

# **Vybrané inhibiční látky produkované grampozitivními bakteriemi**

Eva Pollaková

---

Bakalářská práce  
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav potravinářského inženýrství  
akademický rok: 2007/2008

# **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva POLLAKOVÁ**  
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Vybrané inhibiční látky produkované grampozitivními bakteriemi**

Zásady pro vypracování:

- 1. Popis chemických látek a dalších faktorů inhibující růst a množení mikroorganismů.**
- 2. Charakteristika struktury, vlastností a účinků inhibičních látek, které mohou být produkovány mikroorganismy.**
- 3. Zaměření na grampozitivní bakterie produkující látky potlačující růst jiných mikroorganismů.**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**ICMSF: Microorganisms in Foods, Microbial Ecology of Food Commodities, 2nd, Springer, 2005**

**JAY, J. M., Modern Food Microbiology, 6th ed., Aspen Publishers, Maryland, 2000**

**CHEN, H., HOOVER, D. G., Bacteriocins and their Food Applications, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Institute of Food Technologists, 2003**

**GARNEAU, S., MARTIN, N. I., VEDERAS, J. C., Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria, Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2G2, 2002**

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

**21. listopadu 2007**

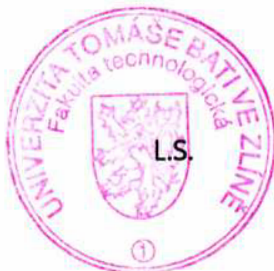
Termín odevzdání bakalářské práce:

**31. května 2008**

Ve Zlíně dne 12. května 2008



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*vedoucí katedry*

## **ABSTRAKT**

Abstrakt česky

Při výrobě potravin je nutné zajistit jejich kvalitu a mikrobiální nezávadnost. Tato bakalářská práce popisuje bakteriociny, antimikrobiální peptidy inhibující růst a množení mikroorganismů. Dále charakterizuje jejich funkce, strukturu, účinek a rozdělení. Tato práce je zaměřena hlavně na grampozitivní bakterie, které potlačují růst jiných mikroorganismů.

Klíčová slova: bakteriociny, bakterie mléčného kvašení, ochrana potravin, nisin

## **ABSTRACT**

Abstrakt ve světovém jazyce

It is important to provide quality and microbiology safety during the processing articles of food. This work is describing bacteriocins in particular, antimicrobial peptides inhibiting growth and reproducing microorganisms. Next there are characterized their function, structure, mode of action and parting in this bachelor work. It is directed mainly at the grampositive bacteria that inhibit the growth of other microorganisms.

Keywords: Bacteriocins, Lactic acid bacteria, Food preservation, Nisin

Poděkování, motto:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mé konzultantce Mgr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odbornou pomoc a další cenné rady, které mi věnovala při zpracování této bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>1 ANTIBIOTIKA</b> .....	<b>10</b>
1.1 HISTORIE .....	10
<b>2 BAKTERIOCINY</b> .....	<b>12</b>
2.1 OBJEV BAKTERIOCINŮ .....	13
2.2 ROZDĚLENÍ BAKTERIOCINŮ.....	13
2.2.1 Bakteriociny třídy I .....	14
2.2.2 Bakteriociny třídy II.....	16
2.2.3 Další bakteriociny .....	17
2.3 PRIMÁRNÍ STRUKTURA, PRODUKCE A REGULACE BAKTERIOCINŮ .....	18
2.3.1 Nelantibiotické dvoupeptidové bakteriociny .....	18
2.3.2 Lantibiotické dvoupeptidové bakteriociny .....	19
2.4 STRUKTURA A FUNKCE BAKTERIOCINŮ .....	20
2.4.1 Účinek a baktericidní efekt .....	20
2.4.1.1 Aktivita nelantibiotických dvoupeptidových bakteriocinů .....	21
2.4.1.2 Aktivita lantibiotických dvoupeptidových bakteriocinů .....	22
2.4.2 Antibakteriální spektrum bakteriocinů .....	22
2.5 BAKTERIOCINY GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ.....	23
2.5.1 Koliciny .....	23
2.5.2 Pyociny.....	23
2.5.3 Mikrociny .....	23
2.6 BAKTERIOCINY GRAMPOZITIVNÍCH BAKTERIÍ .....	24
2.6.1 Nelantibiotické dvoupeptidové bakteriociny .....	24
2.6.1.1 Nelantibiotické bakteriociny produkované enterokoky.....	24
2.6.1.2 Nelantibiotické peptidy produkované laktobacily .....	25
2.6.1.3 Nelantibiotické peptidy produkované streptokoky .....	26
2.6.1.4 Nelantibiotické peptidy produkované ostatními bakteriemi .....	27
2.6.2 Lantibiotické dvoupeptidové bakteriociny .....	28
2.6.2.1 Lantibiotika produkovaná laktobacily .....	28
2.6.2.2 Lantibiotika produkovaná zástupci Carnobacterium.....	31
2.6.2.3 Lantibiotika produkovaná enterokoky .....	32
2.6.2.4 Lantibiotika produkovaná laktokoky .....	33
2.6.2.5 Lantibiotika produkovaná ostatními bakteriemi .....	35
2.7 APLIKACE BAKTERIOCINŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ .....	36
2.7.1 Biokonzervace masa .....	38
2.7.2 Biokonzervace mléčných výrobků .....	40
2.7.3 Biokonzervace mořských produktů .....	41
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>43</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>44</b>

<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>54</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>55</b>

## ÚVOD

Inhibiční látky jsou látky produkované mikroorganismy, které omezují nebo zastavují růst dalších mikroorganismů a ovlivňují kulinární a technologické vlastnosti potravin. Bakterie mléčného kvašení produkují široké spektrum nežádoucích látek, jako například organické kyseliny, peroxid vodíku, laktoperoxidázu a diacetyl. Některé z nich produkují bakteriociny

Bakteriociny jsou antimikrobní peptidy produkované především bakteriemi mléčného kvašení. Mnoho těchto látek bylo izolováno a charakterizováno během posledního desetiletí. Často mají omezené inhibiční spektrum a nejaktivněji působí proti blízkým příbuzným bakteriím, které se pravděpodobně vyskytují ve stejné ekologické nise.

V posledních letech se zvýšil zájem o použití bakteriocinů jako přirozených konzervačních prostředků potravin a antimikrobních činitelů. Používají se především ke kontrole růstu nežádoucích mikroorganismů (například *Listeria monocytogenes*) a jako startovací kultury při fermentaci mléčných, zeleninových a masných výrobků. Mohou se přidávat do potravin k inhibici růstu organismů během skladování, čímž prodlužují jejich trvanlivost.

Inhibiční spektrum bakteriocinů bakterií mléčného kvašení je poměrně omezené oproti antimikrobním peptidům, které produkují eukaryotické buňky. Na druhé straně bakteriociny bakterií mléčného kvašení usmrcují bakterie nižšími koncentracemi než eukaryotické antimikrobní látky. Je to pravděpodobně způsobeno interakcí se specifickým receptorem, který se nachází na cílové buňce.

Dalšími inhibičními látkami jsou antibiotika. Jedná se o přirozené látky, které také inhibují růst mikroorganismů, nebo je usmrcují. Antibiotika produkují bakterie, houby, řasy, lišejníky aj.

Syntéza a způsob účinku bakteriocinů a antibiotik se od sebe odlišuje. Organismy, které jsou rezistentní k antibiotikům, nejsou většinou rezistentní vůči bakteriocinům. Na rozdíl od rezistence antibiotik není rezistence bakteriocinů určena geneticky.



## I. TEORETICKÁ ČÁST

## 1 ANTIBIOTIKA

Antibiotika jsou organické látky, které zpomalují růst bakterií nebo dokonce jejich usmrčení. Měla by být relativně neškodná pro hostitele, a proto mohou být použity na léčbu infekcí. Termín antibiotika původně označoval jen formy inhibičních látek odvozených ze živých organismů, ale teď je aplikován i na syntetické látky, např. sulfonamidy. Antibiotika jsou malé molekuly s molekulární hmotností méně než 2000 [1; 2].

Antibiotika jsou většinou málo škodlivé pro mikroorganismy, které je vytváří, ale značně toxické pro mikroorganismy nacházející se v jejich blízkosti [1].

Antibiotika nejsou účinné u virových, plísňových a jiných infekcí, které nejsou bakteriálního původu. Některá specifická antibiotika (zvaná úzkospektrální antibiotika) inhibují pouze malou skupinu bakterií a jiné zasahují větší okruh (šírokospektrální antibiotika). Účinnost jednotlivých antibiotik se mění podle lokality infekce a schopnosti antibiotika zasáhnout dané místo [2].

### 1.1 Historie

V roce 1888 německý vědec E. de Freudenreich izoloval bakteriální substanci a zaznamenal její antibakteriální vlastnosti. Pyocyanáza vylučována bakteriemi rodu *Bacillus* zpomalila růst jiných bakterií v okolí a byla toxická pro další bakterie způsobující onemocnění. Vlastní toxicita pyocyanázy a její nestabilní charakter neumožnil její použití jako účinného bezpečného antibiotika [3].

První účinné objevené antibiotikum byl penicilin. V roce 1896 zaznamenal francouzský lékař Ernest Duchesne, že určité plísně rodu *Penicilium* inhibují růst bakterií. Po jeho smrti byl výzkum zapomenut a až Alexander Fleming tento výzkum dokončil. Studoval schopnost enzymu lysozymu ničit bakterie, které kultivoval na agarových plotnách. Jedna z nich byla napadena plísňovou kontaminací a Fleming zaznamenal čistou zónu kolem kolonie plísně a domníval se, že plíseň vylučuje nějakou látku, která růst bakterií zastavuje. Protože plíseň byla rodu *Penicilium*, nazval tuto inhibiční látku penicilin [3].

Výzkum dalších druhů plísní a jiných organismů ukázal až dosud neznámou úroveň možné chemické inhibice bakterií. Nová antibiotika byla rychle objevována a začala se široce používat [3].

Spojením terapie inhibičními látkami produkovanými mikroorganismy v kombinaci s vakcinací a zlepšením zdravotního vybavení došlo ke snížení úmrtnosti dětského zápalu plic od roku 1939 do roku 1996 o 97 % [4].

## 2 BAKTERIOCINY

Bakteriociny jsou peptidy nebo bílkoviny produkované bakteriemi, které projevují antimikrobiální vlastnosti proti dalším bakteriím, často úzce příbuzným [5]. Mnoho producentů těchto látek syntetizuje pouze jeden bakteriocin, ale bylo zjištěno, že několik bakterií mléčného kvašení produkuje i 2-3 bakteriociny [6]. Bakteriociny obvykle obsahují 30 až 60 aminokyselinových zbytků [5]. Jsou to primární nebo modifikované produkty ribozomální syntézy peptidů bakterií a mohou mít omezené spektrum baktericidní aktivity [7]. Kompetitivní prostředí, ve kterém se nachází mnoho grampozitivních bakterií, vedlo pravděpodobně ke schopnosti vytvářet nové bakteriociny. Mnoho bakteriocinů způsobuje letální účinky porušením permeability buněčné membrány cílového organismu, ve většině případů pomocí meziproduktů biosyntézy buněčné stěny nebo proteinů zodpovědných za funkci fosfotransferázového systému [8].

Bakteriociny jsou aktivní hlavně proti grampozitivním buňkám, protože vnější membrána gramnegativních bakterií je před jejich účinky chráněná. Propustnost gramnegativních bakterií může být zvýšena subletálním poškozením vnější membrány. Mnoho bakteriocinů je nejvíce aktivních při nízkém pH, a proto mikroorganismy, které je produkují, mohou být izolovány z čerstvých a fermentovaných potravin. Tyto bakterie mohou přirozeně produkovat více než jeden bakteriocin. Výhoda bakteriocinů, oproti klasickým antibiotikům, spočívá v jejich suggestivním enzymatickém zničení. Druhy produkující bakteriociny mohou být součástí nebo jako přídavek startovacích kultur fermentace potravin za účelem zvýšení bezpečnosti a kvality potravin [7].

Bakteriociny se liší způsobem působení, spektrem aktivity, molekulovou hmotností, genetickým původem a biochemickými vlastnostmi. Jsou produkovány samovolně nebo indukovaně [9].

Mezi známé bakteriociny patří dvě rozdílné skupiny, lantibiotika a nelantibiotika. Oba typy se nejčastěji nachází ve formě jednotlivých aktivních peptidů. Existují také bakteriociny s dvoupeptidovým systémem, kde jsou obě složky (podjednotky) potřebné pro jejich úplnou aktivitu [8].

Bakteriociny produkované grampozitivními bakteriemi jsou nejvíce zkoumanou skupinou antibakteriálních peptidů. Je to dáno jejich možným použitím v potravinách a jiných produktech [10].

## 2.1 Objev bakteriocinů

Název bakteriocin navrhl v roce 1953 Jacob pro popsání inhibiční aktivity, kterou projevují určité bakterie proti blízkce příbuzným druhům. Kromě bakteriocinů bylo charakterizováno i mnoho sloučenin jim podobných [11]. V dnešní době bakteriociny zaujímají rozsáhlou a funkčně různorodou skupinu toxinů, produkovaných mikroorganismy (bakteriemi a archei) [4].

První studie, které popisují antagonistické interakce mezi bakteriemi, pocházejí z roku 1877. V tomto roce byl objeven inhibiční účinek bakterií izolovaných z moči na bakterii *Bacillus anthracis* [11].

V roce 1925 byl identifikován první bakteriocin, který produkovala bakterie *Escherichia coli*. Tato látka byla pojmenována kolicin [1].

V roce 1928 byla první zmínka o inhibičním účinku nisinu, ve které bakterie *Streptococcus lactis* (nyní *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) inhibovaly růst *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Název nisin byl odvozen z „N inhibitory substance“. Počáteční úsilí určit praktické použití pro nisin zahrnovalo testování jeho účinnosti na léčbu mastitidy ve stádu dojnic [10].

V posledních 20 letech byla bakteriocinům věnována vyšší pozornost pro možné použití dalších antimikrobních prostředků v potravinách a jako potenciálních doplňků a náhrad pro běžně používaná antibiotika [8].

## 2.2 Rozdělení bakteriocinů

Podle velikosti molekuly jsou dosud známé bakteriociny rozdělovány do 4 skupin [5; 7; 12; 13]:

### Třída I - nízkomolekulární lantibiotika

- obsahují zbytky netypických aminokyselin jako např. lanthionin, 3-metyllanthionin
- malé molekuly: 2 až 3 kDa
- stálé za tepla
- nisin, subtilin, galidermin, epidermin, pep 5 a další bakteriociny

### Třída II - nízkomolekulární peptidické bakteriociny

- nemodifikované malé molekuly (do 10 kDa, 30- 100 aminokyselin)
- kationaktivní a hydrofobní peptidy
- tepelně odolné bakteriociny produkované kmeny rodů *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Enterococcus*
- IIa: - pediocinové bakteriociny se silným antilisteriovým účinkem
  - pediocin PA-1, bavaricin MN, divercin V41, mesentericin Y105, leucocin A, enterocin P a další bakteriociny
- IIb: - dvoupeptidové bakteriociny
  - jejich aktivita je závislá na komplementární činnosti dvou rozdílných peptidů
  - lacticin F, plantaricin EF, plantaricin JK, lactococcin G a další bakteriociny
- IIc: - sekundárně druhotné sekrety bakteriocinů
  - plantaricin A, lactococcin A, lactococcin 972 a další bakteriociny

### Třída III - vysokomolekulární proteinové bakteriociny

- velké tepelně labilní bakteriociny (větší než 30 kDa)
- helveticin J, caseicin 80 a další bakteriociny

### Třída IV - komplexní bakteriociny

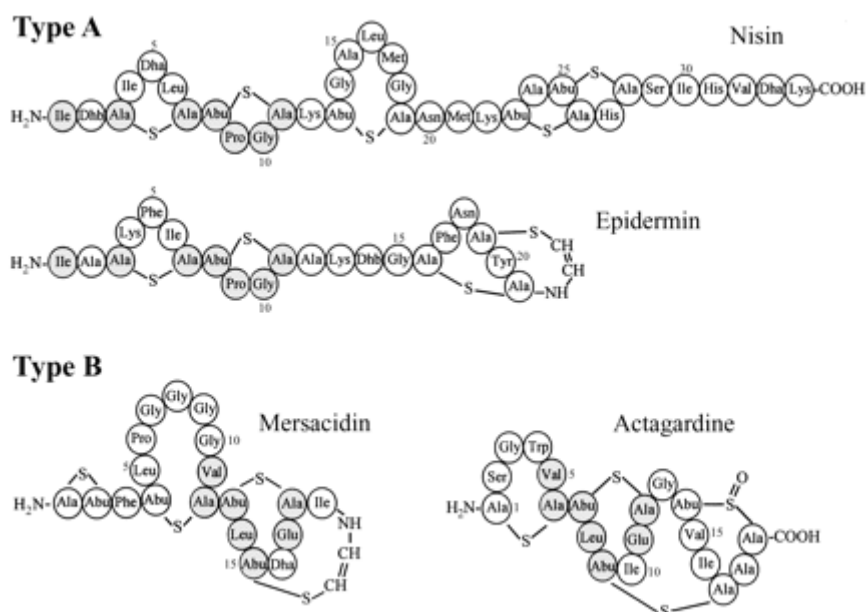
- složené z části proteinové a jedné nebo více komponent neproteinových (lipidických a sacharidických)
- lactocin 27, plantaricin S, pediocin SJ- 1 a další bakteriociny

#### 2.2.1 Bakteriociny třídy I

Lantibiotika jsou skupinou antimikrobiálních peptidů, kterou produkují grampozitivní bakterie. Termín lantibiotikum (lanthionin- obsahující antibiotikum) odkazuje na jejich unikátní intramolekulární strukturu, která je formována thioeterovými aminokyselinami lanthioninem a metyllanthioninem nebo dehydroalaninem a dehydrobutyrimem [4; 14].

Lantibiotika jsou syntetizována jako prekurzorové peptidy s N-koncovým peptidem a C-koncovou pro-peptidovou oblastí. V této oblasti jsou posttranslačně modifikovány zbytky specifických aminokyselin [4].

Lantibiotika se dělí na dvě skupiny podle jejich struktury (obr. 1) a způsobu účinku. Lantibiotika typu A jsou flexibilní, podlouhé, amfipatické molekuly, jejichž činnost je založena na působení na cytoplazmatickou membránu. Do této skupiny patří například nisin a epidermin. Lantibiotika typu B, například mersacidin, actagardin a cinnamycin, mají neohebnou globulární strukturu a inhibují pomocí specifických enzymů, které vytváří komplexy s membránou [14].



Obrázek 1: Struktura a sekvence aminokyselin u lantibiotik typu A a B [14]

Charakteristickým zástupcem této skupiny bakteriocinů je nisin, který je produkován druhem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Nisin má široké inhibiční spektrum působení proti gram-pozitivním bakteriím, které zahrnují mnoho patogenů a může zabránit nárůstu spór druhů *Bacillus* a *Clostridium* [7].

Lacticin 3147 je dalším bakteriocinem této třídy. Je účinný proti širokému spektru gram-pozitivních bakterií a na rozdíl od nisinu působí při neutrálním pH [7]. Další bakteriociny této skupiny jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Příklady dalších bakteriocinů třídy I [15; 16; 17; 18]

Bakteriocin	Produkující mikroorganismus	Citlivé mikroorganismy
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Tü3298	stafylokoky, streptokoky, <i>Propionibacterium acnes</i>
Mersacidin	<i>Bacillus</i> sp. HIL Y-85,54728	<i>Staphylococcus aureus</i>
Mutacin II	<i>Streptococcus mutans</i>	streptokoky
Subtilin	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Propionibacterium acnes</i>

### 2.2.2 Bakteriociny třídy II

Tato třída bakteriocinů je rozdělena do dalších třech podskupin a to IIa, IIb a IIc. Podskupinu IIa tvoří pediocinové bakteriociny s protilisteriální aktivitou. Pediociny produkují *Pediococcus* spp. Pediokoky jsou hlavní startovací kulturou, která se používá při výrobě fermentovaných mas a jsou také důležité při fermentaci zeleniny. Pediociny jsou odolné vůči teplu, pH, skladovacím podmínkám, organickým rozpouštědlům a hydrostatickému tlaku, ničí se proteolytickými enzymy a neutralizací některých aniontů. Jejich účinnost proti spórám není příliš vysoká. Kultury produkující pediocin PA-1/AcH byly izolovány z fermentovaných potravin [7; 9].

Velmi podobný pediocinu PA-1 je sakacin 674 produkovaný *Lactobacillus sakei*. Tento bakteriocin byl izolovaný z bakterií v mase a zpomaluje nebo zastavuje růst *Listeria monocytogenes* ve vakuově balených potravinách [7]. Sakaciny jsou malé, kationaktivní, hydrofobní peptidy, které působí antimikrobiálně proti laktobacilům a některým patogenům přenášených potravinami. Účinnost a stabilitu sakacinu ovlivňují podmínky prostředí a obzvláště pH [9]. Další bakteriociny třídy II jsou uvedeny v tabulce 2.



Tabulka 2: Příklady bakteriocinů třídy II [19; 20; 21; 22; 23; 24; 25]

Bakteriocin	Produkující mikroorganismus	Citlivé mikroorganismy
Enterocin CCM 4231	<i>Enterococcus faecium</i> CCM 4231	<i>Listeria monocytogenes</i>
Leucocin A-4010	<i>Leuconostoc carnosum</i> 4010	<i>Listeria monocytogenes</i>
Mundticin	<i>Enterococcus mundtii</i> ATO6	<i>Enterococcus mundtii</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. monocytogenes</i>
Piscicolin 126	<i>Carnobacterium piscicola</i> JG126	<i>Listeria monocytogenes</i>
Plantaricin 423	<i>Lactobacillus plantarum</i> 423	<i>Listeria</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.
Sakacin A	<i>Lactobacillus sakei</i> 706	<i>Listeria monocytogenes</i>
Sakacin P	<i>Lactobacillus sakei</i> 674	<i>Listeria monocytogenes</i>
Bifidocin B	<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCFB 1454	<i>Listeria</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i>
Carnobacteriocin B2	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17	<i>Enterococcus</i> , <i>Listeria</i>

### 2.2.3 Další bakteriociny

Základními startéry používanými ve výrobě sušených fermentovaných omáček jsou *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus plantarum*. Byla prokázána inhibice bakterií rodu *Listeria* bakteriocinogenným druhem *Lactobacillus sakei*, který byl izolován z přírodních fermentovaných omáček. *Lactobacillus sakei* CTC494 byl navržen jako ochranná kultura ve fermentovaných masných výrobcích [7]. Další bakteriociny, které se řadí do třídy III, jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Příklady bakteriocinů třídy III [26; 27; 28]

Bakteriocin	Produkující mikroorganismus	Citlivé mikroorganismy
Helveticin J	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
Millericin B	<i>Streptococcus milleri</i> NMSCC 061	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
Lactacin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus leichmannii</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

## 2.3 Primární struktura, produkce a regulace bakteriocinů

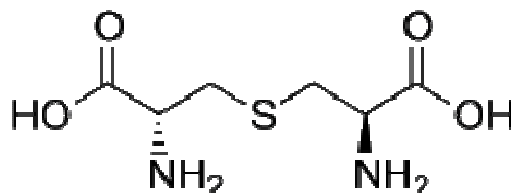
### 2.3.1 Nelantibiotické dvoupeptidové bakteriociny

Sekvence a struktura nelantibiotických dvoupeptidových bakteriocinů je rozmanitá. Občas je pozorována homologie mezi dvoupeptidovými systémy [8]. Bakteriociny jsou syntetizovány v předformě, která obsahuje na N-konci dvě aminokyseliny glycin [6]. Prepeptidy jsou obvykle vytvářeny v buňce a zralé bakteriociny (jak jednosložkové, tak dvousložkové systémy) jsou tvořeny během exportu z buňky [8].

K docílení produkce těchto bakteriocinů je zapotřebí nejméně čtyř různých genů. Jsou to strukturální geny kódující prepeptid, imunitní geny, geny kódující ABC-přenašeče a geny kódující druhotný protein potřebný pro vytvarování výsledné konformace bakteriocinu [6; 8]. Zralé bakteriociny jsou většinou kationaktivní, amfifilní molekuly s nepatrným množstvím cysteinu nebo také bez jeho přítomnosti. Sekundární struktura těchto peptidů může být silně ovlivněna prostředím, ve kterém se nacházejí. Ve vodném prostředí se kationaktivní peptidy vyskytují obvykle ve formě náhodných smyček, v jiném prostředí se mohou podjednotky spojovat. Nicméně rozpuštění peptidů v trifluoroetanolu nebo lipofilních micelách vede často k uspořádaným konformacím ( $\alpha$ -šroubovice a  $\beta$ -listy), ze kterých mohou být někdy odvozeny specifické interakce mezi jednotlivými peptidy [8; 29; 30].

### 2.3.2 Lantibiotické dvoupeptidové bakteriociny

Termín lantibiotikum pochází z antibiotik obsahující lanthionin (obr. 2). Lantibiotika charakterizují polycyklické struktury, které jsou velmi důležité při začlenění bakteriocinu do membrány. Úzce příbuzná lantibiotika, která neprodukuje bakterie mléčného kvašení, zahrnují subtilin z *Bacillus subtilis* a epidermin ze *Staphylococcus epidermidis* [10].



Obrázek 2: Lanthionin [31]

Dvoupeptidová lantibiotika jsou různá s ohledem na velikost, sekvenci a strukturu. Tyto peptidy jsou vysoce modifikované a obsahují cysteinové, serinové a threoninové zbytky, které jsou nutné ke vzniku lanthioninových můstků (obr. 2). Jsou také produkovány ribozomálně jako prepeptidy, které jsou enzymaticky upraveny na aktivní lantibiotika. Počáteční enzymatická dehydrogenace prepeptidů, které obsahují serin a threonin, poskytuje meziproduct obsahující mnoho zbytků dehydroalaninu (Dha) a dehydroaminomáselné kyseliny (Dhb). Poloviční podíl thiolu z cysteinového bočního řetězce je pak nasměrován na koncentrovanější z nově vzniklých nenasycených stran. Rozsah dehydrogenace a počet cysteinových zbytků postranních řetězců je dán po vzniku lanthioninových můstků množstvím přítomných vodíkových zbytků. Ve většině případů jsou některé zbývající vodíkové zbytky použity pro tvorbu nových D-stereocenter v peptidech [8; 32].

Další modifikace lantibiotických peptidů obsahují sestavy N-terminálních  $\alpha$ -keto aminů a C-terminální kruhy oxidativní dekarboxylace. V případě existence C-terminálního cysteinového zbytku může dojít ke spojení se sousedním vodíkovým řetězcem za vzniku nenasyceného lanthioninového kruhu [8].

Rozsáhlé modifikace v lantibiotících mají význam pro determinaci primárních struktur. Časté sekvence slabých lanthioninových můstků a vodíkových zbytků uvnitř peptidu zamezují seřazení již jednou exponovaného N-konce (pravděpodobně kvůli rychlé deaminaci, která vede k zablokování N-konce peptidu). Také N-konec poloviny  $\alpha$ -keto amidů nalezených v některých lantibiotících brání řazení N-konce. Bylo provedeno mnoho pokusů k vyřešení

těchto problémů. K vytvoření správné sekvence peptidů se nejčastěji zapojují chemické modifikace lanthioninových můstků a nenasycených zbytků [8; 33].

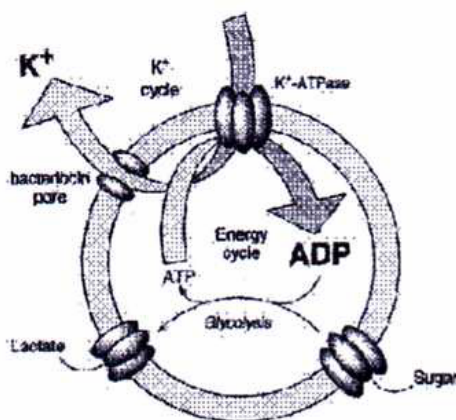
Strukturu lantibiotik lze jen obtížně odvodit z krystalografických studií pomocí X paprsků. Z tohoto důvodu se ke studiu struktury lantibiotik využívá multidimenzní NMR studie a modelování pomocí počítačů.

Pomocí těchto analýz bylo zjištěno, že lantibiotika jsou ve vodě značně flexibilní (více než by se očekávalo díky přítomnosti četných lanthioninových můstků). V dalších rozpouštědlech (např. trifluoroethanol) nebo při výskytu micel se zdá, že peptidy přijímají více uspořádané, amfifilní struktury, u kterých se předpokládá membránová depolarizující aktivita [8].

## 2.4 Struktura a funkce bakteriocinů

### 2.4.1 Účinek a baktericidní efekt

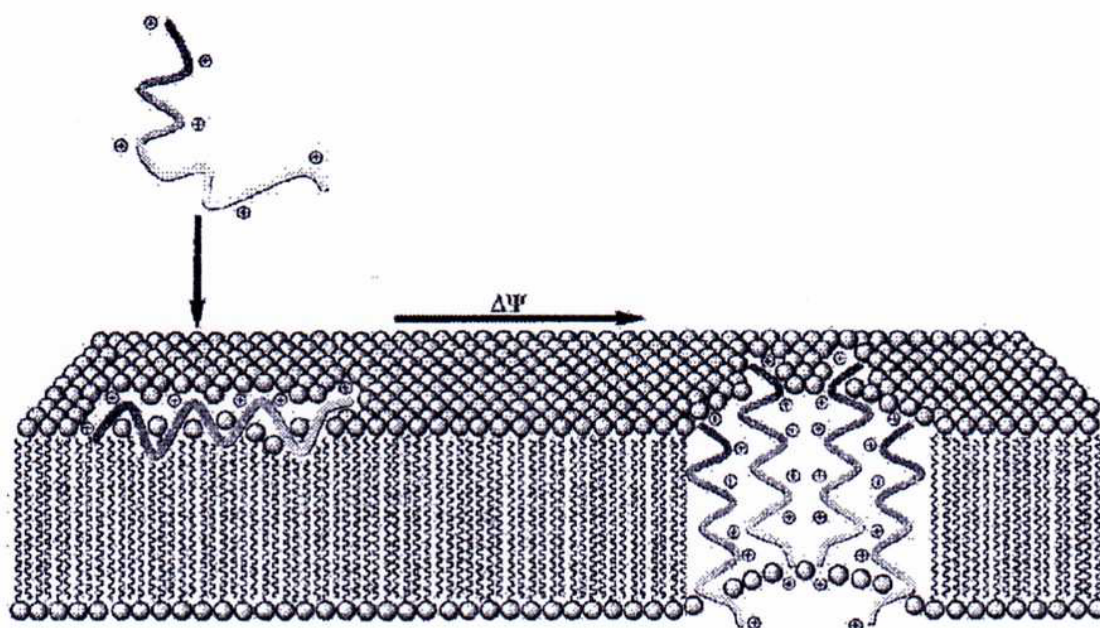
Optimální poměr synergických peptidů ve dvoupeptidových bakteriocinech je přibližně 1:1. U mnoha z těchto dvoupeptidových bakteriocinů bylo prokázáno, že baktericidní efekt nastává jako výsledek permeability buněčných membrán [34]. Schopnost tvořit póry vede k prosakování a vytékání draselných iontů z buňky rozptýlením membránového potenciálu a útlumem příjmu aminokyselin. Zánik buňky může být způsoben neúčinným cyklem příjmu draslíku za pomoci ATP, což je způsobeno bakteriocinem, který zprostředkoval uvolnění draslíku v kombinaci se zvýšenou hydrolyzou ATP pomocí ATPasy, jak ukazuje obr. 3 [8].



Obrázek 3: Model zániku buňky působením bakteriocinu [8]

### 2.4.1.1 Aktivita nelantibiotických dvoupeptidových bakteriocinů

U některých jednopeptidových bakteriocinů bylo zjištěno, že při kontaktu s membránou náhodně stočené peptidy přijmou pravidelnou helikální strukturu. Tento efekt vysvětlují NMR struktury leucocinu A a carbonobacteriocinu B2 rozpuštěných ve vodě a v roztocích ovlivňujících strukturu proteinů jako trifluoroethanol nebo dodecyl fosfocholinové micely. Je obecně známo, že sestavení podobných amfipatických spirál je rozhodující strukturní změnou potřebnou pro tvorbu pórů pomocí mechanismu prostupu membránou. Tento mechanismus se opírá o stabilizační interakce mezi membránou fosfolipidů a kationaktivními zbytky peptidů, které umožňují vsunutí hydrofóbních částí molekul do vnější strany membrány. Jakmile jsou uspořádané bakteriociny spojeny s povrchem membrány, tak se mohou hromadit. Komplex bakteriocinu s membránou může prostupovat celou membránu, čímž tvoří přechodový pór (obr. 4) [35; 36].



Obrázek 4: Tvorba pórů kationaktivními peptidy, které nevyžadují receptor [8]

Předpokládá se, že v dvoupeptidových bakteriocinech jsou přítomny spojené peptidy, které ovlivňují  $\alpha$ -helikální strukturu. Peptidy jsou uspořádány do helikálního tvaru kromě oblasti helixu, které budou rozděleny na zbytky podobné polaritě nebo hydrofobity. V současné době není známo, jestli dvoupeptidové bakteriociny potřebují chirální identifikaci molekul receptorů vázaných na membráně, ale studie s jednopeptidovými bakteriociny a specifita antimikrobiálního působení tomu nasvědčují [8].

### 2.4.1.2 Aktivita lantibiotických dvoupeptidových bakteriocinů

Příklady dvoupeptidových lantibiotik jsou poněkud limitovány. Efekt usmrcení buněk a způsob působení byl určen pouze u lacticinu 3147. Lacticin je lantibiotikum tvořené dvěma peptidovými jednotkami. Bylo zjištěno, že inhibiční aktivitu projevuje jeden z peptidů (peptid A1). Tato inhibiční aktivita může být zvýšena přítomností druhého peptidu (peptid A2). Bylo dokázáno, že pokud spojíme oba peptidy, tak lacticin 3147 vyvolává inhibiční efekt prostřednictvím tvorby pórů v buněčné membráně cílové buňky. V propustné membráně byl pozorován náhlý odtok draselných a fosfátových iontů mající za následek rozptyl transmembránového elektrického potenciálu ( $\Delta\psi$ ) složky protonmotivní síly (proton motive force, PMF), hydrolyzu intracelulárního ATP a zánik buňky. Tyto účinky jsou v podstatě shodné s účinky vyvolanými mnohými nelantibiotickými dvoupeptidovými bakteriociny. Zjištění, že lacticin 3147 má větší spektrum aktivity (inhibuje všechny doposud testované grampozitivní bakterie) než jiné dvoupeptidové nelantibiotické systémy ukazují na to, že tento bakteriocin může působit různými způsoby [8; 37].

Další práce ukázala, že jednopeptidové lantibiotikum nisin specificky rozpoznává peptidoglykanový prekurzor lipidu. Z této práce vyplynulo, že nisin může reagovat dvěma způsoby s lipidem II, který zprostředkovává tvorbu pórů. Při produkci a testování mutovaného nisinu bylo prokázáno, že N-konec nisinu je nezbytný pro rozpoznání lipidu II a ochranu před peptidoglykanovou biosyntézou. C-konec nisinu a ohebný spoj jsou důležité složky pro tvorbu pórů. N-konec a C-konec jsou pružné a zbytek molekuly obsahuje amfifilní N-koncovou část (3-19 zbytků), která je tímto ohebným spojením připojena k pevné části tvořené 23-28 zbytky. Je možné, že v tomto systému peptid A1, který má inhibiční aktivitu i v izolované formě, je schopný rozpoznání specifických cílů a inhibice biosyntézy buněčné stěny. Více hydrofóbní peptid A2 (inaktivní, je-li izolován) po přidání k peptidu A1 tvoří dvoupeptidový komplex, který pak může udávat konečnou aktivitu tvorbou pórů [8; 29; 38].

### 2.4.2 Antibakteriální spektrum bakteriocinů

Cytoplazmatická membrána grampozitivních bakterií je primárním cílem bakteriocinů. Vnější membrána gramnegativních bakterií, neprostupná pro tyto antibiotické peptidy, obvykle zamezuje antimikrobiální aktivitě. Nebyl nalezen žádný z dvoupeptidových bakteriocinů, který by usmrtil gramnegativní mikroorganismy. Ačkoli inhibiční spektra mnoha jednoslož-

kových bakteriocinů produkovaných grampozitivními bakteriemi jsou docela omezená, nejvíce dvoupeptidových antimikrobiálních systémů projevuje aktivitu proti široké skupině grampozitivních bakterií. Nelantibiotika mají zpravidla užší spektra inhibice než lantibiotika. Detekce aktivity bakteriocinů se obvykle dokazuje difúzní metodou [8; 11].

## 2.5 Bakteriociny gramnegativních bakterií

Ve srovnání s bakteriociny grampozitivních bakterií jsou tyto bakteriociny větší. Obvykle bývají uvolněny skrz buněčnou lyzi a často jsou závislé na regulačních drahách hostitele, jako SOS regulace [4].

### 2.5.1 Koliciny

Koliciny jsou skupinou ve vodě rozpustných antibiotických látek, které jsou produkovány různými kmeny *Escherichia coli*. Jsou často větší než 20 kDa a inhibují růst bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, jako například *Shigella dysenteriae* [39].

Koliciny jsou složeny ze tří globulárních domén- první se podílí na regulaci vazby s receptorem pro citlivé buňky, druhá je spojená s translokací kooptující mechanismus cílové buňky a třetí doména je tzv. zabíjecí, která může vytvářet póry v membráně buňky nebo působí jako nukleáza poškozující DNA nebo RNA cílové buňky [40].

### 2.5.2 Pyociny

Pyociny jsou bakteriociny produkované *Pseudomonas aeruginosa* a byly zařazeny do tří skupin, R, F a S. Typy R a F jsou tvořeny proteinovými komplexy s podobnou strukturou bakteriofágů. Naopak S- typ pyocinů jsou malé, jednoduché proteiny citlivé vůči proteázám [41].

### 2.5.3 Mikrociny

Mikrociny jsou malé bakteriociny složeny z nízkého počtu aminokyselin [42]. Jejich letální spektrum je poměrně široké, ale je zaměřeno především na druhy čeledi *Enterobacteriaceae*. Cílové buňky ničí tvorbou porů nebo přerušením potenciálu buněčné membrány [4].

Mikrociny jsou odolné vůči určitým proteázám a extrémnímu pH, tepelně stabilní a relativně hydrofobní. Těmito vlastnostmi se podobají bakteriocinům produkovaným grampozitivními bakteriemi [4].

## 2.6 Bakteriociny grampozitivních bakterií

Bakteriociny grampozitivních bakterií často postrádají specifický receptor pro adsorpci, mohou mít relativně nízkou molekulovou hmotnost a jejich terminální sekvence jsou odštěpeny v průběhu zrání [43].

Tato skupina bakteriocinů se podobá mnohým bakteriostatickým peptidům, které produkuje eukaryota.. Jsou to kationaktivní, amfifilní peptidy, které prostupují membránou [44].

### 2.6.1 Nelantibiotické dvoupeptidové bakteriociny

#### 2.6.1.1 Nelantibiotické bakteriociny produkované enterokoky

##### Enterocin 1071

Enterocin 1071 produkovaný *Enterococcus faecalis* BFE 1071 a FAIR-E 309 se skládá ze dvou prepeptidů, enterocin 1071A a 1071B. Tyto peptidy jsou tepelně rezistentní (100 °C, 60 minut; po 15 minutách zachována 50 % aktivita). Enterocin 1071 napadá široké spektrum grampozitivních bakterií (*Clostridium tyrobutyricum*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus salivarius*, *Listeria innocua*, *Micrococcus* sp. a *Streptococcus agalactiae*), ale neprojevuje hemolytickou činnost a ztrácí veškerou aktivitu po působení proteolytických enzymů ( $\alpha$ -chymotrypsin, papain, pepsin, pronáza, proteináza K a trypsin). Enterocin 1071 může být zařazen jako další typ antibiotických peptidů ke třem kategoriím bakteriocinů identifikovaných z *Enterococcus faecalis* [8; 45; 46].

##### Enterocin L50

Dvoupeptidový bakteriocin enterocin L50 byl izolován z *Enterococcus faecium* L50. Působí baktericidně proti širokému spektru bakterií způsobujících kažení potravin a potravinami přenášených patogenů (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* a *Clostridium botulinum*), a také živočišných a lidských patogenů (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pa-*



*rasanguis* a *Streptococcus agalactiae*). Enterocin L50, podobně jako enterocin 1071, nemá hemolytickou aktivitu. Samostatné enterociny L50A a L50B mají významnou antimikrobiální činnost. Bylo zpozorováno, že proti mnoha indikátorovým druhům (*Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactobacillus sakei*) je enterocin L50A 4 až 12 krát účinnější než L50B [8; 47].

### 2.6.1.2 Nelantibiotické peptidy produkované laktobacily

#### ABP-118

ABP-118 je malý, tepelně stabilní, bakteriocin produkovaný *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. Jedná se o bakterii izolovanou z gastrointestinálního traktu lidí. ABP-118 má široké spektrum aktivity. Inhibuje růst širokého spektra patogenů, které se přenášející potravinami a jsou lékařsky významné. Mezi tyto patogeny patří například *Bacillus*, *Listeria*, *Enterococcus* a *Staphylococcus*. Bakteriocin byl vyizolován v čisté formě, a to v obou podjednotkách (Abp118 $\alpha$  a Abp118 $\beta$ ). Antimikrobiální aktivitu projevuje peptid Abp118 $\alpha$ , zatímco peptid Abp118 $\beta$  sám inhibovat nemůže. Zvýšená aktivita byla pozorována při kombinaci obou peptidů [8; 48].

#### Lactacin F

Lactacin F byl izolován z *Lactobacillus johnsonii* VPI11088 a byl popsán jako druhý známý příklad dvoupeptidového bakteriocinu. Lactacin F je tepelně stabilní bílkovinný inhibitor. Tento bakteriocin má úzké spektrum inhibice mající baktericidní činnost proti široké škále laktobacilů (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. lactis*, *L. reuteri*) a *Enterococcus faecalis*. Přídavek lacticinu F k *Enterococcus faecalis* má za následek úbytek koncentrace intracelulárního ATP, ale vliv na vnější ATP nebyl zjištěn. Byla testována i činnost lacticinu F ve spojení s dalšími antimikrobiálními peptidy (nisin, pediocin AcH, lacticin 481 a lacticin B). Byly pozorovány synergické a antagonistické interakce [8; 49].

#### Lactocin 705

Lactocin 705 byl izolovaný z *Lactobacillus casei* CRL 705 a jedná se bakteriocin složený z dvou peptidů (705 $\alpha$  a 705 $\beta$ ), 33 aminokyselinových zbytků [8]. Tyto peptidy jsou synteti-

zovány jako prekurzory se sekvencí dvojitého glycinu, čímž se podobají hlavním peptidům plantaricinu S a J, brochocinu C, sakacinu P. Jsou schopné stimulovat peptidy ze *Streptococcus gordonii* a *Streptococcus mitis* [50]. Peptid 705 $\alpha$  intereaguje s meziplošnou oblastí dehydratací a peptid 705 $\beta$  intereaguje pouze s hydrofobním jádrem [51]. Tyto peptidy projevují baktericidní efekt na indikátor zástupce *Lactobacillus plantarum* CRL691 optimálním poměrem 1:4. [52]

#### Plantaricin EF a JK

Další dva peptidy byly izolovány z *Lactobacillus plantarum* C-11 [8]. Mechanismus jejich účinku byl studován na buňkách kmenu *Lactobacillus plantarum* 965. Bylo zjištěno, že oba bakteriociny vytváří póry na membránách cílových buněk a rozptylují transmembránový elektrický potenciál ( $\Delta\psi$ ) a pH gradient ( $\Delta\text{pH}$ ). Póry plantaricinu EF efektivně vedou malé jednomocné kationty, ale vodivost aniontů je nízká nebo chybí. Na druhé straně póry plantaricinu JK projevují velkou vodivost specifických aniontů, ale nízkou vodivost kationtů [53].

Plantaricin EF a JK projevují maximální antimikrobiální efekt, když jsou přítomné v ekvimolárním množství. Minimální inhibiční koncentrace kolísají od 0,1 do 400 nM proti různým druhům *Pediococcus*, *Lactobacillus* a *Carnobacterium* [8].

#### Plantaricin S

Tento dvoupeptidový bakteriocin je produkován *Lactobacillus plantarum* LPCO10. Tento mikroorganismus byl izolován z fermentovaných zelených oliv. Plantaricin S také inhibuje široké spektrum bakterií mléčného kvašení (včetně jejich přírodních konkurentů *Lactobacillus plantarum*) a další grampozitivní patogeny (klostridia a propionibakterie) [8].

### 2.6.1.3 Nelantibiotické peptidy produkované streptokoky

#### Mutacin IV

Mutacin IV je bakteriocin izolovaný z *Streptococcus mutans* UA140 a skládající se za dvou peptidů, NlmA a NlmB. Je účinný proti řadě streptokoků a aktinomycet jako jsou například *Streptococcus sobrinus*, *Str. sanguinis*, *Str. oralis*, *Str. gordonii*, *Str. mitis*, *Str. parasanguinis*, *Str. cristatus*, *Actinomyces naeslundii* a *Actinomyces odontolyticus*. Tyto strepto-

koky přispívají k tvorbě zubního kazu a proto výsledky naznačují potenciální aplikaci mutacinu IV v zubním lékařství [8; 54].

### Thermophilin 13

Thermophilin 13 byl izolován ze *Streptococcus thermophilus* Sfi13 a je složen z peptidů ThmA a ThmB. Oba peptidy jsou kódovány samostatným operonem a jejich ekvimolární poměr je pro účinnost thermophilinu 13 optimální. Thermophilin 13 rozptyluje membránový potenciál a pH gradient v lipozomech. Účinek není závislý na složkách membrány citlivého druhu (např. lipidový nebo bílkovinný receptor). Tento dvoupeptidový bakteriocin účinkuje proti *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus* spp., *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium botulinum* a různým zástupcům *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*. Minimální inhibiční koncentrací kolísá od 5 do 1885 nM [8; 10; 32].

#### 2.6.1.4 Nelantibiotické peptidy produkované ostatními bakteriemi

### Brochocin-C

Brochocin-C je dvoupeptidový termostabilní bakteriocin produkovaný *Brochothrix campensis* ATCC 43754. Oba peptidy jsou ribozomálně syntetizovány jako prepeptidy, které jsou typické pro třídu II [55]. Genetická analýza jeho operonu odhalila přítomnost pěti ORF (otevřený čtecí rámec, open read frame). Jedná se o *brcA* a *brcB* (strukturní geny), *brcI* (imunitní geny), *brcT* a *brcD*. Má srovnatelně velké spektrum aktivity s nisinem. Spektrum inhibice zahrnuje širokou škálu grampozitivních bakterií (35 kmenů *Brochothrix thermosphacta*, 10 kmenů *Listeria monocytogenes*, mnoho zástupců rodů *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Kurthia*, *Lactobacillus* a *Pediococcus*) a spór *Clostridium* a *Bacillus*, ale nepůsobí inhibičně na gramnegativní bakterie. Bylo prokázáno, že vnější membrána gramnegativních bakterií chrání cytoplazmatickou membránu jako bariéra proti brochocinu-C. Experimenty zahrnující přidání brochocinu-C k aktivovaným buňkám a sféroplastům *Salmonella* Typhimurium měly za následek hydrolýzu ATP, která prokazuje, že tento bakteriocin působí na gramnegativní bakterie, když je jejich vnější membrána poškozená. Související studie na další dvoupeptidové bakteriociny, lactacin F a thermophilin 13, vedla k obdobným závě-

rům, že tvorba pórů nastává v cytoplazmatické membráně gramnegativních bakterií. Přizpůsobivost membrány může mít vliv na činnost těchto antimikrobiálních peptidů [8; 56].

### Lactococcin G

Lactococcin G byl první prokázaný dvoupeptidový bakteriocin a je nejlépe charakterizovaný dvoupeptidový bakteriocin třídy II. Byl izolován z *Lactococcus lactis* LMG 2081. Bylo prokázáno, že ekvimolární množství peptidů  $\alpha$  a  $\beta$  jsou potřebná k dosažení optimální baktericidní činnosti. Kombinace peptidů  $\alpha$  a  $\beta$  rozptyluje membránový potenciál. Tento bakteriocin projevuje antagonistickou činnost proti mnoha bakteriím mléčného kvašení a rodu *Clostridium* [8; 57; 58].

### Leucocin H

Tento bakteriocin produkuje *Leuconostoc* MF215B. Leucocin H je považován za lantibiotický dvoupeptidový bakteriocin. Leucocin H a plantaricin W jsou účinné proti širokému spektru grampozitivních bakterií (*Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Carnobacterium* sp., *Lactococcus* sp., *Listeria* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Propionibacterium* sp. a *Staphylococcus aureus*) a sporám *Bacillus* a *Clostridium* [8].

## 2.6.2 Lantibiotické dvoupeptidové bakteriociny

### 2.6.2.1 Lantibiotika produkovaná laktobacily

#### Acidocin A

Acidocin A produkuje *Lactobacillus acidophilus* TK9201. Byla určena sekvence prvních 16 aminokyselin N-konce a podle ní byl založen výzkum studia strukturních genů *acdA* acidocinu A. Acidocin A účinkuje proti úzce příbuzným bakteriím mléčného kvašení a patogenům, které jsou přenášeny potravinami (např. *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*), a není účinný proti *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* [10; 59].

### Acidocin J1132

*Lactobacillus acidophilus* JCM 1132 produkuje tepelně stabilní, dvousložkový bakteriocin acidocin J1132, který má úzké inhibiční spektrum. Je aktivní proti některým kmenům *Lactobacillus*, neaktivní proti *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp. a *Staphylococcus*.

Maximální produkce acidocinu J1132 na MRS půdě byla zjištěna při hodnotě pH 5,0. Jeho aktivita je spojená se dvěma složkami,  $\alpha$  a  $\beta$  a obě mají inhibiční aktivitu. Acidocin J1132 je baktericidní a v citlivých buňkách rozptyluje membránový potenciál a pH gradient. Také způsobuje tok předem nahromaděných aminokyselin, které jsou navázány přes jednosměrný transportní systém poháněný ATP. Modelování sekundární struktury odhalilo přítomnost amfifilních  $\alpha$ -helixových oblastí, které by mohly formovat hydrofilní póry. Z těchto výsledků vyplývá, že acidocin J1132 je bakteriocin formující póry, které vytváří kanálky v buněčné membráně prostřednictvím "barrel-stave" mechanismu [10; 60].

### Bavaricin A

Bavaricin A má rovněž bílkovinnou povahu a antimikrobiální účinek proti úzce příbuzným druhům. Je tepelně rezistentní a přecitlivělý na alkalické prostředí a produkuje jej *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Lactobacillus bavaricus* MI401 produkuje bavaricin A při teplotách od 4 do 30 °C. Produkce účinného bavaricinu A je inhibována zvýšením koncentrace chloridu sodného. Bylo zjištěno, že v přítomnosti 3% chloridu sodného při 4 °C je bavaricin A neúčinný. Produkci účinného bavaricinu A neovlivňují dusitany. Tento bakteriocin působí proti zástupcům *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Listeria monocytogenes*. Bavaricin A není aktivní proti *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Bacillus* spp. a *Staphylococcus* spp. [10; 61]

### Curvacin A

*Lactobacillus curvatus* LTH 1174, druh mající původ ve fermentovaných omáčkách, produkuje antilisteriální bakteriocin curvacin A. Tento bakteriocin může způsobit lepší činnost startérových bakterií a zlepšení úrovně hygieny v masných výrobcích. Jak růst buněk, tak účinnost bakteriocinu, jsou ovlivněny změnami v koncentraci soli. Chlorid sodný zřejmě zpomaluje růst *Lactobacillus curvatus* LTH 1174, ale má negativní vliv na produkci curva-

cinu A a tudíž na celkový účinek bakteriocinu. Curvacin A účinkuje proti zástupcům *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* a *Listeria ivanovii* a nepůsobí na *Leuconostoc* a *Clostridium* spp. [10; 62; 63]

#### Lactocin 27

Lactocin 27, produkováný *Lactobacillus helveticus* LP27, byl popsán jako bakteriocin, jehož účinek byl bakteriostatický. Jedná se o tepelně stabilní bakteriocin, který je inaktivován trypsinem a pronázou. Spektrum účinnosti lactocinu 27 je omezené a zaměřené proti kmenům *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus helveticus*. Je dobře adsorbován citlivými i rezistentními buňkami, což vede k ukončení syntézy proteinů. Má také účinek na syntézu DNA a RNA a úroveň ATP [10; 64].

#### Lactocin S

Lactocin S produkuje *Lactobacillus sakei* L45. Soudě podle složení aminokyselin, lactocin S obsahuje asi 33 aminokyselinových zbytků a okolo 50 % z nich jsou nepolární alanin, valin a leucin. Rozsah působení lactocinu S na kulturu závisí na stádiu růstu bakterie, pH média, přítomnosti etanolu a provzdušňování kultury. Nejvyšší stupeň aktivity bakteriocinu byl pozorován v počáteční fázi růstu při teplotě 30 °C. Pokud *Lactobacillus sakei* L45 roste ve fermentoru při pH 5, produkoval 2000 až 3000 bakteriocinových jednotek v ml, což je 8- až 10- krát více ve srovnání s produkcí během hromadné fermentace kultur. Bylo zjištěno, že méně než 10 % produkce tohoto bakteriocinu nastává při fermentaci při pH 6,0. Při vyšších hodnotách pH než 6 není účinek na citlivé buňky patrný. Také obsah 1% etanolu v médiu způsobil 2- až 4- násobné navýšení výtěžku bakteriocinu. Provzdušňování kultury během růstu téměř eliminovalo produkci účinného bakteriocinu. Je aktivní proti různým zástupcům *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus*, *Bacillus cereus* a *Clostridium* spp. [10; 65; 66]

#### Plantaricin C

Plantaricin C je produkován *Lactobacillus plantarum* LL441 a zabíjí citlivé buňky působením na cytoplazmatickou membránu. V sekvenci 27 aminokyselin plantaricinu C byla nale-

zena jedna molekula dehydroalaninu, jedna molekula lanthioninu a tři molekuly  $\beta$ -methyl-lanthioninových zbytků. Plantaricin C má nedostatečný vliv na imunní buňky, ale na druhou stranu rozptyluje protonmotivní sílu a inhibuje transport aminokyselin v citlivých buňkách. V proteolipozomech rozptyluje transmembránový elektrický potenciál a v lipozomech vyvolává odtok karboxy-fluoresceinu.

Plantaricin C je účinný proti kmenům *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus* spp. a *Clostridium* spp. Plantaricin C neúčinkuje proti *Listeria innocua* [10; 67; 68].

#### Plantaricin W

Plantaricin W je dvoupeptidový bakteriocin izolovaný z *Lactobacillus plantarum*, který inhibuje velký počet grampozitivních bakterií. Byly izolovány a charakterizovány 2 peptidy, Plw $\alpha$  a Plw $\beta$ , které se skládají z 29 a 32 aminokyselinových zbytků. Oba strukturní geny jsou uspořádány tak, že kódování prepeptidů je podobné staphylococcinu C55 a lacticinu 3147. Geny pro Plw $\alpha$  a Plw $\beta$  vykazují 31% a 32% podobnost s genem pro staphylococcin C55 a 40%, respektive 26%, podobnost s lacticinem 3147 [8; 69].

#### 2.6.2.2 Lantibiotika produkovaná zástupci *Carnobacterium*

##### Carnocin UI49

Carnocin UI49 je lantibiotikum produkované *Carnobacterium piscicola* a jeví baktericidní účinky proti mnoha bakteriím mléčného kvašení. Přídavek carnocinu UI49 k buňkám *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NZ9700 má za následek ztrátu membránového potenciálu a rychlou hydrolyzu vnitřního ATP. Carnocin UI49 může působit na cytoplazmatickou membránu podobným způsobem jako nisin. Používáním umělých lipidových membrán byla dokázána iontová permeabilita nebo tvorba kanálku v cytoplazmatické membráně způsobená bakteriociny *Lactobacillus acidophilus*. Bylo zjištěno zvyšování membránové vodivosti účinkem tohoto bakteriocinu [10; 70].

### Divercin V41

Divercin V41 je bakteriocin produkovaný *Carnobacterium divergens* V41, bakterií mléčného kvašení izolovanou z vnitřností ryb. Sekvence aminokyselin tohoto bakteriocinu je podobná s pediocinem PA-1 a enterocinem A

Divercin V41 působí na různé kmeny *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* a *Listeria ivanovii*. Tento bakteriocin nemá účinek na *Lactococcus* a *Leuconostoc* [10; 71].

### 2.6.2.3 Lantibiotika produkovaná enterokoky

#### Cytolysin

Cytolysin byl prvním příkladem dvoupeptidového lantibiotika. Jedná se o exotoxin produkovaný *Enterococcus faecalis*. Cytolysin přispívá k bakteriální virulenci a je bakteriocidní téměř proti všem gram pozitivním organismům. Maturace obou peptidů probíhá v mnoha krocích. Byly rozpoznány a charakterizovány tři různé stupně, během kterých se tvoří aktivní forma obou peptidů. Tyto dva peptidy jsou produkovány nejprve jako pre-peptidy a následně upraveny na prepeptidy a peptidy [8; 72].

#### Enterocin A

Enterocin A je bakteriocin, který produkuje bakteriocinogenní kmen *Enterococcus faecium* EFM01, izolovaný ze sýru, Z omáčky byl izolován *Enterococcus faecium* CTC492, z mléčných výrobků *Enterococcus faecium* DPC1146 a z černých oliv *Enterococcus faecium* BFE 900. Enterocin A má úzké antimikrobní spektrum orientované hlavně na *Listeria monocytogenes*. Dále je aktivní proti různým zástupcům *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Listeria monocytogenes* a *Listeria innocua*. Bylo zjištěno působení na enterokoky. Enterocin A pravděpodobně hraje důležitou roli při kontrole růstu *Listeria* spp. v přirozeném prostředí, obzvlášť ve fermentovaných potravinách. Mezi faktory, které mohou mít vliv na potenciální antilisteriální použití ve fermentovaných potravinách, patří vysoká specifita účinku enterocinu A na *Listeria monocytogenes* a široké spektrum aktivity od pH 4 až po pH 9 [10; 73].



#### 2.6.2.4 Lantibiotika produkovaná laktokoky

##### Lacticin 3147

Lacticin 3147 byl izolován z *Lactococcus lactis* DPC3147 a je tvořen dvěma podjednotkami (A<sub>1</sub> a A<sub>2</sub>), které byly zatím charakterizovány jen částečně. Obě složky jsou nutné pro plnou antagonistickou aktivitu vůči jiným mikroorganismům, která je výsledkem tvorby iontové specifických pórů v membráně grampozitivních buněk. Z *Lactococcus lactis* IFPL105 byl izolován totožný dvoupeptidový bakteriocin. Povaha každého peptidu je dána přítomností lanthioninu. Důležitý je i výskyt zbytků D-alaninu v obou podjednotkách. Lacticin 3147 inhibuje růst široké skupiny grampozitivních bakterií. Je účinný proti mnoha streptokokům a stafylokokům. Byla prokázána inhibice růstu streptokoků lacticinem 3147 při léčbě bovinní mastitidy. Lacticin 3147 je také účinný proti dalším zástupcům mikroorganismů (*Acetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*). Také inhibuje laktokoky používané při výrobě sýrů a je užitečný jako ochranná kultura v sýrech typu cottage. Genetické determinanty lacticinu jsou lokalizované na konjugativním plazmidu a jsou hlavně přeneseny na kmeny, které se používají při výrobě sýru čedaru. Výsledné sýry měly normální složení, ale neobsahovaly bakterie mléčného kvašení, které nejsou součástí startérových kultur (non-starter bakterie mléčného kvašení) při výrobě tohoto sýru [7; 8; 10].

##### Lactococcin MMFII

Lactococcin MMFII je produkován *Lactococcus lactis* MMFII, který byl izolován z mléčných výrobků v Tunisku. Izolovaný bakteriocin byl tepelně stabilní, pH rezistentní a citlivý na proteázu. Lactococcin MMFII účinkuje na kmeny *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Listeria innocua* [10; 74].

##### Nisin (E 234)

Nisin je posttranslačně modifikovaný protein složený z 34 aminokyselin a produkuje jej *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Bylo objeveno a charakterizováno nejméně 6 různých forem nisinu (určené jako A až E a Z) s tím, že nisin A je nejúčinnější typ. Nisin Z je přirozená varianta nisinu, která se liší od nisinu A substitucí zbytku histidinu na kyselinu asparagovou.

Nejznámější komerčně dostupnou formou nisinu je Nisaplin<sup>TM</sup>, který obsahuje 2,5 % nisinu A a převážně NaCl (77,5 %) a netučné sušené mléko (12 % proteinů a 6 % sacharidů) [10; 75].

Nisin obsahuje neobvykle posttranslačně modifikované aminokyseliny, thioéterové můstky lanthioninu a 3-methylanthioninu a nenasycený 2,3-didehydroalanin a 2,3-didehydrobutyryn. Tyto nenasycené nebo dehydratované zbytky charakterizují elektrofilní centra, která mohou reagovat s vedlejšími nukleofilními skupinami [10].

Nisin obvykle nemá účinek na gramnegativní bakterie, kvasinky a plísně, ačkoli gramnegativní bakterie mohou být citlivé na nisin při propustnosti vnější membrány, což může být způsobeno subletálním zahříváním, mrazením a chelatačními činidly. Napadá grampozitivní bakterie, které zahrnují bakterie mléčného kvašení, vegetativní patogeny jako *Listeria* (*L. innocua*, *L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welchimeri*), *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* a *Mycobacterium* a sporotvorné bakterie, *Bacillus* a *Clostridium*. Spóry bacilů a klostridií jsou na nisin citlivější než jejich vegetativní buňky. I když působení na spóry je sporostatické, ne sporocidní, tak pro inhibici spór je nutná neustálá přítomnost nisinu v prostředí. Spóry poškozené teplem mají podstatně zvýšenou citlivost k nisinu, takže nisin je účinný proti sporám v slabě kyselých a tepelně zpracovaných potravinách [10].

Nisin se používá při konzervaci tavených a čerstvých sýrů, tekutých vaječných produktů, zeleniny, dětských jídel, různých pasterizovaných mlék, salátových omáček a nakládaných potravin [7; 8]. Přídavek *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* do startovací kultury při výrobě sýru Gouda měl pozitivní vliv v prevenci nárůstu spór *Clostridium tyrobutyricum* a v inhibici *Listeria monocytogenes* v tvarohových sýrech a sýru Camembert. Ze šťávy z kyselého zelí byla za použití *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* zjištěna inhibice na nisin citlivého *Lactobacillus plantarum* a maximální růst *Leuconostoc mesenteroides*, který je vůči nisinu odolný. V masě není nisin úspěšným konzervantem, ale může přispět k redukci nitrátu použitého při konzervaci masných výrobků [7].

Nisin je často srovnáván s povrchově aktivními kationaktivními detergenty. Mechanismus, kterým nisin inhibuje produkty spór, je dosud nejasný. Mechanismus sporostatického účinku je odlišný od jeho baktericidního efektu na cytoplazmatickou membránu vegetativních buněk [10]. Bylo zjištěno, že sporostatický účinek nisinu je způsobený jeho vazbou na sulfhyd-

rylové skupiny proteinových zbytků. Nisin vytváří kanálky (póry), které procházejí celou cytoplazmatickou membránou a jsou plně propustné pro veškeré látky. Tím dochází ke ztrátě protonmotivní síly membránového potenciálu a dalších důležitých látek [75; 76].

Čistý nisin není škodlivý nebo jen mírně toxický. Jeho používání je schváleno ve více než 50 státech. V ČR je jeho používání povoleno pouze při výrobě pudिंगů ze semoliny nebo tapioky a sýrů [77]. Ve většině států je nisin jediným bakteriocinem, který se může používat jako konzervant potravin. Mezinárodní povolení nisinu bylo uděleno v roce 1969 Organizací OSN pro výživu a zemědělství (FAO) a Světovou zdravotnickou organizací (WHO). Další antibiotickou sloučeninou s podobným použitím je povrchově aktivní antimykotický pimarin. Výbor organizací doporučil maximální denní příjem čistého nisinu na 60 mg pro 70 kilogramů vážící osobu nebo 33000 jednotek. Mezi příklady produktů potravin, které mohou být nisinem upraveny, patří led na uskladnění čerstvých ryb, dětská strava, pečené výrobky, majonézy a mléčné koktejly [10].

#### 2.6.2.5 *Lantibiotika produkovaná ostatními bakteriemi*

##### Mesentericin Y105

Mesentericin Y105 je antilisterální bakteriocin třídy II produkovaný *Leuconostoc mesenteroides* Y105 přes transportní systém. Jedná se o nízkomolekulární peptid (složený z 36 aminokyselin), který je vysoce termostabilní a je také stabilní v alkalickém prostředí. Jeho primární struktura se podobá dalším bakteriocinům jako pediocin PA-1, sakacin P a curvacin A. Rozpouští složky plazmatické membrány *Listeria monocytogenes* a inhibuje transport leucinu a glutamové kyseliny. Také indukuje tok předem nahromaděných aminokyselin z buňky. Mesentericin Y105 má antagonistickou aktivitu proti grampozitivním bakteriím jako *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* a *Listeria ivanovii* a není aktivní proti *Lactococcus* [10; 78; 79].

##### Staphylococcin C55

Staphylococcin C55 byl izolován ze *Staphylococcus aureus* C55. Byly identifikovány strukturální geny kódující dva peptidy a předpokládaná struktura každého z nich dokazuje podstatnou shodnost s lacticinem 3147. Staphylococcin C55 je účinný proti 120 kmenům *Staphylococcus aureus* [8].

## 2.7 Aplikace bakteriocinů v potravinářství

V poslední době byl zaznamenán zvýšený zájem o nezávadnost a kvalitu potravin. Za kažení potravin jsou odpovědné základní fyzikální, chemické, enzymatické a mikrobiologické reakce v potravinách. K zabránění různých forem kažení a otrav potravin se používají různé konzervační techniky, zahrnující redukci teploty, vodní aktivity a pH, stejně jako přídavek konzervačních látek jako jsou antimykotika (natamycin), anorganické látky (sulfidy, nitrity) a organické složky (propionát, sorbát, benzoát). Tyto látky zpomalují nebo zamezují růstu mikroorganismů. Další technologie pro ochranu potravin zahrnují pasterizaci a sterilizaci zahříváním, stejně jako balení a aseptické zpracování pro omezení přístupu mikroorganismů do produktu [8; 19].

Se vzrůstajícím požadavkem na přírodnější a mikrobiálně bezpečnější produkty je zapotřebí nových ochranných technik. Mezi perspektivní konzervační technologie patří použití přírodních aditiv jako jsou lysozym vaječného bílku a bakteriociny bakterií mléčného kvašení (nisin) ke kontrole růstu a přežití nežádoucích mikroorganismů. Jako startovací kultury při fermentaci potravin se používají bakterie mléčného kvašení, které produkují bakteriociny a mohou být do potravin přidány pro kontrolu mikroorganismů během fermentace nebo k inhibici růstu organismů během skladování (tab. 4). Mezi tyto bakterie patří například *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* a *Enterococcus faecalis* [8; 19; 80].

Při ochraně potravin našly uplatnění i některé další dvoupeptidové bakteriociny. Mnoho výzkumů aplikace bakteriocinů se zaměřuje na použití bakteriocin-produkujících kultur ke kontrole růstu patogenních mikroorganismů, které se přenáší potravinami, jako například *Listeria monocytogenes* [8; 19]. *Listeria monocytogenes* představuje významná zdravotní rizika jako infekční činitel v potravinách (maso, mléčné a vaječné produkty a zelenina). Enterocin kontroluje růst tohoto patogenu v mnoha masných produktech jako jsou kuřecí prsa, šunka, vepřové maso a další. Lacticin 3147 také chrání sýry typu cottage a přírodní jogurty proti *Listeria monocytogenes* a *Bacillus cereus*. Je také vhodnou startovací kulturou pro výrobu čedaru [8].

Tabulka 4: Příklady aplikace bakteriocinů v potravinářství [80]

Bakteriocin	Aplikace	Závěr
Nisin A	začlenění nisinu do masa	redukce nežádoucích bakterií v masných výrobcích
	použití nisinu na kontrolu <i>L. monocytogenes</i> v sýrech typu ricotta	inhibice <i>L. monocytogenes</i> za 8 týdnů
Pediocin AcH	sprejování povrchu sýru Munster na začátku zrání	zabránění růstu <i>L. monocytogenes</i> a možné použití jako antilisteriální léčba
	použití <i>P. acidilactici</i> na inhibici <i>L. monocytogenes</i>	účinná redukce <i>L. monocytogenes</i> během výroby kuřecí omáčky
Enterocin 4	startovací kultura <i>Ent. faecalis</i> pro výrobu sýru Manchego	inhibice <i>L. monocytogenes</i> Ohio, ale ne <i>L. monocytogenes</i> Scott A
Piscicolin 126	kontrola <i>L. monocytogenes</i> v šunkové pastě	účinnější než komerčně dostupné bakteriociny
Lactocin 705	použití lactocinu 705 na redukci růstu <i>L. monocytogenes</i> v mletém hovězím mase	inhibice <i>L. monocytogenes</i> v mletém hovězím mase

Pro biokonzervaci se používají tři postupy aplikace bakteriocinů [10]:

1. Očkování potravin bakteriemi mléčného kvašení, které produkují bakteriociny ve výrobcích. Schopnost těchto bakterií růst a produkovat bakteriociny ve výrobcích je rozhodující pro jeho úspěšné použití.
2. Příklad čišťených nebo poločištěných bakteriocinů.
3. Použití výrobků, které byly již dříve fermentovány druhy produkující bakteriocin, jako příměs při zpracování potravin.

### 2.7.1 Biokonzervace masa

*Listeria monocytogenes* je grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní tyčinka, široce rozšířená v přirozeném prostředí. Může růst v rozmezí pH 4,1 až 9,6 a při teplotě od 0 do 45 °C. Kromě toho je i relativně rezistentní vůči vysušení a může růst při hodnotách vodní aktivity 0,9 [1]. Všudypřítomný druh *Listeria monocytogenes* je odolný i vůči mrazírenským teplotám a je schopen růst i v anaerobních podmínkách. Tento druh může vyvolat vážná onemocnění, u oslabených jedinců i smrt. Z tohoto důvodu se přítomnost *Listeria monocytogenes* v žádném případě netoleruje v potravinách připravených ke konzumaci. Bylo provedeno mnoho studií pro kontrolu *Listeria monocytogenes* v masných výrobcích, protože v masném průmyslu je její výskyt poměrně častý. Tato bakterie byla izolována ze syrového masa, z tepelně opracovaných masných výrobků a z výrobků připravených ke konzumaci [10; 81; 82].

Výsledky bakteriocin-produkujících kultur přidaných do syrového i zpracovaného masa se liší. V syrovém mase inhibují růst *Listeria monocytogenes* a *Listeria innocua*. U tepelně opracovaného masa hraje určitou roli i teplota skladování. Bylo zjištěno, že *Pediococcus acidilactici* JBL1095 inhibuje růst *Listeria monocytogenes* ve vakuově balených párcích při 25 °C. Při teplotě 4 °C jsou ochranné kultury neúčinné. Dále bylo zjištěno, že *Lactobacillus sakei* LB790, který produkuje sakacin P, neinhibuje růst *Listeria monocytogenes* v chlazených kuřecích řízcích skladovaných při 4 °C, ale při 10 °C už ano. Také *Carnobacterium maltaromaticum* inhibuje růst a významně redukuje počet různých zástupců *Listeria monocytogenes* ve vakuově balených párcích, které byly skladovány při chladírenských teplotách [19].

Za účelem snížení mikrobiální kontaminace masa byla zkoumána aktivita nisinu v koncentracích 400 IU/g a 800 IU/g a v kombinaci s 2% chloridem sodným na *Listeria monocytogenes* v mletém syrovém buvolím mase. Vzorčky syrového mletého masa byly naočkovány *Listeria monocytogenes* a uskladněny při 4 °C. Celkový počet *Listeria monocytogenes* v kontrolních vzorcích se zvýšil z 3,0 log<sub>10</sub> na 6,4 log CFU/g po 16 dnech skladování. Avšak nisin významně inhiboval růst *Listeria monocytogenes*. Přídavek nisinu na úrovni 400 IU/g prodloužil lag fázi *Listeria monocytogenes* a na úrovni 800 IU/g měl za následek výrazné snížení počtu *Listeria monocytogenes* oproti kontrolním vzorkům po 16 dnech uskladnění. Při zvýšení skladovací teploty na 37 °C byl inhibiční účinek nisinu méně

výrazný. Přídavek 2% chloridu sodného k nisinu zvýšil jeho účinnost při obou teplotách [10].

Za stejným účelem bylo naočkováno hovězí maso, a to *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium divergens* nebo *Listeria innocua* pro určení účinnosti nisinu k dezinfekci povrchu červených mas [10; 83]. Bylo zjištěno, že přídavek 10000 IU/ml nisinu do naočkované tepelně opracované vepřové svíčkové inhiboval růst *Listeria monocytogenes*, ale nikoliv *Pseudomonas fragi*. Dále bylo upozorováno, že nisin je účinnější v případě použití balení modifikovanou atmosférou (MAP, 100 % CO<sub>2</sub>, 80 % CO<sub>2</sub> + 20 % vzduchu). MAP a nisin (1000 nebo 10000 IU/ml) působily inhibičně na růst obou organizmů. Inhibiční efekt kombinace MAP/nisin byla zřetelnější při teplotě 4 °C než při 20 °C [10].

Rovněž byla určena antilisteriální aktivita nisinu A a pediocinu AcH při dekontaminaci uměle infikovaného syrového vepřového masa. Nisin A byl podstatně účinnější než pediocin AcH. Kromě toho nisin byl stabilnější než pediocin AcH. Pokles účinnosti, obzvláště pediocinu AcH, byl přisuzován rychlé degradaci bakteriocinu proteázami masa [10].

Kromě nisinu a pediocinu byly zkoumány další bakteriociny bakterií mléčného kvašení potenciálně využitelné ke konzervaci potravin. Byla zjištěna účinnost enterocinu CCM 4231 při kontrolní kontaminaci *Listeria monocytogenes* v suchých fermentovaných salámech Hornád. Po týdnu zrání salámu dosahoval počet *Listeria monocytogenes* (bez přídavku enterocinu) 10<sup>7</sup> CFU/g, zatímco v upraveném vzorku (s přídavkem enterocinu) byl počet bakterií 10<sup>4</sup> CFU/g. Dále bylo zjištěno, že sakacin K, bakteriocin produkovaný *Lactobacillus sakei* CTC494, inhibuje růst *Listeria innocua* ve vakuově baleném mase (drůbeží i vepřové maso) a ve výrobcích balených v modifikované atmosféře (syrové mleté maso). Byla také určena inhibiční schopnost látek podobných bakteriocinům, které produkuje *Carnobacterium piscicola* L103 proti *Listeria monocytogenes*. Lactocin 705, produkovaný *Lactobacillus casei* CRL 705, inhiboval růst *Listeria monocytogenes* v sekaném hovězím mase [10; 84].

V roce 1992 bylo prokázáno možné použití bakteriocinogenních kultur *Pediococcus acidilactici* (producent pediocinu AcH) na kontrolu růstu *Listeria monocytogenes* ve vakuově baleném hovězím mase. Když byl povrch masa naočkován *Listeria monocytogenes* a *Pediococcus acidilactici* a vakuově zabaleno, tak *Listeria monocytogenes* a pediokoky přežili v balíčcích při 4 °C, ale pediokoky neprodukovaly kyselinu a pediocin během skladování v chladu. Když byly tyto balíčky skladovány při teplotě 25 °C po dobu 8 dní, celkový počet

*Listeria monocytogenes* (bez přídavku pediokoků) vzrostl o 3,2 log<sub>10</sub> CFU/g. Pro srovnání byla *Listeria monocytogenes* inhibována očkováním pediokoků a průměrná redukce byla 2,7 log<sub>10</sub> CFU/g. Počátek produkce bakteriocinů se shoduje s brzkým logaritmickým růstem pediokoků a pokračuje pozdní logaritmickou fází [10; 85].

Při solení masa se běžně používají dusitany. Hlavním důvodem je stabilizace červené barvy masa a inhibice mikroorganismů způsobujících kažení potravinnebo produkci toxinů, například *Clostridium botulinum*. Nicméně dusitany mohou v mase reagovat se sekundárními aminy za vzniku karcinogenních nitrosaminů. Tento nepříznivý účinek dusitanů na zdraví inspiroval vědce k prozkoumání potenciálního použití bakteriocinů jako alternativu dusitanů. Bylo zjištěno, že kombinací 3000 IU/g nisinu a 40 ppm dusitanu dochází k téměř úplné inhibici růstu spór *Clostridium sporogenes* v suspenzi masa při teplotě 37 °C po dobu 56 dní. Avšak v další studii bylo zjištěno, že až do 22000 IU/g nisinu v kombinaci s 60 ppm dusitanu nedokázalo zabránit růstu spór tohoto mikroorganismu v suspenzi masa při pH 5,8. Bylo dokázáno, že kombinace nisinu s dusitany dokázala zpozdit tvorbu toxinu botulinu v emulzi z kuřecích párků (pH 5,9 až 6,2). Kontrolní vzorek bez přídavku konzervačních látek byl toxický během jednoho týdne, zatímco kombinace 4000 IU/g nisinu a 120 ppm dusitanu odsunula tvorbu toxinů na 5 týdnů [10; 80].

### 2.7.2 Biokonzervace mléčných výrobků

Bylo prokázáno, že mnoho nemocí způsobených konzumací některých mléčných výrobků (pasterované mléko, sýr) způsobila *Listeria monocytogenes*. Bylo zjištěno, že následné naočkování na nisin rezistentních druhů do trvanlivých sýrů typu cottage při pH 4,6 až 4,7 snížilo počet *Listeria monocytogenes* přibližně 10 krát během uchování při teplotě 20 °C po dobu 7 dnů. Přídavek nisinu (2000 IU/g) do sýrů typu cottage zvýšil stupeň inaktivace přibližně na 3-log<sub>10</sub> ve 3 dnech. Účinnost nisinu pro kontrolu *Listeria monocytogenes* v sýru typu ricotta byla stanovena na 70 dní při 6 až 8 °C. Přídavek nisinu (100 IU/g) účinně inhiboval růst *Listeria monocytogenes* po dobu 8 týdnů nebo i více. Doba inhibice byla závislá na typu sýra. Kontrolní vzorek sýra obsahoval nebezpečné počty organismů po 1 až 2 týdenním skladování. Jako složka pasterovaných sýrů nebo chlazených tavených sýrů se používá čedar obsahující nisin, který byl vyroben za pomoci laktokoků, které jej produkují. Nisin se běžně přidává do pasterovaných tavených sýrů, aby zamezil růstu spór klostridií, jako například *Clostridium tyrobutyricum*. V chlazených tavených sýrech nisin významně redu-



koval počet *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a spór *Clostridium sporogenes*. Dalším problémem při výrobě sýrů jsou klostridia doprovázená produkcí kyseliny máselné [10; 86; 87].

Lacticin 3147 byl aplikován pro kontrolu kvality čedarů během zrání pomocí redukujících kultur bakterií mléčného kvašení [88]. Sýry vyrobené pomocí lacticinu 3147 obsahovaly 100 krát méně kultur bakterií mléčného kvašení než sýry kontrolované po 6 měsících zrání. Kromě toho u sýrů vyrobených pomocí 3 přirozených druhů produkujících lacticin 3147 nebyly po stejné době prokázány startovací kultury bakterií mléčného kvašení. Výrobou sýrů typu cottage s přídavkem *Lactococcus lactis* DPC4275 byla populace *Listeria monocytogenes* redukována 1000 krát po jednom týdnu zrání. Nicméně počty *Listeria* v kontrolních sýrech, vyrobené startovacími kulturami neprodukující lacticin 3147 zůstaly nezměněné ( $10^4$  CFU/g). Transkonjugant produkující lacticin 3147 je používán jako ochranná kultura k inhibici *Listeria* u plísňových sýrů. Přítomnost producenta lacticinu 3147 na povrchu sýrů redukuje počet *Listeria monocytogenes* až 1000 krát [10, 88].

### 2.7.3 Biokonzervace mořských produktů

Účinnost bakteriocinů a ochranných kultur na kontrolu růstu *Listeria monocytogenes* ve vakuově balených lososech, kteří byli uzeni studeným kouřem, byla vysvětlena v několika studiích. Byl zkoumán inhibiční efekt sakacinu P anebo kultur *Lactobacillus sakei* (producent sakacinu P) proti *Listeria monocytogenes* v uzených lososech. Vzorky vakuově balených lososů byly inkubovány při teplotě 10 °C po dobu 4 týdnů. Sakacin P má hlavní inhibiční účinek na růst *Listeria monocytogenes*, zatímco kultury *Lactobacillus sakei* mají bakteriostatický účinek. Když byla k masu lososa přidána kultura *Lactobacillus sakei* společně se sakacinem P, došlo k baktericidnímu účinku na *Listeria monocytogenes*. Bylo dokázáno, že kmeny *Carnobacterium piscicola*, které neprodukují bakteriociny, jsou stejně účinné na inhibici *Listeria monocytogenes* ve vakuově balených uzených lososech jako kmeny téhož mikroorganismu, které bakteriociny produkují. Jedná se například o *Carnobacterium divergens*, který produkuje divercin V41. Zvýšení inhibičního efektu na *Listeria monocytogenes* je pravděpodobně způsobeno konkurenčním růstem *Carnobacterium piscicola*, který má za následek spotřebu esenciálních živin [10; 19].

Byl také zkoumán inhibiční účinek v uzeném lososu na *Listeria monocytogenes* kombinací nisinu s oxidem uhličitým při nízké teplotě. Přídavek nisinu (500 nebo 1000 IU/g) do masa

lososa, který byl zaočkován *Listeria monocytogenes* a se zpožděním uskladněn při teplotě 5 °C, nezabránil růstu *Listeria monocytogenes* v těchto vakuově balených výrobcích. Počet *Listeria monocytogenes* se zde zvýšil na 10<sup>8</sup> CFU/g za 8 dní, zatímco konzervování uzených lososů CO<sub>2</sub> mělo pro *Listeria monocytogenes* za následek prodloužení lag fáze na 8 dní a za 27 dní počet dosahoval 10<sup>6</sup> CFU/g. Přídavek nisinu k uzeným lososům, kteří jsou konzervováni CO<sub>2</sub>, způsobil redukci *Listeria monocytogenes* o 1- až 2-log<sub>10</sub> následovanou dlouhou lag fází [89].

Nasolení garnáti byli za účelem prodloužení doby použitelnosti ošetřeni s přídavkem sorbové a benzoové kyseliny. Zájem o tyto organické kyseliny vedl vědce k výzkumu možného použití bakteriocinů pro jejich konzervování. Účinnost nisinu Z, carnocinu UI49 a preparátů nezpracovaného bavaricinu A prodloužila dobu použitelnosti nasolených garnátů. Carnocin UI49 ve srovnání s kontrolou použitelnost neprodloužil (10 dní), zatímco bavaricin A prodloužil trvanlivost na 16 dní. Nisin Z prodloužil použitelnost 31 dní [10].

Rovněž byla zkoumána inhibice *Listeria monocytogenes* a mezofilních aerobních bakterií na pstruzích duhových, kteří byli uzení studeným kouřem a vakuově balení. K inhibici byl použit nisin, mléčnan sodný nebo kombinace obou látek. Vzorek pstruha byl skladován při teplotě 8 °C po dobu 17 dní nebo při 3 °C 29 dní. Nisin i mléčnan inhibovali v uzených rybách růst *Listeria monocytogenes*. Kombinace obou složek však byla ještě více účinnější a snížila počet *Listeria monocytogenes* z 3,3 na 1,8 log<sub>10</sub> CFU/g během 16 dní skladování při teplotě 8 °C. Ve vzorcích, které byly injektovány před uzením a které obsahovaly jak nisin tak mléčnan sodný, zůstal po 29 dnech a teplotě 3 °C počet *Listeria monocytogenes* téměř konstantní (4,7 až 4,9 log<sub>10</sub> CFU/g) [10; 90].

## ZÁVĚR

Antibiotika se používají se v humánní a veterinární medicíně. Aplikace antibiotik v potravinářství je problematická z důvodu vzniku možné rezistence.

Spotřebitelé si vybírají přirozené a čerstvé potraviny bez přídavku chemických látek. Proto byly zkoumány přirozené, ale účinné konzervační prostředky. Bakterie si během vývoje vyvinuly řadu mechanismů, kterými brání své životní prostředí a jeho zdroje. Podařilo se izolovat bakteriální protein, který slouží k biokonzervaci potravin. Jedná se o bakteriocin, baktericidní látku různé molekulové hmotnosti, která je schopna inhibice růstu příbuzných kmenů bakterií.

Bakteriociny mají široké využití. Používají se jak v potravinářství jako konzervovadla, tak i v medicíně jako baktericidní a antivirová léčiva, protože jsou tvořeny nepatogenními bakteriemi, které osidlují lidský organizmus. Po užívání antibiotik může dojít ke ztrátě těchto neškodných bakterií a tím přispět k napadení lidského organismu patogenními bakteriemi.

Nejvýznamnějším zástupcem lantibiotik je antibakteriální polypeptid nisin, který zabraňuje růstu nežádoucí konkurující mikroflóry při výrobě mléčných výrobků a ochraně proti sporám *Clostridium botulinum* v pasterovaných sýrech. Zajímavé je použití bakteriocinů proti listeriím (například nisin, sakacin A, divercin V41, pediociny, enterocin A), *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* a *Staphylococcus aureus*.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] GREENWORD, D., SLACK, R.C.B., PEUTHERER, J.F., a kol., Lékařská mikrobiologie, Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie, GRADA Publishing, Praha, 1999, 690 stran
- [2] TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L., Microbiology an Introduction, 9<sup>th</sup> ed., Pearson Benjamin Cummings, San Francisko, 2006
- [3] JULÁK, J., Úvod do lékařské bakteriologie, Nakladatelství Karolinum, UK v Praze, 2006, 404 stran
- [4] GILLOR, O., NIGRO, L.M., RILEY, M.A., Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials, Current Pharmaceutical Design, 2005, vol. 11, No. 8, p. 1067- 1075
- [5] GAJDŮŠEK, S., Mlékařství II., Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1998, str. 34
- [6] NES, I.F., DIEP, D.B., HAVARSTEIN, L.S., BRURBERG, M.B., EIJSINK, V., HOLO, H., Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria, Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 1996, vol. 70, No. 2-4, p. 113-128
- [7] CAPLICE, E., FITZGERALD, G.F., Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation, International Journal of Food Microbiology, 1999, vol. 50, p. 131-149
- [8] GARNEAU, S., MARTIN, N.I., VEDERAS, J.C., Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria, Biochemie, 2002, vol. 84, p. 577-592
- [9] NAIDU, A.S., Natural Food Antimicrobial Systems, 1.vydání, USA, CrC Press LLC, 2000, 818str.
- [10] CHEN, H., HOOVER, D.G., Bacteriocins and their Food Applications, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2002, vol. 2, p. 82-100
- [11] RILEY, M.A., WERTZ, J.E., Bacteriocins diversity“ ecological and evolutionary perspectives, Biochimie 2002, vol. 28, No. 4, p. 357-64

- [12] Význam a použití bakteriocinů [online]. [cit. 2007-12-2]. Dostupné na WWW: <http://www.gate2biotech.cz/vyznam-a-pouziti-bakteriocinu/>
- [13] HÉCHARD, Y., SAHL, H.G., Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria, *Biochemie*, 2002, vol. 84, p. 545-557
- [14] BRÖTZ, H., SAHL, H.G., New insights into the mechanism of action of lantibiotics-diverse biological effects by binding to the same molecular target, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, vol. 46, p. 1-6
- [15] KLEIN, C., KALETTA, C., ENTIAN, K.D., Biosynthesis of the Lantibiotic Subtilin Is Regulated by a Histidine Kinase/Response Regulator System, *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, vol. 59, No. 1, p. 296-303
- [16] OTTENWÄLDER, B., KUPKE, T., BRECHT, S., GNAU, V., METZGER, J., JUNG, G., GÖTZ, F., Isolation and Characterization of Genetically Engineered Gallidermin and Epidermin Analogs, *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, vol. 61, No. 11, p. 3894-3903
- [17] 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?, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, vol. 39, No. 3, p. 714-719
- [18] CHIKINDAS, M.L., NOVÁK, J., DRIESSEN, A.J.M., KONINGS, W.N., SCHILLING, K.M., CAUFIELD, P.W., Mutacin II, a Bactericidal Lantibiotic from *Streptococcus mutans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, vol. 39, No. 12, p. 2656-2660
- [19] DRIDER, D., FIMLAND, G., HÉCHARD, Y., McMULLEN, L.M., PRÉVOST, H., The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, vol. 70, No. 2, p. 564-582
- [20] BUDDE, B.B., HORNBAEK, T., JACOBSEN, T., BARKHOLT, V., KOCH, A.G., *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments, *International Journal of Food Microbiology*, 2003, vol. 83, p. 171-184

- [21] SAKAYORI, Y., MURAMATSU, M., HANADA, S., KAMAGATA, Y., KAWAMOTO, S., SHIMA, J., Characterization of *Enterococcus faecium* mutants resistant to mundticin KS, a class IIa bacteriocin, *Microbiology*, 2003, vol. 149, p. 2901-2908
- [22] VAN REENEN, C.A., CHIKINDAS, M.L., VAN ZYL, W.H., DICKS, L.M.T., Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*, *International Journal of Food Microbiology*, 2003, vol. 81, No. 1, p. 29-40(12)
- [23] HOLCK, A., AXELSSON, L., BIRKELAND, S.E., AUKRUST, T., BLOM, H., Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706, *Journal of General Microbiology*, 1992, vol. 138, p. 2715-20
- [24] YILDIRIM, Z., JOHNSON, M.G., Characterization and Antimicrobial Spectrum of Bifidocin B, a Bacteriocin Produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454, *Journal of Food Protection*, 1998, vol. 61, p. 47-51(5)
- [25] QUADRI, L.E.N., YAN, L.Z., STILES, M.E., VEDERAS, J.C., Effect of Amino Acid Substitutions on the Activity of Carnobacteriocin B2, *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, vol. 272, No. 6, p. 3384-3388
- [26] JOERGER, M.C., KLAENHAMMER, T.R., Characterization and Purification of Helveticin J and Evidence for a Chromosomally Determined Bacteriocin Produced by *Lactobacillus helveticus* 481, *Journal of Bacteriology*, 1986, vol. 167, No. 2, p. 439-446
- [27] BEUKES, M., BIERBAUM, G., SAHL, H.G., HASTINGS, J.W., Purification and Partial Characterization of a Murein Hydrolase, Millericin B, Produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061, *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, No. 1, p. 23-28
- [28] BAREFOOT, S.F., KLAENHAMMER, T.R., Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, vol. 45, No. 6, p. 1808-15

- [29]VANDEVEN, F.J.M., VANDENHOOVEN, H.W., KONINGS, R.N.H., HILBERS, C.W., NMR studies of lantibiotics, the structure of nisin in aqueous-solution, *European Journal of Biochemistry*, 1991, vol. 202, No. 3, p. 1181-1188
- [30]SLIJPER, M., HILBERS, C.W., KONINGS, R.N.H., VAN DE VEN, F.J.M., , NMR studies of lantibiotics, assignment of the <sup>1</sup>H-NMR spectrum of nisin and identification of interresidual contacts, *FEBS Letters* 252, 1989, p. 22-28
- [31]<http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Lanthionine.png>
- [32]BANERJEE, S., HANSEN, J.N., Structure and expression of the gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotics, *Journal of Biological Chemistry*, 1988, vol. 263, p. 9508-9514
- [33]MARCISSET, O., JERONIMUS-STRATINGH, M.C., MOLLET, B., POOLMAN, B., Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, p. 14277-14284
- [34]NES, I.G., HOLO, H., Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria, *Biopolymers*, 2000, vol. 55, p. 50-61
- [35]MOLL, G.N., ROBERTS, G.C.K., KONINGS, W.N., DRIESSEN, A.J.M., Mechanism of lantibiotic-induced pore formation, *Antonie van Leeuwenhoek*, 1996, vol. 69, p. 181-191
- [36]LUDTKE, S.J., HE, K., HELLER, W.T., HARROUN, T.A., YANG, L., HUANG, H.W., Membrane pores induced by magainin, *Biochemistry*, 1996, vol. 35, p. 13723-13728
- [37]McAULIFFE, O., RYAN, M.P., ROSS, R.P., HILL, C., BREEUWER, P., ABEE, T., Lacticin 3147, a broad spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, vol. 64, p. 439-445
- [38]SAHL, H.G., BIERBAUM, G., Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria, *Annual Review of Microbiology*, 1998, vol. 52, p. 41-79

- [39] RILEY, M.A., Molecular mechanisms of bacteriocin evolution, *Annual Review of Genetics*, 1998, vol. 32, p. 255–278
- [40] Colicins: From Wikipedia, the free encyclopedia [online]. [cit. 2008-3-31]. Dostupné na WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Colicins>
- [41] SANO, Y., KAGEYAMA, M., Genetic Determinant of Pyocin AP41 as an Insert in the *Pseudomonas aeruginosa* Chromosome, *Journal of bacteriology*, 1984, vol. 158, No. 2, p. 562-570
- [42] Microcins: From Wikipedia, the free encyclopedia [online]. [cit. 2008-3-31]. Dostupné na WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Microcins>
- [43] HUDECOVÁ, D., MAJTÁN, V., *Mikrobiológia I*, 1. vydání, Bratislava, STU, 2002, 189 str.
- [44] CAROLISEN-MACKAY, V., ARENDSE, G., HASTINGS, J.W., Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers, *International Journal of Food Mikrobiology*, 1997, vol. 34, pp. 1- 16
- [45] FRANZ, CH.M.A.P., GRUBE, A., HERRMANN, A., ABRIOUEL, H., STÄRKE, J., LOMBARDI, A., TAUSCHER, B., HOLZAPFEL, W.H., Biochemical and Genetic Characterization of the Two-Peptide Bacteriocin Enterocin 1071 Produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309, *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, vol. 68, No. 5, p. 2550–2554
- [46] BALLA, E., DICKS, L.M.T., DU TOIT, M, VAN DER MERWE, M.J., HOLZAPFEL, W.H., Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A a enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071, *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, No. 4, p. 1298-1304
- [47] CINTAS, L.M., CASAUS, P., HOLO, H., HERNANDEZ, P.E., NES, I.F., HAVARSTEIN, L.S., Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins, *Journal of Bacteriology*, 1998, vol. 180, No. 8, p. 1988-1994
- [48] FLYNN, S., VAN SINDEREN, D., THORNTON, G.M., HOLO, H., NES, I.F., COLLINS, J.K., Characterization of the genetic locus responsible for the pro-



- duction of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118, *Microbiology*, 2002, vol. 148, p. 973-984
- [49] MURIANA, P.M., KLAENHAMMER, T.R., Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088, *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, vol. 57, No. 1, p. 114-121
- [50] CUOZZO, S.A., SESMA, F., PALACIOS, J.M., DE RUÍZ HOLGADO, A.P., RAYA, R.R., Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705, *FEMS Microbiology Letters*, 2000, vol. 185, No. 2, p. 157-61
- [51] CASTELLANO, P., VIGNOLO, G., FARÍAS, R.N., ARRONDO, J.L., CHEHÍN, R., A molecular view by FTIR spectroscopy of the relationship between lactocin 705 and membranes: speculations on antimicrobial mechanism, *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, doi:10.1128/AEM.01293-06
- [52] CUOZZO, S.A., CASTELLANO, P., SESMA, F.J.M., VIGNOLO, G.M., RAYA, R.R., Differential roles of the two-component peptides of lactocin 705 in antimicrobial activity, *Current microbiology*, 2003, vol. 46, No. 3, p. 180-183
- [53] MOLL, G.N., VAN DEN AKKER, E., HAUGE, H.H., NISSEN-MEYER, J., NES, I.F., KONINGS, W.N., DRIESSEN, A.J.M., Complementary and Overlapping Selectivity of the Two-Peptide Bacteriocins Plantaricin EF and JK, *Journal of Bacteriology*, 1999, vol. 181, No. 16, p. 4848-4852
- [54] HALE, J.D.F., TING, Y.T., JACK, R.W., TAGG, J.R., KHENG, N.C., Bacteriocin (Mutacin) Production by *Streptococcus mutans* Genome Sequence Reference Strain UA159: Elucidation of the Antimicrobial Repertoire by Genetic Dissection, *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, vol. 71, No. 11, p. 7613-7617
- [55] McCORMICK, J.K., POON, A., SAILER, M., GAO, Y., ROY, K.L., McMULLEN, L.M., VEDERAS, J.C., STILES, M.E., VAN BELKUM, M.J., Genetic Characterization and Heterologous Expression of Brochocin-C, an Antibotulinal, Two-Peptide Bacteriocin Produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, vol. 64, No. 12, p. 4757-4766

- [56]GAO, Y., VAN BELKUM, M.J., STILES, M.E., The Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria Inhibits Antibacterial Activity of Brochocin-C, *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, No. 10, p. 4329–4333
- [57]OPPEGÅRD, C., ROGNE, P., EMANUELSEN, L., KRISTIENSEN, P.E., FIMLAND, G., NISSEN-MEYER, J., The Two-Peptide Class II Bacteriocins: Structure, Production, and Mode of Action, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2007, vol. 13, p. 210–219
- [58]MOLL, G., UBBINK-KOK, T., HILDENG-HAUGE, H., NISSEN-MEYER, J., NES, I.F., KONINGS, W.N., DRIESSEN, A.J., Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin, *Journal of Bacteriology*, 1996, vol. 178, No. 3, p. 600-605
- [59]KANATANI, K., OSHIMURA, M, SANO, K., Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, vol. 61, No. 3, p. 1061-1067
- [60]TAHARA, T., OSHIMURA, M, UMEZAWA, C., KANATANI, K., Isolation, partial characterization, and mode of action of Acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132, *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, vol. 62, No. 3, p. 892–897
- [61]LARSEN, A.G., VOGENSEN, F.K., JOSEPHSEN, J., Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401, *Journal of applied bacteriology*, 1993, vol. 75, No. 2, p. 113-122
- [62]VERLUYTEN, J., MESSENS, W., DE VUYST, L., Sodium Chloride Reduces Production of Curvacin A, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus curvatus* Strain LTH 1174, Originating from Fermented Sausage, *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70, No. 4, p. 2271-2278
- [63]TICHACZEK, P.S., VOGEL, R.F., HAMMES, W.P., Cloning and sequencing of curA encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174, *Archives of microbiology*, 1993, vol. 160, No. 4, p. 279-283

- [64] BONADÉ, A., MURELLI, F., VESCOVO, M., SCOLARI, G., Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*, Letters in Applied Microbiology, 2001, vol. 33, p.153-158
- [65] MØRTVEDT, C.I., NISSEN-MEYER, J., SLETTEN, K., NES, I.F., Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* L45, Applied and Environmental Microbiology, 1991, vol. 57, No. 6, p. 1829–1834
- [66] MØRTVEDT-ABILDGAARD, C.I., NISSEN-MEYER, J., JELLE, B., GRENOV, B., SKAUGEN, M., NES, I.F., Production and pH-Dependent Bactericidal Activity of Lactocin S, a Lantibiotic from *Lactobacillus sakei* L45, Applied and Environmental Microbiology, 1995, vol. 61, No. 1, p. 175–179
- [67] GONZALEZ, B., GLAASKER, E., KUNJI, E.R.S., DRIESSEN, A.J.M., SUAREZ, J.E., KONINGS, W.N., Bactericidal Mode of Action of Plantaricin C, Applied and Environmental Microbiology, 1996, vol. 62, No. 8, p. 2701-2709
- [68] TURNER, D.L., BRENNAN, L., MEYER, H.E., LOHAUS, CH., SIETHOFF, CH., COSTA, H.S., GONZALEZ, B., SANTOS, H., SUÁREZ, J.E., Solution structure of plantaricin C, a novel lantibiotic, European Journal of Biochemistry, 1999, vol. 264, No. 3, p. 833-839
- [69] HOLO, H., JEKNIC, Z., DAESCHEL, M., STEVANOVIC, S., NES, I.F., Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics, Microbiology, 2001, vol. 147, No. 3, p. 643-51
- [70] STOFFELS, G., GUTHMUNSDOTTIR, A., ABEE, T., Membrane-associated proteins encoded by the nisin gene cluster may function as a receptor for the lantibiotic carnocin UI49, Microbiology, 1994, vol. 140, p. 1443-1450
- [71] METIVIER, A., PILET, M.F., DOUSSET, X., SOROKINE, O., ANGLADE, P., ZAGOREC, M., PIARD, J.C., MARION, D., CENATIEMPO, Y., FREMAUX, C., Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization, Microbiology, 1998, vol. 144, p. 2837-2844

- [72] HAAS, W., SHEPARD, B.D., GILMORE, M.S., Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction, *Letters to Nature*, 2002, vol. 415, p. 84-87
- [73] ENNAHAR, S., DESCHAMPS, N., Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 2000, vol. 88, No. 3, p. 449-457
- [74] FERCHICHI, M., FRÉRE, J., MABROUK, K., MANAI, M., Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product, *FEMS Microbiology Letters*, 2001, vol. 205, No. 1, p. 49-55
- [75] Nisin: Z Wikipedie, otevřená encyklopedie [online]. [cit. 2008-5-16]. Dostupné na WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Nisin>
- [76] TYÖPPÖNEN, S., PETÄJÄ, E., MATTILA-SANDHOLM, T., Bioprotectives and probiotics for dry sausages, *International Journal of Food Microbiology*, 2003, vol. 83, p. 233–244
- [77] E 234 – Nisin [online]. Dostupné na WWW: [http://www.bezkonzervantu.cz/ecka-detail/E\\_234.html](http://www.bezkonzervantu.cz/ecka-detail/E_234.html)
- [78] BIET, F., BERJEAUD, J.M., WOROBO, R.W., CENATIEMPO, Y., FREMAUX, C., Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway, *Microbiology*, 1998, vol. 144, p. 2845-2854
- [79] MAFTAH, A., RENAULT, D., VIGNOLES, C., HÉCHARD, Y., BRESSOLLIER, P., RATINAUD, M.H., Y CENATIEMPO, Y., JULIEN, R., Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y105, *Journal of bacteriology*, 1993, vol. 175, No. 10, p. 3232–3235
- [80] CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F., CHIKINDAS, M.L., Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *International Journal of Food Microbiology*, 2001, vol. 71, p. 1–20

- [81] Kolektiv autorů ICMSF, Microorganisms in foods, Microbial Ecology of Food Commodities, 6<sup>th</sup> ed., Kluwer Academic New York, 2005, 763 stran
- [82] RYSER, E.T., MARTH E.H., *Listeria*, listeriosis and food Safety, New York: Marcel Dekker, 1999, 2nd ed., Inc. 738 p.
- [83] CUTTER, C.N., SIRAGUSA, G.R., Decontamination of beef carcass tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer, *Food Microbiology*, 1994, vol. 11, p. 481-9
- [84] HUGAS, M., PAGÉS, F., CARRIGA, M., MONFORT, J.M., Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC 494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres, *Food Microbiology*, 1998, vol. 15, p. 639-50
- [85] DEGNAN, A.J., YOUSEF, A.E., LUCHANSKY, J.B., Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners, *Journal of Food Protection*, 1992, vol. 55, p. 98-103
- [86] SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W.H., Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods, *Trends in Food Science and Technology*, 1996, vol. 7, p. 158-64
- [87] FERREIRA, M.A.S.S., LUND, B.M., The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese, *Letters in Applied Microbiology*, 1996, vol. 22, p. 433-8
- [88] ROSS, R.P., GALVIN, M., McAULIFFE, O., MORGAN, S.M., RYAN, M.P., TWOMEY, D.P., MEANEY, W.J., HILL, C., Developing applications for lactococcal bacteriocins, *Antonie van Leeuwenhoek*, 1999, vol. 76, p. 337-46
- [89] NILSON, L., HUSS, H.H., GRAM, L., Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere, *International Journal of Food Microbiology*, 1997, vol. 38, p. 217-27
- [90] NYKÄNEN, A., WECKMAN, K., LAPVETELÄINEN, Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate, *International Journal of Food Microbiology*, 2000, vol. 61, p. 63-72

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Struktura a sekvence aminokyselin u lantibiotik typu A a B.....	15
Obrázek 2: Lanthionin .....	19
Obrázek 3: Model zániku buňky.....	20
Obrázek 4: Tvorba pórů kationaktivními peptidy, které nevyžadují receptor.....	21

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Příklady dalších bakteriocinů třídy I [15; 16; 17; 18].....	16
Tabulka 2: Příklady bakteriocinů třídy II [19; 20; 21; 22; 23; 24; 25].....	17
Tabulka 3: Příklady bakteriocinů třídy III [26; 27; 28].....	18
Tabulka 4: Příklady aplikace bakteriocinů v potravinářství [80].....	37