015; Gupta and Tiwari, 2015). Naproti tomu většina enterokoků produkujících bakteriociny patří do skupiny, kterou můžeme označovat jako GRAS („*generally recognized as safe*“). Tyto kmeny jsou bezpečné pro použití v potravinářství, někdy jsou dokonce součástí přirozené mikroflóry např. u mléčných výrobků.

Pojem enterociny je souhrnné označení pro bakteriální peptidy (bakteriociny), které jsou produkovány bakteriemi z rodu *Enterococcus*. Enterociny můžeme dělit do několika tříd. V první třídě jsou řazeny enterociny, které jsou post-translačně modifikovány, tzv. lantibiotické peptidy. V třídě druhé pak lineární, nemodifikované enterociny, jejichž molekulová hmotnost je menší než 10 kDa. Do třídy *III.* zahrnujeme cyklické peptidy. Některé z enterocinů jsou jedinečné a nelze je zařadit do žádné z těchto skupin (Gaaloul *et al.*, 2015).

Stejně jako tradiční antibiotika, spousta antimikrobiálních peptidů vykazuje antimikrobiální aktivitu proti bakteriím a plísním. Hlavním mechanismem antimikrobiálního působení bakteriocinů, které pocházejí z bakterií mléčného kvašení je pravděpodobně produkce organických kyselin. Enterokoky však neprodukují tolik organických kyselin jako ostatní zástupci této skupiny, přesto jsou schopné tímto způsobem atakovat konkurenční bakterie. Antimikrobiální působení peptidů je způsobeno hlavně napadáním bakteriální stěny, ve které vznikají póry nebo dochází k inhibici její syntézy (viz obrázek č. 10). Některé bakteriociny mohou dokonce využívat i více mechanismů (Mojsova *et al.*, 2015; Wiley and van der Donk, 2007).



Obrázek č. 10 Antimikrobiální aktivita konvenčních antibiotik a antimikrobiálních peptidů (Upraveno dle Sang and Blecha, 2008)

3.1 Testování produkce a antimikrobiálních účinků enterocinů

Povaha a struktura enterocinů

Proteinová povaha a bakteriocinu je ověřována pomocí trypsinu, který je nanášen na Petriho misky s agarem. Na kultivační médium je naočkován indikátorový kmen a také jedna kolonie enterokoka. Po proběhlé inkubaci je hodnocen vznik inhibiční zóny v blízkosti naočkovaného enterokoka. Pokud je enterocin proteinové povahy, ztratí svoji aktivitu působením trypsinu. Pokud tedy bakteriocin za normální okolností způsobil zónu inhibice v důsledku antimikrobiálního působení na citlivý kmen a po ošetření trypsinem nikoliv, je tím potvrzena proteinová povaha bakteriocinu (Mojsova *et al.*, 2015).

Testování struktury bakteriocinu se provádí po předchozí purifikaci bakteriocinu (např. pomocí chromatografie) a poté je bakteriocin podroben hmotností spektrometrií (MALDI-TOF MS) pro zjištění molekulové hmotnosti. K určení aminokyselinové sekvence je možno použít Edmanovu degradaci. Na základě těchto údajů je možné ověřit, zda se jedná o již známý bakteriocin, či nikoliv (Chen *et al.*, 2013).

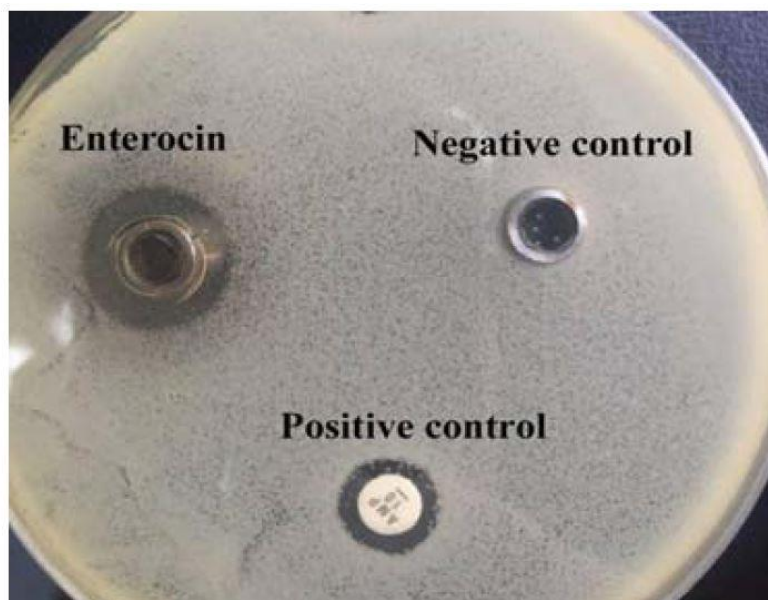
Antimikrobiální aktivita

Detekce antimikrobiální aktivity se provádí pomocí agarové difúzní metody na Petriho miskách s příslušným agarem a naočkovaným testovaným kmenem. Do agaru jsou vytvořeny jamky, do kterých se nanese buněčná suspenze enterokoka nebo purifikovaného enterocinu (popř. se použijí napuštěné disky). Po vhodné inkubační době se hodnotí vznik a následně i průměr inhibičních zón (zóny, kde došlo k omezení růstu testovaného kmene antimikrobiálním působením enterocinu) (Khan *et al.*, 2013).

Jak je patrné z obrázku č. 11 v blízkosti jamky s enterocinem vzniká inhibiční zóna. Enterocin tedy svým antimikrobiálním účinkem zastavuje růst citlivého kmene (v tomto případě je citlivým kmenem *Staphylococcus aureus*). Jako negativní kontrola je použit roztok, ve kterém je bakteriocin rozpuštěn (v tomto případě dimethylsulfoxid). Jako pozitivní kontrola je použit disk napuštěný ampicilinem (Hassan *et al.*, 2017).

Antimikrobiální účinnost, resp. potřebné množství pro účinnost bakteriocinu lze hodnotit také na základě testování v mikrotitrační destičce. Do každé jamky se vnáší potřebné množství média. Do prvních jamek se přidá příslušné množství bakteriální suspenze enterokoka. V dalším kroku se provádí ředění dvojkovou řadou. Poté se do jamek přidá určité množství indikátorového kmene. Destička je následně inkubována za podmínek vhodných pro

nárůst indikátorového kmene v jamkách. Antimikrobiální aktivita je hodnocena právě dle nárůstu či inhibice daného citlivého (indikátorového) kmene. Tento nárůst je zaznamenáván měřením optické hustoty (Sánchez *et al.*, 2008).



Obrázek č. 11 Testování antimikrobiální aktivity enterocinu (Hassan *et al.*, 2017)

Testování stability enterocinu a produkce bakteriocinu za různých podmínek

Odolnost vůči enzymům, pH i teplotě je hodnocena pomocí agarové difúzní metody. Tepelná stabilita je charakteristický rys mnoha bakteriocinů. Vzniká v důsledku stabilních vazeb, přítomností silných hydrofobních oblastí a také vlivem velkého obsahu glycinu. Právě z tohoto důvodu je tepelná stabilita hodnocena. Na Petriho misku s inokulovaným indikátorovým kmenem se nanese jeden kmen enterokoka (popř. purifikovaného bakteriocinu). Enterokok je podroben působení určitého enzymu, pH nebo teploty a nechá se inkubovat při vhodné teplotě pro testovaný kmen. Dle vzniku inhibičních zón, které porovnáváme s kontrolou (bakteriocinem bez ošetření), můžeme usoudit, zda nebyl enterocin vnějšími podmínkami degradován, popř. nedošlo ke snížení jeho antimikrobiální aktivity (Hassan *et al.*, 2015).

Tabulka č. 3 ukazuje zbytkovou antimikrobiální aktivitu hirancinu, který je produkován kmenem *Enterococcus hirae*. V přítomnosti proteinasy K a trypsinu ztratil hirancin svoji aktivitu. Po působení katalasy však zůstala jeho aktivita nezměněna. Bakteriocin je poměrně odolný vůči pH. Antimikrobiální aktivita se začíná snižovat až při

pH 8 po dobu 1 hodiny. Dramatické snížení nastává při působení pH 8 a 9 po dobu 6 hodin. Antimikrobiální aktivita bakteriocinu nebyla ovlivněna ani jednou z testovaných teplot (60 °C po dobu 30 minut a 100 °C po dobu 10 minut) (Sánchez *et al.*, 2008).

Tabulka č. 3 Výsledná antimikrobiální aktivita hirancinu po působení teploty, enzymů a pH u hirancinu (Sánchez *et al.*, 2008)

			Zbytková aktivita			
			HS8	H09	H087	H091
pH / doba působení při pokojové teplotě	2	1 h	+	+	+	+
	2	6 h	+	+	+	+
	4	1 h	+	+	+	+
	4	6 h	+	+	+	+
	6	1 h	+	+	+	+
	6	6 h	+	+	+	+
	8	1 h	+	↓	↓	+
	8	6 h	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	10	1 h	+	↓	↓	+
	10	6 h	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
Teplota/ doba působení	60 °C	30 min	+	+	+	+
	100 °C	10 min	+	+	+	+
Účinná látka (enzymy)	Katalasa		+	+	+	+
	Trypsin		-	-	-	-
	Proteinasa K		-	-	-	-

Legenda: - ztráta antimikrobiální aktivity, ↓↓ výrazné snížení aktivity, ↓ snížení aktivity, + aktivita zachována

Také enterocin T byl vystaven různým teplotám při inkubaci (25 °C, 37 °C a 45 °C), ošetřen enzymy, konkrétně proteasou K, trypsinem a katalasou a podroben vysokým teplotám (80 °C, 90 °C a 121 °C). Jako kontroly byly použity agary bez přidaných enzymů, popř. bez použití nestandardních teplot při inkubaci nebo bez následného zvýšení teploty.

V tabulce č. 4 jsou vypsány velikosti inhibičních zón (průměry), které vznikaly působením enterocinu T za různých podmínek.

Vlivem proteasy K byla antimikrobiální aktivita bakteriocinu zcela inhibována, což je důkazem proteinové povahy bakteriocinu. Naopak trypsin a katalasa ovlivňovali aktivitu jen velmi málo. Bakteriocin lze rovněž označit za tepelně stabilní, vzhledem ke skutečnosti, že si svoji aktivitu zachovává i při působení 121 °C po dobu 15 minut (Chen *et al.*, 2013).

Tabulka č. 4 Velikosti inhibičních zón vzniklé působením různých vnějších podmínek (Chen *et al.*, 2013)

		Průměr inhibiční zóny (mm)
Růstová teplota	25 °C	12
	30 °C	13
	37 °C	12,5
	45 °C	nevzniká
Enzymy	kontrola	12
	proteasa	nevzniká
	trypsin	10
	katalasa	11
Doba působení/teplota	kontrola	11
	30 min /80 °C	10
	30 min /90 °C	9
	15 min /121 °C	9

Testování interakce s membránami

U bakteriocinů je také možné hodnotit, jakým způsobem interagují s membránami bakterií, na které působí svojí antimikrobiální aktivitou. Tyto vlastnosti je možné zjistit pomocí SRP (povrchové plasmonové rezonance).

Při testování interakce enterocinu NKR-5-3B s membránami byly použity 3 typy směsí, které napodobují vlastnosti membrán, konkrétně tedy membránu červených krvinek, membránu Gram-negativních bakterií a membránu bakterií Gram-pozitivních. Dále byla také testována směs extrahovaných lipidů z bakterie *Escherichia coli*. Tímto testováním bylo ověřeno, že největší schopnost vázat se na membránu má enterocin NKR-5-3B vzhledem ke Gram-pozitivním bakteriím. Tato schopnost je dokonce 24x větší než pro membrány červených krvinek a také 5x větší než pro membránu Gram-negativních bakterií a extraktu z lipidů *Escherichia coli*. Tyto výsledky potvrzují fakt, že Gram-pozitivní bakterie, resp. jejich bakteriociny působí převážně na blízké příbuzné durhy, tedy na Gram-pozitivní bakterie (Himeno *et al.*, 2015).

4 „Nové“ enterociny

4.1 Durancin

Durancin je bakteriocin *Ila* třídy, který je produkován druhem *Enterococcus durans*. Jeho struktura obsahuje 43 aminokyselinových zbytků. Durancin nemá žádné geny pro faktory virulence, proto je vhodné producenta tohoto enterocinu použít jako probiotickou kulturu (Du *et al.*, 2012, Ju *et al.*, 2015).

Antimikrobiální a antifungální aktivita

Z testování durancinu vyplývá, že nemá příliš široké antimikrobiální spektrum účinku. Bylo zjištěno, že *Enterococcus durans* má antimikrobiální aktivitu (vytvořil inhibiční zónu) proti *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Weisella minor*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* nebo *Enterococcus faecalis* a dalším, které jsou vypsány v tabulce č. 5. Durancin je naopak neúčinný např. proti *Escheria coli* nebo proti některým laktobacilům, což výrazně přispívá k budoucímu využití tohoto bakteriocinu pro potravinářské účely, kdy by nedocházelo k poškození prospěšné střevní mikroflóry (Yanagida *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2012; Ju *et al.*, 2015).

Hlavní potencionální využití je možné hlavně kvůli antimikrobiálnímu účinku proti listeriím, proti kterým se v současnosti používá bakteriocin nisin, na který mohou být listerie rezistentní. Z tohoto důvodu byla dále zkoumána citlivost *Listeria monocytogenes* na durancin. Výsledky tohoto testování poukazují na 86 % pokles životaschopných bakterií. Optická hustota zůstala totožná ve vzorku s použitím bakteriocinu i kontrole, tedy vzorku s inaktivovaným bakteriocinem. Na základě tohoto výsledku bylo vyhodnoceno, že durancin má sice baktericidní účinky proti bakterii *Listeria monocytogenes*, ale nedochází k buněčné lýze bakterií (Du *et al.*, 2012)

Belguesmia *et al.* (2013) provedli výzkum, ve kterém testují účinky durancinu na plísně a kvasinky (viz tabulka č. 6).

Tabulka č. 5 Inhibiční účinek durancinu na testované kmeny (Yanagida et al., 2005)

Testovaný kmen	Inhibiční účinek durancinu
<i>Lactobacillus sakei ssp. sakei</i>	+
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	+
<i>Lactobacillus plantarium</i>	+
<i>Lactobacillus gasseri</i>	+
<i>Lactobacillus hleveticus</i>	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	–
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i>	slabý
<i>Leuconostoc lactis</i>	+
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	+
<i>Bacillus subtilis</i>	–
<i>Bacillus cereus</i>	–
<i>Styphilococcus aureus</i>	–
<i>Enterococcus faecium</i>	+
<i>Enterococcus durans</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	–
<i>Carnobacterium devergens</i>	+
<i>Weisella paramesenteroides</i>	+
<i>Weisella kandleri</i>	+
<i>Weisella minor</i>	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–

Legenda: + kmen byl inhibován účinky durancinu, – růst kmene nebyl ovlivněn působením durancinu, slabý – účinek durancinu byl slabý

Tabulka č. 6 Fungicidní účinek durancinu (Belguesmia et al., 2013)

Testované plísně a kvasinky	Účinek durancinu
<i>Debaryomyces hansenii</i>	++
<i>Penicilium expansum</i>	++
<i>Fusarium culmorum</i>	++
<i>Candida krusei</i>	+
<i>Penicilium roqueforti</i>	+
<i>Mucor plumbeus</i>	+/-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-
<i>Cladosporium sp.</i>	-

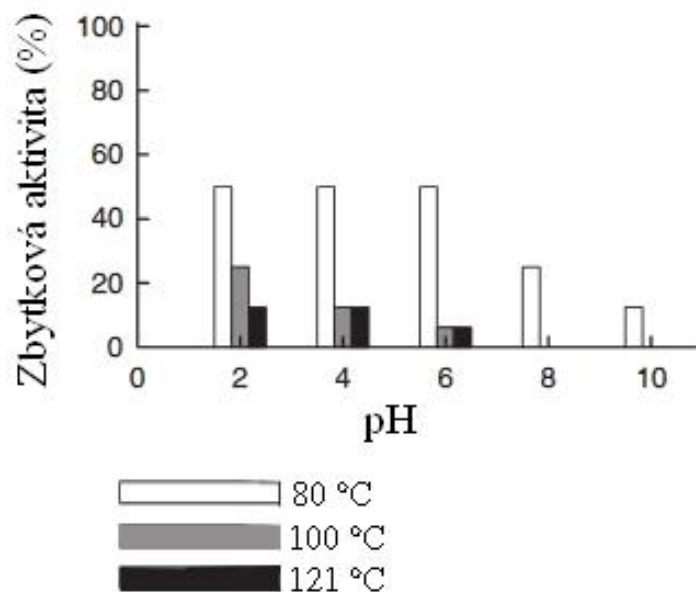
Legenda: – růst testovaného kmene nebyl ovlivněn durancinem, +/- mírně opožděný růst testovaného kmenem, + opožděný růst testovaného kmene, ++ inhibice testovaného kmene

Biochemické vlastnosti

Durancin si svoji aktivitu zachovává i po autoklávování při 121 °C po dobu 15 minut, po působení stejné teploty po dobu 17 min bakteriocin svoji antimikrobiální aktivitu zcela ztrácí.

Testování citlivosti na enzymy (pepsin, proteinasy K, trypsin) bylo provedeno pomocí agarů s naočkovanou bakterií *Listeria innocua*. Na agar byl přidán kmen produkující bakteriocin společně s enzymem. Po působení proteinasy K a trypsinu bakteriocin svoji antibakteriální aktivitu úplně ztratil, což potvrzuje proteinovou povahu bakteriocinu. Aktivita působením pepsinu nebyla ovlivněna (Du et al., 2012).

Antimikrobiální aktivita bakteriocinu byla stabilnější v kyselých pufrách než v pufrách alkalických. V kyselém prostředí odolává lépe i tepelným podmínkám. Po ošetření 80 °C po dobu 15 minut při hodnotách pH 2-6 byla pozorována 50% zbytková antimikrobiální aktivita. Pouze 25 % zbytkové aktivity zůstalo při působení stejné teploty při pH 8. Při pH 10 pak antimikrobiální aktivita klesla na pouhých 12 % původní aktivity (viz obrázek č. 12) (Hu et al., 2008).



Obrázek č. 12 Zbytková antimikrobiální aktivita durancinu po působení různého pH a různých teplot (Hu et al., 2008)

Konkrétní výzkumy

Yanagida *et al.* (2005) izolovali z 87 vzorků půdy, které byly odebrány v Japonsku v rhizosféře stromů v hloubce 5-10 cm, 34 bakterií produkujících kyseliny. U těchto bakterií byl zjišťován antibakteriální účinek. Kmen, který produkoval bakteriocin a vykazoval antimikrobiální aktivitu proti Gram-pozitivním bakteriím byl identifikován pomocí sekvenční analýzy jako *Enterococcus durans* L28-1.

Hu *et al.* (2008) izolovali kmen *Enterococcus durans* QU 49 z mrkve z něj následně durancin TW-49M. Touto studií byla zjištěna sekvence durancinu, která má výrazné homologie s bakteriocinem 31 a carnobacteriocinem A. Konkrétně se jedná o část aminokyselinové sekvence: L-S-K-G-G-A-K-C. Tento úsek nalézáme ve střední části sekvence, která spojuje hydrofilní N-konec a hydrofobní C-konec. Další zajímavostí, která byla zjištěna při této studii je, že disulfidická vazby v struktuře durancinu není rozhodující pro antimikrobiální aktivitu, ale pouze pro stabilitu aktivity.

Další testování durancinu provedli Du *et al.* (2012) konkrétně byl identifikován kmen *Enterococcus durans* 41D, který byl izolován ze sýru. Dále se zabývali genetickými determinantami odpovědnými za produkci durancinu GL. Bylo zjištěno, že durancin je tvořen na *pDGL1*, plasmidu o velikosti 8 kb.

4.2 Hirancin

Hirancin je bakteriocin produkovaný *Enterococcus hirae* nebo *Enterococcus faecium*. V minulosti byl tento bakteriocin izolován z obsahu střev divokých kachen. Hirancinový prepeptid obsahuje 74 aminokyselinových zbytků, zralý bakteriocin obsahuje aminokyselinových zbytků pouze 44. Jeho molekulová hmotnost činí 5,1 kDa. Dle jeho velikosti a stability jej můžeme řadit do *Iia* skupiny bakteriocinů. Dříve byl hirancin označen jako enterocin T8 (Sánchez *et al.*, 2008; Hassan *et al.*, 2015).

Antimikrobiální aktivita

Izolované kmeny *Enterococcus* byly testovány na produkci bakteriocinu a jeho antimikrobiální aktivity např. proti *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus sakei* ale i proti mikroorganismům z rodu *Enterococcus* (*Enterococcus faecium* a *Enterococcus hirae*). Stejně jako zástupci *Iia* skupiny bakteriocinů vykazuje hirancin antimikrobiální aktivitu proti *Listeria monocytogenes*, *E. faecalis* a *E. hirae* (Hassan *et al.*, 2015; De Kwaadsteniet *et al.*, 2006)

Biochemické vlastnosti

Bakteriocin je inaktivován proteolytickými enzymy (pepsinem, proteasou K), nikoliv amylasou. To naznačuje, že peptid není glykosylován nebo jeho aktivita není ovlivněna glykosylací. Stabilní zůstává bakteriocin i při působení 100 °C, ale pouze po dobu 10 minut. Po delším působení teploty 100 °C antimikrobiální aktivitu ztrácí, tuto aktivitu ztrácí také při pH 2 a 12 (viz tabulka č. 7) (De Kwaadsteniet *et al.*, 2006).

Tabulka č. 7 Aktivita hirancinu po působení vnějších podmínek (De Kwaadsteniet et al., 2006)

		Antimikrobiální aktivita
Enzymy	amylasa	+
	pepsin	-
	proteasa K	-
pH	2	-
	4	+
	6	+
	8	+
	10	+
	12	-
Teplota / doba působení	30 °C / 90 min	+
	60 °C / 90 min	+
	100 °C / 10 min	+
	100 °C / 90 min	-

Legenda: + antimikrobiální aktivita zachována, - antimikrobiální aktivita ztracena

Konkrétní výzkumy

Kwaadstenie *et al.* (2006) izolovali kmen *Enterococcus faecium* T8 a z něj bakteriocin T8 (hirancin) z vaginálních sekretů dětí nakažených HIV.

Hassan *et al.* (2015) testovali 170 vzorků krve, které byly odebrané v rámci pravidelných diagnostických a léčebných postupů u hospitalizovaných pacientů a byly fenotypově klasifikovány jako *Enterococcus* ssp. Z těchto kmenů byl následně hirancin izolován.

4.3 Enterolysin A

Enterolysin A je termolabilní bakteriocin, který byl poprvé popsán jako produkt kmene *Enterococcus faecalis* LMG2333 izolovaného z islanských ryb v roce 2003. Bakteriocin byl dále objeven i u kmenů *E. faecalis* DPC5280 (izolát z mléka), *E. faecalis* II/1, *Streptococcus bovis* (izolát z hovězího), *E. faecalis* B9510 (izolát ze siláže) a dalších.

Enterolysin A je protein o molekulové hmotnosti 34,5 kDa, patřící do skupiny endopeptidas. Endopeptidasy řadíme do skupiny bakteriocinů, které označujeme jako bakteriolyliny. Enterolysin A obsahuje ve své sekvenci 316 aminokyselinových zbytků (Khan *et al.*, 2013; Nilsen *et al.*, 2003).

Antimikrobiální aktivita

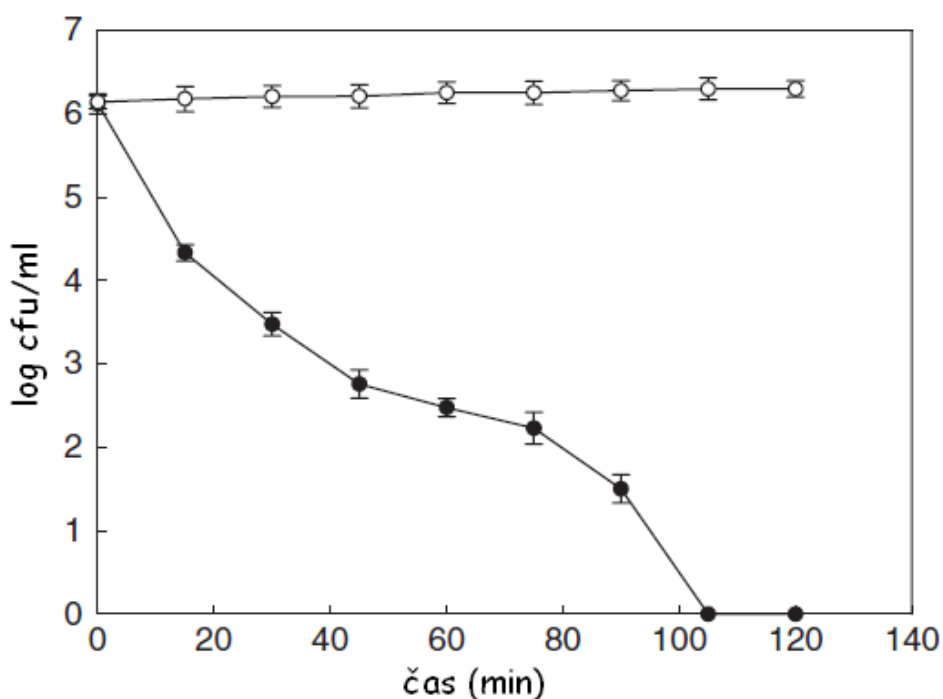
Antimikrobiální účinnost bakteriocinu tohoto byla testována na řadu mikroorganismů. Mimo ty bakterie, které jsou uvedené v tabulce č. 8, byly na bakteriocin citlivé *Enterococcus durans*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus sakei* a další (Nigutova *et al.*, 2007). Také byla ověřena antibakteriální účinnost bakteriocinu proti kmenům *Staphylococcus aureus* nebo *Listeria monocytogenes*, ale tato aktivita byla nižší než u ostatních bakteriocinů bakterií mléčného kvašení (Khan *et al.*, 2013).

Tabulka č. 8 Antimikrobiální účinky *Enterococcus faecalis* a purifikovaného enterolysinu A (Hickey *et al.*, 2003)

Testovaný kmen	Antimikrobiální účinky	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	purifikovaného enterolysinu A
<i>Enterococcus faecalis</i>	++	+
<i>Lactococcus lactis</i>	+++	+++
<i>Lactobacillus fermenticum</i>	++	++
<i>Pediococcus pentasaceus</i>	++	++
<i>Listeria innocua</i>	++	++
<i>Micrococcus luteus</i>	++	–

Legenda: – žádná inhibiční zóna, + průměr inhibiční zóny do 5 mm, ++ průměr inhibiční zóny do 5-10 mm, +++ průměr inhibiční zóny > 10 mm

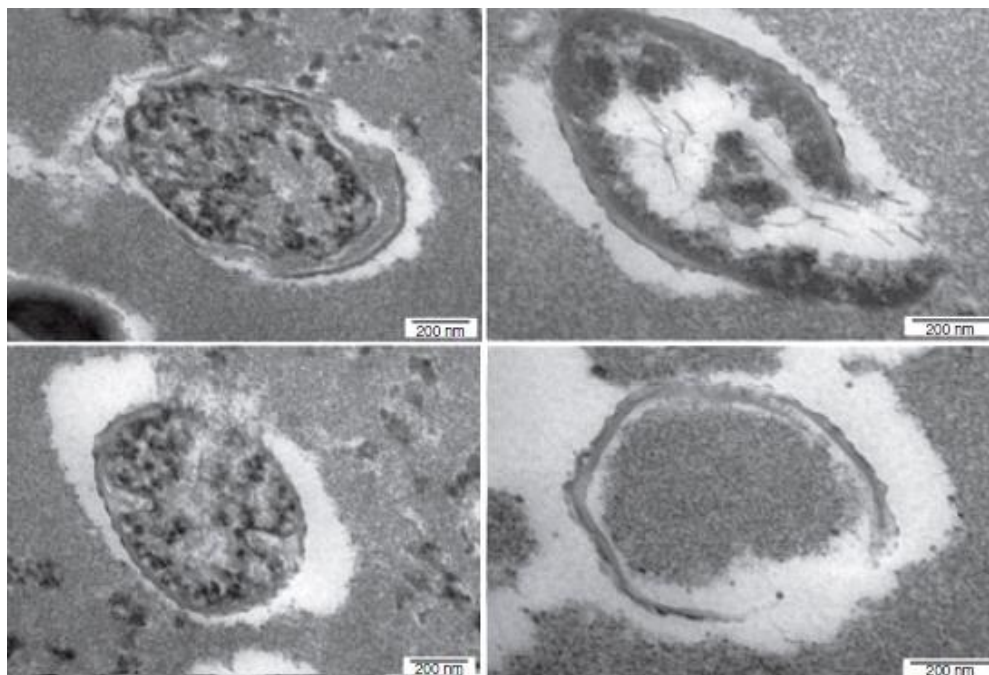
K měření lytické aktivity enterolysinu A byl použit *Lactococcus lactis ssp cremoris*, který byl inokulován do kultivačního média, do kterého byl přidán purifikovaný enterolysin A. Po proběhlé inkubaci takto připraveného média při 30 °C byla měřena v pravidelných intervalech optická hustota. Po ošetření enterolysinem A nastal rychlý pokles zakalení suspenze (roztoku testovaného kmene *Lactococcus lactis* a pufru). Současně nastal rychlý úbytek životaschopných bakterií. Pokles pod hladinu detekovatelnosti (<10 CFU/ml) nastal během dvou hodin. Množství bakterií v kontrole, která nebyla ošetřena bakteriocinem, zůstal prakticky totožný jako na začátku testu (viz obrázek č. 13).



Obrázek č. 13 Účinek enterolysinu A na kmen *Lactococcus lactis ssp. cremoris*
(Upraveno dle Khan et al., 2013)

Legenda: ○ kontrola (neošetřený kmen enterolysinem A), • kmen ošetřených enterolysinem A

Kromě měření byly v pravidelných intervalech také odebírány vzorky pro vizualizaci poškozených buněk po ošetření enterolysinem A, pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Jak je patrné z obrázku č. 14, získaného z TEM, působením enterolysinu A dochází k destrukci buněčné stěny citlivé buňky (v tomto případě testovaného kmene *Lactococcus lactis ssp. cremoris*). Zpočátku pozorujeme jen roztržení buněčné stěny s tmavými komponenty uvnitř, později dochází k vytlačování cytoplazmatické membrány a vylití obsahu buňky (Khan et al., 2013)



Obrázek č. 14 Narušení buňky *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* působením Enterolysinu A (Upraveno dle Khan *et al.*, 2013)

Biochemické vlastnosti

Pro testování tepelné stability byl bakteriocin vystaven teplotě 50, 75 a 100 °C po dobu 15 minut. Při teplotě 50 °C nebyla aktivita vůbec ovlivněna, ale při teplotách 75 °C a 100 °C došlo ke snížení aktivity na pouhé 2 % původní hodnoty (Nilsen *et al.*, 2003).

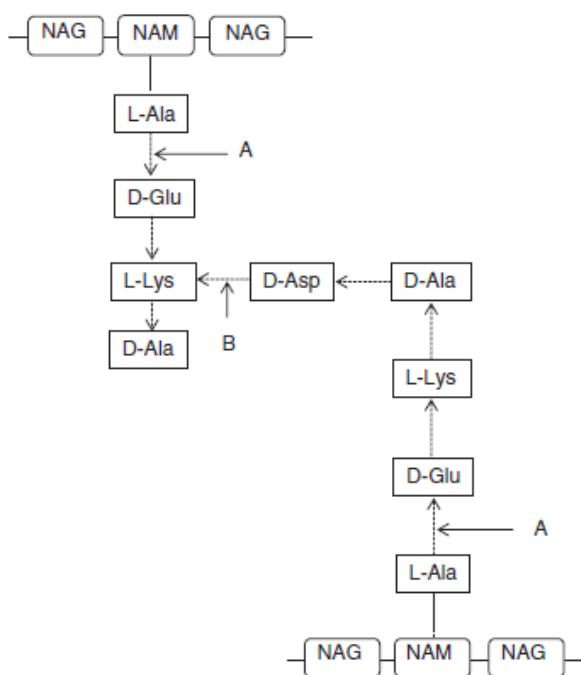
Konkrétní výzkumy

Z přechozích studií bylo známo, že enterolysin A usmrcuje citlivé buňky tím, že způsobuje lýzu buněčných stěn. Bylo také popsáno, že endopeptidasy (skupina, do které enterolysin A řadíme) štěpí vazbu v peptidové části peptidoglykanové podjednotky bakteriální stěny. Přesné místo štěpení, ale nebylo známo. Bylo pouze předpokládáno, že po ošetření enterolysinem A dojde k uvolnění N-koncových a C-koncových aminokyselin z místa, kde dochází ke štěpení peptidoglykanové části buněčné stěny. (Khan *et al.*, 2013).

Khan *et al.* (2013) testovali právě tuto schopnost štěpení buněčné stěny enterolysinem A. Vyčištěné buněčné stěny tří citlivých kmenů k enterolysinu A (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) byly štěpeny právě tímto enterocinem. Uvolněné aminokyseliny z tohoto štěpení byly derivatizovány. Vedle vzorků byly také použity aminokyseliny, přítomné v buněčné stěně bakterií mléčného kvašení (lysin, alanin, glutamová kyselina, threonin a glycin), pro derivatizaci N- a C-konce a následně byly použity jako

referenční standarty. Výsledky těchto derivatizovaných N-koncových vzorků prokázaly přítomnost lysinu a kyseliny glutamové. Výsledky C-koncových derivátů ukázaly přítomnost kyseliny asparagové a alaninu.

Po působení bakteriocinu byly C- a N-konce uvolněny. Testováním bylo prokázáno, že enterolysin A štěpí vazbu ve dvou místech. První štěpení je mezi L-alaninem a D-glutamovou kyselinou kmenového peptidu a druhé mezi L-lysinem kmenového peptidu a D-asparagovou kyselinou mezipeptidového můstku, jak je patrné z obrázku č. 15.



Obrázek č. 15 Schéma štěpení buněčné stěny působením enterolysinu A (Khan et al., 2013)

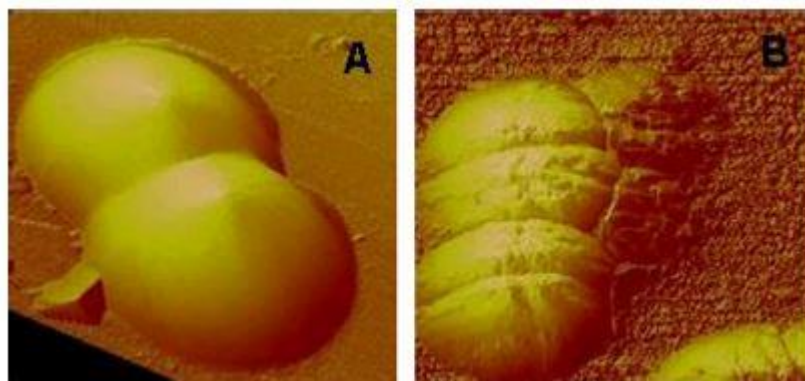
Legenda: NAG – A-acetylglukosamin, NAM – N-acetylmuramová kyselina)

4.4 Bakteriocin ST4SA

Bakteriocin ST4SA je bakteriocin *Ila třídy* produkovaný kmenem *Enterococcus mundtii* ST4SA, který lze izolovat se sójových bobů. Jeho sekvence obsahu 43 aminokyselinových zbytků a molekulová hmotnost je 3,950 kDa (Granger *et al.*, 2008; Knoetze *et al.*, 2008).

Antibakteriální vlastnosti

Při nízké koncentraci bakteriocinu dochází k vytvoření pórů a úniku malých molekul (enzymů) z buňky. Vyšší koncentrace vedou k okamžitému úniku intracelulární makromolekul. Ošetřením kmene *Enterococcus faecium* bakteriocinem ST4SA po dobu 1 hodiny vede ke změně buněčné struktury a dochází zde k úniku intracelulárních složek, jak je patrné na obrázku č. 16. Přidáním bakteriocinu ST4SA k *Streptococcus pneumoniae*, izolátu ze středního ucha, vedlo k rychlému poklesu množství buněk. Další testované kmeny i s průměry inhibičních zón vzniklých působením tohoto enterocinu jsou vypsány v tabulce č. 9 (Knoetze *et al.*, 2008).



Obrázek č. 16 *Enterococcus faecium* bez ošetření bakteriocinem ST4SA (A), po 1 hodině po ošetření bakteriocinem ST4SA (B) (Knoetze *et al.*, 2008)

Tabulka č. 9 Průměry inhibičních zón vzniklé u testovaných kmenů vlivem bakteriocinu ST4SA
(Upraveno dle Knoetze et al., 2008)

Testovaný kmen	Průměr inhibiční zóny
<i>Acinetobacteri baumannii</i> 16	+
<i>Acinetobacteri baumannii</i> 19	–
<i>Enterococcus faecalis</i>	+++
<i>Enterococcus faecium</i>	++++
<i>Haemophilus influenza</i>	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> 13	–

Legenda: – bez inhibiční zóny, + průměr inhibiční zóny, 1-11mm,
+++ průměr inhibiční zóny 17-21 mm, ++++ průměr inhibiční zóny <22 mm

Biochemické vlastnosti

Kmen *Enterococcus mundii* ST4SA byl testován z hlediska stability v gastrointestinálním traktu. Kmen přežívá průchod žaludkem, tedy je stabilní i při pH 2,5 a může produkovat nižší hladiny bakteriocinu (při pH 2 dochází k poklesu produkce bakteriocinu o 25%). Růst je stimulován v tenkém střevě (pH 3,5) a i v tlustém střevě (pH 5,5). Kmen, který se nachází v tlustém střevě adhezuje k epiteliárním buňkám, dochází zde k růstu buněk a k produkci bakteriocinu.

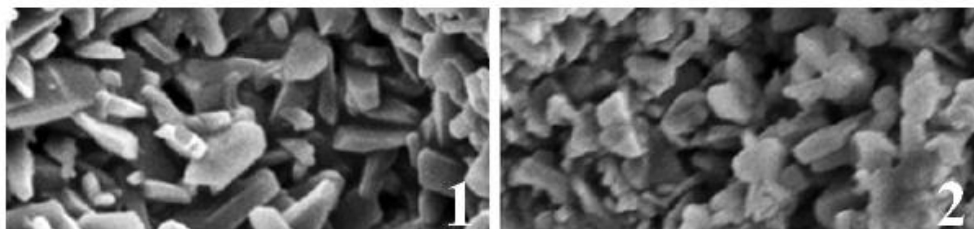
Stabilita bakteriocinu ST4SA v trávicím traktu zůstává tedy téměř nezměněna a bakteriocin je dále produkován příslušným kmenem i v přítomnosti pankreatické šťávy. Pokud ale zvýšíme koncentraci této šťávy, dochází k zastavení tvorby prepeptidu bakteriocinu a následně je ztracena i antibakteriální aktivita zralého bakteriocinu. Ztráta antimikrobiální aktivity naznačuje, že bakteriocin ST4SA je degradován trypsinogenem, chymotrypsinogenem nebo karboxypeptidasou nebo vysokou koncentrací hydrogenuhličitanových iontů. Růst *Enterococcus mundtii* ST4SA je potlačen i za přítomnosti žluči po dobu prvních 6 hodin. Po této době však dochází opět k produkci bakteriocinu (Granger et al., 2008; Dicks et al., 2010).

Konkrétní výzkumy

Studie Staden *et al.* (2011) popisuje přidání bakteriocinu ST4SA do kostního cementu na bázi ortofosfátu vápenatého. Uvádí také, jak rychle se bakteriocinu uvolňuje a další vlastnosti tohoto bakteriocinu.

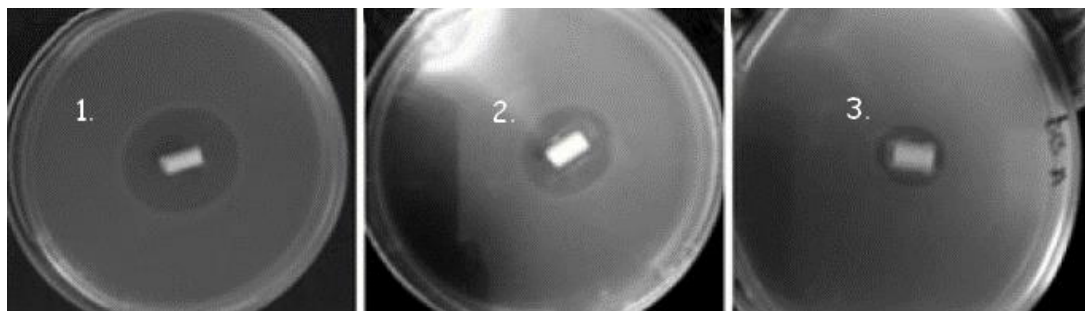
Zvýšením počtu bakterií, které jsou rezistentní na antibiotika, zejména MRSA kmeny, výrazně snížilo množství použitelných antibiotik pro kraniofaciální chirurgii, kde jsou antibiotika užívána především pro prevenci před pooperačními infekcemi. Některá antibiotika podávaná intravenózně nebo perorálně nejsou vždy účinná, protože v oblastech implantátu nedochází k dostatečnému prokrvení. V minulosti byla již snaha o zabudování ATB přímo do kostního cementu. Tento průzkum provedl kolektiv autorů před několika lety (Thornes *et al.*, 2002). Pozorovali pokles infekce způsobené *Streptococcus epidermis*, pokud byl do implantátu začleněn gentamicin. To však způsobilo, že výrazně vzrostla rezistence na gentamicin u streptokoků, a to z pouhých 19 % na 78 %. Z těchto důvodů je snaha omezit použití antibiotik a nahradit je bakteriociny, které by zabránily infekcím.

Vzorky kostního cementu, který se používá v kraniofaciální chirurgii, obsahující bakteriocin ST4SA a také vzorky bez tohoto bakteriocinu byly pozorovány ve skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM) a vykazovaly podobné struktury (viz obrázek č. 17). Přidáním enterocinu tedy nedochází k velké změně struktury ani vlastností kostního cementu.



Obrázek č. 17 Kostní cement bez přidání bakteriocinu ST4SA (1), po přidání bakteriocinu ST4SA (2)
(Staden *et al.*, 2011)

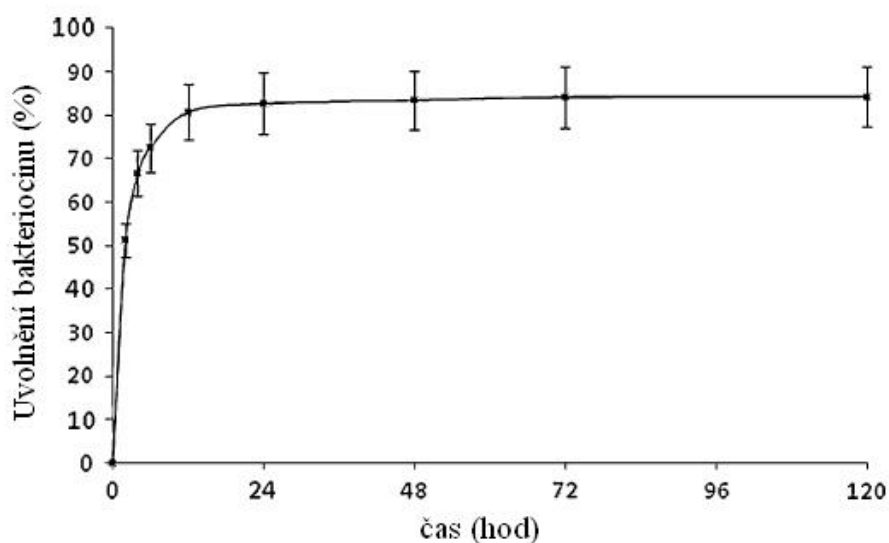
V separovaném testu byly části kostního cementu s bakteriocinem ST4SA vloženy do agarů na Petriho miskách s naočkovanou bakterií *Listeria monocytogenes*. Petriho misky byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C. Výsledná aktivita bakteriocinu byla hodnocena dle vzniku inhibičních zón v blízkosti cementových částí. Na základě tohoto testu bylo zjištěno, že bakteriocin ST4SA inhiboval růst indikátorového kmene *Listeria monocytogenes* po dobu až 13 dnů, jak je patrné z obrázku č. 18.



Obrázek č. 18 Vznik inhibičních zón v důsledku produkce bakteriocinu ST4SA den první (1.), den osmý (2), den třináctý (3.) (Upraveno dle Staden *et al.*, 2011)

Pro další testování byly použity části kostního cementu smíchaného s bakteriocinem v pufru. Ve vybraných časových intervalech byl celý objem pufru odebrán a centrifugován, kvůli odstranění nerozpuštěných částic. Použitím kolorimetrické metody byla stanovena koncentrace bílkovin v pufru a díky tomu bylo možné zjistit množství uvolněného bakteriocinu. Extrahovaný pufr byl nahrazen čerstvým pufrům a části kostního cementu byly inkubovány až do dalšího měření. Tímto testováním bylo zjištěno, že většina bakteriocinu se z kostního cementu uvolňuje v prvních 12 hodinách. Po 120 hodinách však byl bakteriocin stále aktivní, tedy potlačil růst *Listeria monocytogenes*. Uvolňování proteinu z kostního cementu bylo vyjádřeno jako procento původního obsahu bílkovin přítomného ve vzorku, což graficky zobrazuje obrázek č. 19.

Tato charakteristika potvrzuje možnost užití bakteriocinu jako antimikrobiálního aditiva do kostního cementu (Staden *et al.*, 2011).



Obrázek č. 19 Uvolňování bakteriocinu z kostního cementu vzhledem k původnímu množství proteinu (Upraveno dle Staden *et al.*, 2011)

4.5 Enterocin P

Enterocin P je bakteriocin třídy *Ila*. V minulosti byl již syntetizován z kmene *Enterococcus faecium* P13, z této studie vyplývá, že jeho biosyntéza začíná u propeptidu, jehož struktura je tvořena 71 aminokyselinami. Po štěpení obsahuje zralý enterocin pouze 44 aminokyselin. Optimální podmínky pro produkci bakteriocinu jsou při 16-45 °C a pH 2-11. Získání purifikovaného bakteriocinu podléhá několika složitým krokům čištění, proto je testována možnost klonování a exprese enterocinu P v bakterii *Escherichia coli*, čímž dochází k odstranění několika kroků purifikace a k získání čistého enterocinu stačí pouze jediný krok. Díky svým vlastnostem, by se *Enterococcus faecium* mohl stát potencionálním kandidátem jako protektivní pomocná kultura při ochraně potravin, nebo by mohl být použit jako probiotická kultura (Gutiérrez *et al.*, 2006; Cuzzo *et al.*, 2006; Braňek *et al.*, 2017).

Antimikrobiální aktivita

Detekce antimikrobiální aktivity byla provedena pomocí agarového difúzního testu. Do jamek v agaru, který byl naočkován testovaným kmenem, byl vložen bakteriocinový supernatant. Následovala inkubace při vhodné teplotě pro mikroorganismus po dobu 24 hodin. Stejným způsobem byl testován i antimykotický účinek. Bakteriocinový supernatant byl umístěn do jamek vytvořených v agaru naočkováným různými plísněmi s následnou inkubací, tentokrát ale po dobu 72 hodin při 25 °C. Po inkubaci byla hodnocena přítomnost inhibičních zón kolem jamek. Přítomnost inhibičních zón nejméně 2 mm naznačovala pozitivní výsledek, tedy zastavení růstu citlivého mikroorganismu vlivem produkce bakteriocinu.

Tímto testováním bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivita bakteriocinu působí např. proti *Bacillus subtilis*, *Brochothrix thermosphacta*, listeriím a dalším bakteriím. Enterocin P je naopak naprosto neúčinný proti *Bacillus cereus*, *Leuconostoc mesenterodes* nebo *Staphylococcus aureus*. Další testované bakterie i plísně jsou vypsány v tabulce č. 10, společně s průměrem inhibičních zón vzniklých vlivem enterocinu P.

Při podrobnějším testování antimikrobiálních vlastností tohoto enterocinu proti *Listeria monocytogenes* a *Lactococcus garvieae* došlo přidáním bakteriocinové suspenze k výraznému snížení životaschopných buněk. Snížení počtu buněk bylo navíc doprovázeno snížením optické hustoty. Z toho tedy lze usuzovat, že během antimikrobiálního účinku bakteriocinu dochází také k lýze buněk (Braňek *et al.*, 2017; Achemchem *et al.*, 2012).

Tabulka č. 10 Antimikrobiální aktivita enterocinu P (Braňek et al., 2017)

	Kmen	Průměr inhibičních zón
Gram-pozitivní bakterie	<i>Enterococcus faecium</i>	+++
	<i>Enterococcus faecalis</i>	++
	<i>Enterococcus durans</i>	+
	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	++
	<i>Lactococcus garvieae</i>	+++
	<i>Lactobacillus brevis</i>	++
	<i>Lactobacillus bulgarius</i>	–
	<i>Micrococcus luteus</i>	–
	<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	–
	<i>Staphylococcus aureus</i>	–
	<i>Listeria ivanovii</i>	+
	<i>Listeria monocytogenes</i>	++
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+++
Gram-negativní bakterie	<i>Escherichia coli</i>	–
	<i>Salmonella enterica</i>	–
	<i>Salmonella typhimurium</i>	–
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–
Plísně	<i>Aspergillus flavus</i> A1	++
	<i>Aspergillus niger</i> A79	++
	<i>Fusarium equiseti</i> F6	++
	<i>Fusarium verticillioides</i> F99	++

Legenda: – bez inhibiční zóny, + průměr inhibiční zóny <6 mm,
 ++ průměr inhibiční zóny 6-12 mm, +++ průměr inhibiční zóny >12 mm

Pro enterocin P byly také hodnoceny MIC (minimální inhibiční koncentrace). Jak je patrné z tabulky č. 11 minimální inhibiční koncentrace tohoto bakteriocinu se liší v závislosti od použitého kmene. MIC se mohou pohybovat v širokém rozmezí od 1-559 ng/ml (Cintas *et al.*, 1997)

Tabulka č. 11 Minimální inhibiční koncentrace enterocinu P v závislosti na použitém indikátorovém kmeni (Cintas *et al.*, 1997)

Indikátorový kmen	MIC (ng/ml)
<i>Clostridium botulinum</i>	259
<i>Clostridium perfringens</i>	4
<i>Clostridium sporogenes</i>	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	238
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	559
<i>Enterococcus faecium</i>	2
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1
<i>Listeria innocua</i>	395
<i>Staphylococcus carnosus</i>	139
<i>Lactobacillus sakei</i>	144

Biochemické vlastnosti

Bakteriocinové supernatanty byly podrobeny působení různých podmínek prostředí a zbytková antimikrobiální aktivita bakteriocinu byla testována agarovou difúzní metodou pomocí indikátorového kmene *Lactococcus garvieae*. Antibakteriální aktivita enterocinu P nebyla změněna zahříváním na 60 °C po dobu 30 minut ani při působení 100 °C po dobu 15 minut. Po autoklávování při 121 °C byl však antimikrobiální aktivita kompletně ztracena. Enterocin P byl odolný v téměř celém rozmezí pH 2-10. Antimikrobiální aktivita byla ztracena až při hodnotách pH vyšších než 10. Působením dvou proteolytických enzymů (proteasy K a trypsinu) došlo k inaktivaci antimikrobiálních účinků, což potvrzuje proteinovou povahu tohoto bakteriocinu (Braňek *et al.*, 2017).

Výzkumy enterocinu

V roce 1997 byl izolován kmen *Enterococcus faecium* P13 z fermentovaných klobás. Z tohoto kmene byl enterocin P poprvé izolován (Cintas *et al.*, 1997).

Achemchem *et al.* (2012) izolovali enterokoka z marockého kozího mléka, kvůli jeho vysoké antagonistické aktivitě proti listeriím. Později byl tento kmen klasifikován jako *Enterococcus hirae*.

Braïek *et al.* (2017) testovali přítomnost bakterií mléčného kvašení ve vzorcích krevet, které byly po 10 měsících shromažďovány z maloobchodních trhů v regionech Tuniska. Tento průzkum vedl k izolaci a prostudování kmene *Enterococcus lactis* a jeho bakteriocinu enterocinu P.

4.6 Enterocin LD3

Gupta and Tiwari (2015) ve svém výzkumu objevili zcela nový bakteriocin, který je produkován *Enterococcus hirae* LD3, což bylo potvrzeno i dalším testováním v roce 2016, kdy byla testována molekulová hmotnost a N-koncová sekvence. Určení přesné molekulové hmotnosti nebylo možné, bylo možné pouze odhadnout, že se pohybuje v rozmezí 3,4-87,6 kDa.

Dále bylo zjištěno, že enterocin způsobuje tvorbu pórů v membráně, protože dochází k rozrušení membránového potenciálu a efluxu ATP. Vlastnosti enterocinu LD3 umožňují jeho použití jako bio-konzervační prostředek nebo jako alternativní produkt ke klinickým antibiotikům (Gupta *et al.*, 2016).

Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita byla stanovena pomocí agarové difúzní metody. Jako indikátorový kmen byl použit *Micrococcus luteus*, kterým byl naočkován na agar. Do tohoto agaru byly vytvořeny jamky, které byly naplněny testovaným bakteriocinem. Po inkubaci 24 hodin byly vytvořeny inkubační zóny, které byly hodnoceny.

Antimikrobiální aktivita zabraňuje růstu jak Gram-pozitivních, tak i Gram-negativních bakterií. Konkrétně byl testován kmeny jako *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas fluorescens*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio sp.*, a *Escherichia coli*. Všechny tyto uvedené bakterie byly na bakteriocin citlivé.

Výsledky sledování antimikrobiální účinků čistého bakteriocinu pomocí kmene *Micrococcus luteus* ukazují, že přidáním bakteriocinu do roztoku indikátorového kmene nastává výrazné snížení životaschopnosti buněk. Usmrcování buněk nastává po 1 hodině při teplotě 37 °C. Do 8 hodin byla zaznamenána 40% ztráta životaschopných buněk ve srovnání s kontrolou (Gupta *et al.*, 2016; Gupta and Tiwari, 2015).

Biochemické vlastnosti

Pro testování tepelné stability byl vzorek zahříván na 80 a 100 °C po dobu 15 minut ve vodní lázni a také byl autoklávován při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Zbytková antimikrobiální aktivita ošetřených vzorků teplotou byla srovnána s kontrolou kultivovanou

při 37 °C. Žádná z inkubačních teplot 80, 100 ani 121 °C působících po dobu 15 minut neovlivnila antimikrobiální aktivitu bakteriocinu, tedy jedná se o velmi tepelně stabilní bakteriocin.

Čisté bakteriocinové preparáty kmene *Enterococcus hirae* LD3 byly testovány na antimikrobiální aktivitu bakteriocinu při různých hodnotách pH. Bakteriocinové preparáty kmene *Enterococcus hirae* LD3 byly aktivní při pH 2-6, ale svoji antimikrobiální aktivitu si zachovali pouze v rozmezí pH 2-4. Při pH 6 byla antimikrobiální aktivita snížena na 92 %. Úplná ztráta aktivity nastala při pH 7-10. Kontrola nevykazovala žádnou inhibici růstu.

Bakteriocin byl dále ošetřen i enzymy pro určení chemické struktury. Jednalo se o katalasu, amylasu a lipasu, pepsin, trypsin, proteasu K a papain. Antimikrobiální aktivita byla snížena všemi enzymy, kromě amylasy a lipázy, což potvrzuje proteinovou povahu bakteriocinu.

Stabilita byla ověřena také po ošetření různými organickými rozpouštědly, povrchově aktivními látkami a jinými prostředky (aceton, ethanol, močovina). Antimikrobiální aktivita po ošetření těmito přípravky zůstala stejná, jako u bakteriocinu, který přípravky ošetřen nebyl (Gupta *et al.*, 2016; Gupta and Tiwari, 2015).

4.7 Enterocin TW21

Kmen produkující enterocin TW21 je *Enterococcus faecium* D081821. Tento kmen byl izolovaný z tradičních fermentovaných dochi (černých fazolí) kolektivem Chen *et al.* (2007). V této studii byla ověřena antimikrobiální aktivita proti bakteriím *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Clostridium perfringens*, *Sporolactobacillus kofuensis* a dalším. Dále bylo zjištěno, že bakteriocin je kompletně inaktivován pomocí proteinasy K, trypsinu i pepsinu. Chang *et al.* (2013) získaly aminokyselinovou sekvenci N-koncové části: Y-Y-G-N-G-V-x-C. Díky této sekvenci a silným antilisteriální vlastnostem můžeme tento bakteriocin řadit do *Ila* třídy bakteriocinů. Enterocin TW21 je ve své sekvenci velmi podobný durancinu a hiracinu, jejichž struktury jsou na obrázku č. 20. Totožné úseky s enterocinem TW21 jsou vyznačeny šedou barvou.

- enterocin TW21

A-T-Y-Y-G-N-G-V-Y-C-N-T-Q-K-C-W-V-D-W-S-R-A-R-S-E-I-V-D-R-G-V-K-A-Y-V-N-G-F-T-K-V-L-G-G-V-G-G-R

- hiracin JM79

A-T-Y-Y-G-N-G-L-Y-C-N-K-E-K-C-W-V-D-W-N-Q-A-K-G-E-I-G-K-I-I-V-N-G-W-V-N-H-G-P-W-A-P-R-R

- durancin GL

A-T-Y-Y-G-N-G-V-Y-C-N-K-Q-E-C-W-V-D-W-N-K-A-S-K-E-I-G-K-I-I-V-N-G-W-V-Q-H-G-P-W-A-P-R

Obrázek č. 20 Podobnost v aminokyselinových sekvencích enterocinu TW21, hiracinu JM79 a durancinu GL
(Upraveno dle Chen *et al.*, 2013)

Prepeptid enterocinu TW21 má 76 aminokyselinových zbytků, který se post-translační modifikací mění na zralý bakteriocin o 46 aminokyselinových zbytcích. Molekulová hmotnost tohoto bakteriocinu je vypočtena přibližně na 5,3 kDa, což bylo potvrzeno i pomocí MALTI-TOF MS.

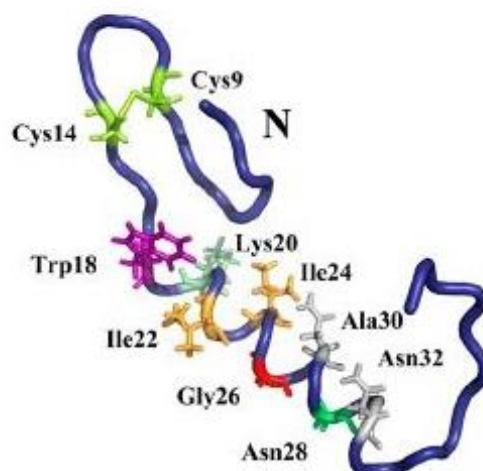
4.8 Mundticin

Mundticin KS je bakteriocin produkovaný *Enterococcus mundtii* NFRI 7393, který byl izolovaný z travní siláže v Thajsku. Ve své sekvenci obsahuje 43 aminokyselinových zbytků. Bylo zjištěno, že mundticin vykazuje antimikrobiální aktivitu proti *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus lactis* a dalším. Mundticin KS odolává teplotě 90 °C po dobu 1 hodiny. Při teplotě 100 °C působící po dobu 1 hodiny ztrácí 50 % své antimikrobiální aktivity (Kawamoto *et al.*, 2002).

Mudticin CRL1656 je bakteriocin, který je produkovaný *Enterococcus mundtii* CRL 1656. Bakteriocin má antimikrobiální účinky proti *Listerii monocytogenes* i *Streptococcus dysgalactiae*. *Enterococcus mundtii* CRL 1656 a jeho bakteriocin jsou kandidáty, které mají být zahrnuty do produktu, který brání vzniku bovinní mastitidy. Toto onemocnění způsobují zejména bakterie *Staphylococcus aureus*, koagulasa negativní streptokokoky, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* a další. Klasické léky, které jsou užívány (mnohdy v nadměrném množství), se mohou dostávat do mléka, a navíc na ně vzniká rezistence. Pro tuto skutečnost je využití bakteriocinů vhodnou alternativou pro konvenční léčiva (Espeche *et al.*, 2014).

4.9 Enterocin HF

Enterocin HF, jehož struktura je na obrázku č. 21, je bakteriocin produkovaný *Enterococcus faecium* M3K31. Prepeptid toho bakteriocinu má 58 aminokyselinových zbytků, zralý bakteriocin obsahuje těchto zbytků pouze 43. Předpokládaná molekulová hmotnosti činí 4,3 kDa. Stejně jako další zástupci *Ila* skupiny obsahuje enterocin HF ve své aminokyselinové sekvenci část: Y-G-N-G-V. Z 91 % je sekvence enterocinu HF identická se sekvencí mundticidu KS (enterocinem CRL35), který je blíže popsán v podkapitole 4.8. Enterocin CRL35 je prostudovaný enterocin, který je vhodným kandidátem jako alternativní činidlo pro prevenci infekcí *Listeria* ssp. in vivo (Arbulu *et al.*, 2015).



Obrázek č. 21 Struktura enterocinu HF (Arbulu *et al.*, 2015)

ZÁVĚR

Pro ochranu potravin se začaly bakteriociny používat již v roce 1969. Úplně prvním použitým bakteriocinem byl nisin, který se dodnes používá převážně kvůli jeho antimikrobiálním vlastnostem proti listeriím. Výzkum dalších bakteriocinů pro toto použití nám může výrazně pomoci eliminovat množství užitých syntetických látek.

Velmi zajímavé se však stávají výzkumy, v kterých je testována možnost užití bakteriocinů v lékařství. V několika posledních letech výrazně vzrostla rezistence bakterií na antibiotika. Již dnes se vyskytují infekce, u kterých můžeme použít jen velmi málo vhodných a účinných antibiotik. V nedaleké budoucnosti mohou vznikat infekce, které nebudeme schopni léčit. Z tohoto důvodu je cílem současného výzkumu nahradit tyto komerční antibiotika alternativním produktem. Bakteriociny jsou na rozdíl od antibiotik ve většině případů degradovány enzymy v lidském těle, tzn. nejsou zdravotně závadné pro člověka. Bakteriociny většinou ani neovlivňují prospěšnou střevní mikroflóru, což je jejich velkou výhodou.

Osobně si myslím, že bakteriociny kvůli svému poměrně širokému spektru použití, antimikrobiálním a biochemickým vlastnostem, se mohou v nedaleké budoucnosti stát velmi užitečnými produkty hlavně v oblasti zdravotnictví. Bohužel víme, že i na bakteriociny mohou vznikat rezistence, stejně jako na antibiotika. Otázkou zůstává, zda během několika let, nebudeme řešit podobnou situaci, jako řešíme dnes s používáním antibiotik.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Achemchem F, Cebrian R, Abrini J, Mertinez-Bueno M, Veldivia E, Maqueda M. Antimicrobial characterization and safety aspects of the bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* F420 isolated from Moroccan raw goat milk, [2012], 58(5), 596–604(9).
2. Arbulu S, Lohans C. T, van Belkum M. J, Cintas L. M, Herranz C, Vederas J. C, Hernandez P. E. Solution Structure of Enterocin HF, an Antilisterial Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* M3K31. Journal of Agricultural and Food Chemistry, [2015], 63(49), 10689–10695.
3. Belguesmia Y, Choiset Q, Rabesona H, Baudy-Floc'H M. Le Blay G, Haertle T, Chober Jm. Antifungal properties of durancins isolated from *Enterococcus durans* A5-11 and of its synthetic fragments. Letters in Applied Microbiology, [2013], 566(4), 237–244.
4. Bilkova A, Sepova H. K, Bilka F, Balázová A. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Česká a Slovenská Farmacie: Časopis České farmaceutické společnosti a Slovenské farmaceutické společnosti, [2011], 60(2), 65–72.
5. Braňek B, Ghomrassi H, Cremonesi P, Morandi S, Fleury Y, Le Chevalier P, Hani K, Hedj O.B, Ghrairi T. Isolation and characterisation of an enterocin P-producing *Enterococcus lactis* strain from a fresh shrimp (*Penaeus vannamei*). Antonie van Leeuwenhoek, [2017], 110(6), 771–786.
6. Brötz H, Bierbaum G, Leopold K, Reynold PE, Sahl HG. The lantibiotics mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. Antimicrob Agents Chemother, [1998], 42(1), 154–160.
7. Brötz H, Bierbaum G, Markus A, Molitor E, Sahl, H. G. Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism? Antimicrob. Agents Chemother, [1995], 39, 714–719.
8. Chang Sy, Chen Ys, Pan Sf, Lee Ys, Chang Ch, Chang Ch, Yu B, Wu HC. Enterocin TW21, a novel bacteriocin from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821. Journal of Applied Microbiology, [2013], 115(3), 673–678.
9. Chatterjee S, Chatterjee D. K, Jani R. H, Blumbach J, Ganguli B. N., Klesel N, Limbert M, Seibert, G. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*: in vitro and in vivo antibacterial activity. J. Antibiot, [1992], 45, 839–845.

10. Chen Y, Qu Ch, Ji S, Liou M, Leong K, Pan S, Wu H, Lin Y, Yu B, Yanagida F. Enterocin T, a novel class IIa bacteriocin produced by *Enterococcus* sp. 812. Archives of Microbiology, [2013], 195(9), 655–660.
11. Chen Y. S, Yanagida F, Srionnual S. Characteristics of bacteriocin-like inhibitory substances from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821 and D081833. Letters in Applied Microbiology, [2007], 44(3), 320–325.
12. Cintas L.M, Casaus P, Håvarstein L.S, Hernández P.E, Nes I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin p, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. App. Environ. Microbiol, [1997], 63(11), 4321.
13. Cleveland J., Montiville T.J., Nes. I. F., & Chikindas M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, [2001], 71, 1–20.
14. Collins B., Cotter P. D., Hill C., Ross R.P. Applications of lactic acid bacteria-produced bacteriocins. In F. Mozzi, R. R. Raya G. M. Vignolo (Eds.). Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applicatios, [2010], 89–109.
15. Cuozzo S, Calvez S, Prévost H, Drider D. Improvement of enterocin P purification process. Folia Microbiologica, [2006], 52(5), 401–405.
16. de Kruijff B, van Dam V, Breukink E. Lipid II: a central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antitiboc. Prostagrandins leukot Essent Fatty Acids, [2008], 79(3-5),117–121.
17. De Kwaadsteniet M, Fraser T, Van Reenen C. A. Bacteriocin T8, a novel class IIa sec-dependent bacteriocin by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. Appl Environ Microbiol, [2006], 71(7), 4761–4766.
18. Dick L. M. T, Granger M, Van Reenen C.A. Survival and adherence of antimicrobial peptide ST4SA, produced by *Enterococcus mundtii*, at conditions found in the human gastro-intestinal tract. Journal of Basic Microbiology, [2010], 50(S1), S25–S29.
19. Du L, Somkuti G.A, Renye Jr. J.A, Huo G. Properties of durancin Gl, a new antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus durans* 41D. Journal of Food Safety, [2012], 32(1), 74–83.
20. Espeche M. C. Tomás M. S. J, Wiese B, Bru E, Nader-Macías M. E. F. Physicochemical factors differentially affect the biomass and bacteriocin production by

- bovine *Enterococcus mundtii* crl 1656. Journal of Dairy Science, [2014], 97(2) 789–797.
21. Gaaloul N., Braiek O, Hani K, Volski A, Chikindas M.L, Ghrairi T., Isolation and characterization of large spectrum and multiple bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strain from raw bovine milk. Journal of Applied Microbiology, [2015], 118(2), 343–355
 22. Garneau S, Martin N. I, Vederas J.C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie, [2002], 85(5-6),577–92.
 23. Grande M. J, Lucas R, Abriouel H, Omar N. B, Maqueda M, Martínez-Bueno M. Martinet-Cañameno M, Valdivia E, Gálvez A. Control of *Alycylobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. International Journal of Food Microbiology, [2005], 104(3), 289–297.
 24. Granger M, van Reenan C. A, Dicks L. M. T. Effect of gastro-intestinal conditions on the growth of *Enterococcus mundtii* ST4SA, and production of bacteriocin ST4SA recorded by real-time PCR. International Journal of Food Microbiology, [2008], 123(3), 277–280.
 25. Gratia A. Sur un remarquable exemple d’antagonisme entre deux souches de coilbacille. Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie, [1925], 93, 1040–1041.
 26. Guder, A., Wiedemann, I. and Sahl, H, G. Posttranslationally modified bacteriocins — the lantibiotics. Biopolymers, [2000], 55, 62–73.
 27. Gupta A, Tiwari S, Natrebov V, Chikindas M. Biochemical properties and mechanism of action of Enterocin LD3 purified from *Enterococcus hirae* LD3. Probiotics and Antimicrobial Proteins, [2016], 8(3), 161–169.
 28. Gupta A. and Tiwari S.K. Probiotic potential of bacteriocin-producing *Enterococcus hirae* strain LD3 isolated from dosa batter. Annals of Microbiology, [2015], 65(4), 2333–2342.
 29. Gutiérrez J, Larsen R, Cintas L, Kok J, Hernández P. High-level heterologous production and functional expression of the sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology, [2006], 72(1), 41–51.
 30. Hammami R, Fernandez B, Lacroix Ch, Fliss I. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. Cellular and Molecular Life Sciences, [2013], 70(16), 2947–2967.

31. Hassan M, Brede D.A, Diep D.B, Nes I.F, Lotfipour F, Hojabri Z. Efficient inactivation of multi-antibiotics resistant nosocomial enterococci by purified hiracin bacteriocin. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, [2015], 5(3), 393–401.
32. Hassan S. S, Shah S. A. A, Pan CH., Fu L, Cao X, Shi Y, Wu X, Wang K, Wu B. Production of an antibiotic enterocin from a marine actinobacter strain H1003 by metal-stress technique with enhanced enrichment using response surface methodology. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, [2017], 30(1), 313–324.
33. Héchard Y and Sahl H-G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, [2002], 84(5), 545–557.
34. Hemu X, Qiu Y, Nguyen G. K. T, Tam J.P. Total Synthesis of Circular Bacteriocins by Butelase 1. *Journal of the American Chemical Society*, [2016], 138(22), 6968–6971
35. Hickey R.M, Twomey D.P, Ross R.P, Hill C. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology*, [2003], 149(3), 655–664.
36. 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, Charakterization, and Three-Dimensional Structure of the Novel Circular Bacteriocin, Enterocin NKR-5-3B, from *Enterococcus faecium*. *Biochemistry*, [2015], 54(31), 4863–4876.
37. Hu C. B, Zendo T, Nakayama J, Sonomoto K. Description of durancin TW-49M, a novel enterocin B-homologous bacteriocin in carrot-isolated *Enterococcus durans* QU 49. *Journal of Applied Microbiology*, [2008], 105(3), 681–690.
38. Jack R.W, Tagg J, Ray B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol Rev*, [1995], 59, 171–200.
39. Joerger M. C. and Klaenhammer T. R. Charakterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481.J. *Bacteriol*, [1986], 167(2), 439–446
40. Jozala A. F., Andrade M. S., Arauz., L. J., Pessoa, A., Jr., & Vessoni-Penna T.C. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. *Applied Biochemical Biotechnology*, [2007], 136, 515–528.

41. Ju X, Chen X, Du L, Wu X, Liu F, Yuan J. Alanine-Scanning mutation analysis of Durancin GI reveals residues important for its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [2015], 63(28), 6202–6409.
42. Jun-ichi Nagao. Properties and Applications of Lantibiotics, a Class of Bacteriocins Produced by Gram-positive Bacteria. *J. Oral Biosci*, [2009], 51(3), 158–164.
43. Kawamoto S, Schima J, Sato R, Eguichi T, Ohmomo S, Shibato J, Horikoshi N, Takeshita K, Sameshima T. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl Environ Microbiol*, [2002], 68(3), 3830–3840.
44. Khan K, Flint S.H, Yu P.L. Determination of the mode of action of enterolysin A, produced by *Enterococcus faecalis* B9510. *Journal of Applied Microbiology*, [2013], 115(2), 484–494.
45. Klaenhammer T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. [1993], 12, 39–86.
46. Knoetze H, Todorov S. D, Dicks L. M. T. A class IIa peptide from *Enterococcus mundtii* inhibits bacteria associated with otitis media. *International Journal of Antimicrobial Agents*, [2008], 31(3), 228–234.
47. Lohans C. T and Vederas J. C, Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *International journal of microbiology*, [2012].
48. Lohans CH. T, Towle K .M, Miskolzie M, McKay R. Y, van Belkum M. J, McMullen L. M, Vederas J. C. Solution Structures of the Linear Leaderless Bacteriocins Enterocin 7A and 7B Resemble Carnocyclin A, a Circular Antimicrobial Peptide. *Biochemistry*, [2013], 52(23), 3987–3994
49. McAuliffe O, Ross P. R, Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology reviews*, [2001], 285–308.
50. McClintock M. K, Kaznessis Y.N, Hackel B.J. Enterocin A mutants identified by saturation mutagenesis enhance potency towards vancomycin-resistant Enterococci. *Biotechnol bioeng*, [2016], 113(2), 414–423.
51. Mojsova S, Krstevski K, DZadzovski I, Zagorka P, Sekulovski P. Phenotypic and genotypic characteristics of enterocin producing enterococci against pathogenic bacteria, [2015], *Macedonian Veterinary Review*, 38(2), 209–216.
52. Nes I. F, Diep D. B, Håvarstein L. S, Brurberg M. B, Eijsink V and Holo M. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, [1996], 70, 113–128.

53. Nes IF and Holo H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, [2000], 55(1),50–61.
54. Nigmatova K, Morovsky M, Pristas P, Teather R.M, Holo H, Javorsky P. Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J Appl Microbiol*, [2007], 102(2), 563–569.
55. Nilsen T, Nes I.F, Holo H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol*, [2003], 69(5), 2975–2984.
56. Pons A.M, Lanneluc I, Cottenceau G, Sable S. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie*, [2002], 84, 531–537.
57. Riley A, *Bacteriocins, Biology, Ecology, and Evolution*, [2009].
58. Rilla N., Martinez B., Rodriguez A. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in lactis lactis IPLA 729. *Journal of Food Protection*, [2004], 67, 928–933.
59. Samyn B, Martinez-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 Letters*, [1994], 352(1), 87–90.
60. Sánchez J, Borrero J, Gómez-Sala B, Basanta A, Herranz C, Cintas L.M, Hernández P.E. Cloning and heterologous production of hirancin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol*, [2008], 74(8), 2471–2479.
61. Sang Y and Blecha F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim Health Res Rev*, [2008], 9(2), 227–235.
62. Schneider N, Werkmeister K, Pischetsrieder M. Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. *Food Chemistry*, [2011], 127(2), 847–854.
63. Settanni L and Corsetti A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, [2008], 121(2), 123–138.
64. Shankar N, Coburn P, Pillar C, Haas W, Gilmore M. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol*, [2004], 293(7-8), 609–618.
65. Shneider N, Werkmeister K, Pischetsrieder M. Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. *Food Chemistry*, [2011], 127(2), 847–854.

66. Soliman W, Wang L, Bhattacharjee S, Kaur K. Structure-activity relationships of an antimicrobial peptide plantaricin s from two-peptide class IIb bacteriocins. *J Med Chem*, [2011], 54(7), 2399–2408.
67. Staden A, Heunis T, Dicks L. Release of *Enterococcus mundtii* bacteriocin ST4SA from self-setting brushite bone cement. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, [2011], 3(2), 119–124.
68. Thornes B, Murray P, Bouchier-Hayes D. Development of resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* on gentamicin-loaded bone cement in vivo. *J Bone Joint Surg Br*, [2002], 84(5), 758–760.
69. Wiley J.M and van der Donk WA. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol*, [2007], 61, 477–501.
70. Yanagida F, Chen Y, Onda T, Shinohara T. Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology*, [2005], 50(6), 430–435.