

Bakteriocíny produkované baktériami mliečného kvasenia

ANDREA BILKOVÁ, HANA KIŇOVÁ SEPOVÁ, FRANTIŠEK BILKA, ANDREA BALÁŽOVÁ
Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv

Došlo 27. ledna 2011 / Prijato 2. února 2011

SÚHRN

Bakteriocíny produkované baktériami mliečného kvasenia

Medzi baktérie mliečného kvasenia patrí niekoľko rodov gram pozitívnych baktérií, ktoré produkujú štruktúrne rôznorodé antimikróbne pôsobiace látky. V súčasnosti sú spomedzi nich v centre vedeckého záujmu práve bakteriocíny. Jedná sa o antimikróbne látky proteínovej povahy, ktoré sú produkované ribosomálne a majú zvyčajne úzke spektrum účinku na inhibíciu rastu baktérií. Podľa štruktúry a cieľa účinku ich rozdeľujeme do štyroch tried, ale existujú návrhy na vypracovanie nového spôsobu klasifikácie. Najzaujímavejšou a v praxi najvyužívateľnejšou triedou sú lantibiotiká, medzi ktoré patrí aj komerčne najpoužívanejší a najpreštudovanejší bakteriocín, nizin. Nepatogénny charakter baktérií mliečného kvasenia je výhodný pre použitie nimi produkovaných bakteriocínov pri konzervovaní potravín, ako aj vo výživových doplnkoch alebo vo veterinárnej medicíne.

Kľúčové slová: baktérie mliečného kvasenia – probiotiká – bakteriocíny – lantibiotiká – nizin – biokonzervácia

Čes. slov. Farm. 2011; 60, 65–72

SUMMARY

Bacteriocins produced by lactic acid bacteria

Lactic acid bacteria comprise several genera of gram-positive bacteria that are known for the production of structurally different antimicrobial substances. Among them, bacteriocins are nowadays in the centre of scientific interest. Bacteriocins, proteinaceous antimicrobial substances, are produced ribosomally and have usually a narrow spectrum of bacterial growth inhibition. According to their structure and the target of their activity, they are divided into four classes, although there are some suggestions for a renewed classification. The most interesting and usable class are lantibiotics. They comprise the most widely commercially used and well examined bacteriocin, nisin. The non-pathogenic character of lactic acid bacteria is advantageous for using their bacteriocins in food preservation as well as in feed supplements or in veterinary medicine.

Key words: lactic acid bacteria – probiotics – bacteriocins – lantibiotics – nisin – biopreservation

Čes. slov. Farm. 2011; 60, 65–72

Má

Úvod

Pre schopnosť pozitívne modulovať imunitný systém hostiteľa a ovplyvniť zloženie jeho osídlenia mikroorganizmami v prospech užitočných druhov, sú mnohé druhy baktérií mliečného kvasenia hojne využívané v probiotických prípravkoch. Medzi najvýznamnejšie rody baktérií mliečného kvasenia patria

Enterococcus, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*, ktorých zástupcovia produkujú rôzne antimikróbne pôsobiace látky. Antibakteriálnou látkou, charakteristickou pre všetky baktérie mliečného kvasenia, je kyselina mliečna. Laktát je u týchto mikroorganizmov konečným metabolitom odbúravania sacharidov. Popri kyseline mliečnej vznikajú pri fermentácii sacharidov aj iné

Adresa pre korešpondenciu:

Mgr. Andrea Bilková, PhD.
Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv FaF UK
Kalinčiaková 8, 832 32 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: bilkova@fpharm.uniba.sk

Tab. 1. Príklady niektorých bakteriocínov, produkovaných BMK, zaradených do tried podľa Klaenhammera ¹¹⁾

Trieda	Podtrieda	Bakteriocín	Producent	Spektrum účinku	Literárny zdroj
I	Ia	nizín	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	baktericídne na BMK, <i>S. aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., vegetatívne bunky <i>Bacillus</i> spp. a <i>Clostridium</i> spp.	19, 21, 22, 23, 28
		salivaricín A	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	3
		lakticín 481	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 481	BMK, <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	11
		mutacín I	<i>Streptococcus mutans</i>	mnohé G ⁺ baktérie vrátane iných streptokokov	19
	Ib	mersacidín	<i>Bacillus</i> sp. HIL Y-85,54728	<i>Staphylococcus simulans</i> , <i>S. aureus</i>	18, 19
		lakticín 3147	<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Propionibacterium acnes</i>	3, 35
		cytolyzín	<i>Enterococcus faecalis</i>	mnohé G ⁺ baktérie, eukaryotické bunky vrátane ľudských	3, 10
II	IIa	pediocín PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	18, 43, 44
		enterocín P	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. botulinum</i>	18
		bavaricín A	<i>Lactobacillus bavaricus</i>	<i>Listeria</i> spp.	18
		bavaricín MN	<i>Lactobacillus sake</i>	<i>Listeria</i> spp.	18
	IIb	laktacín F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. helveticus</i>	11, 18
		plantaricín S	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>S. aureus</i> (?)	11, 18
		enterocín L50	<i>Enterococcus faecium</i>	mnohé BMK	11
	IIc	gasericín A	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>S. aureus</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. botulinum</i>	9
		reutericín 6	<i>Lactobacillus reuteri</i>	iné laktobacily	11
III	helveticín J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> a <i>bulgaricus</i>	11	
	lacticin A	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	11	
	acidophilucin A	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. casei</i>	29	
IV	leukonocín S	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>C. botulinum</i>	11	

Podtrieda IIc je zaradená do tabuľky podľa Cottera a kol. ³²⁾; BMK – baktérie mliečného kvasenia

antimikróbne pôsobiace organické kyseliny, ako napr. kyselina octová a propiónová. Niektoré kmene druhu *Lactobacillus reuteri* sú schopné využívať glycerol ako akceptor protónov vodíka, pričom vzniká antibakteriálna látka reuterín (3-hydroxypropiónaldehyd) ¹⁾. Iné kmene tohto druhu sa vyznačujú produkciou sekundárneho metabolitu reutericyklínu, prvého objaveného antibiotika, produkovaného baktériami mliečného kvasenia ²⁾. Okrem spomínaných látok sú baktérie mliečného kvasenia významné pre produkciu bakteriocínov. Spomedzi gram pozitívnych baktérií sú ich najproduktívnejšou skupinou.

Bakteriocíny

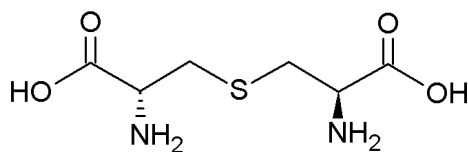
Bakteriocíny sú peptidy alebo proteíny s antimikróbnu aktivitou syntetizované na ribozómoch baktérií. Jedná sa o pomerne rôznorodú skupinu látok, pričom producent má voči nim vyvinutú špecifickú rezistenciu. Ich spoločným ukazovateľom je relatívne úzke antimikróbne spektrum účinku a pomerne vysoká

teplotná a pH stabilita ³⁾. Pravdepodobne až 99 % všetkých baktérií je schopných produkovať aspoň jeden bakteriocín, ale ich tvorba je zatiaľ málo preskúmaná ⁴⁾. Prvý bakteriocín bol objavený v roku 1925. Išlo o kolicín, ktorý bol pomenovaný podľa producenta – *Escherichia coli* ⁵⁾. V súčasnosti je známych približne 200 bakteriocínov ⁶⁾. Celú skupinu môžeme rozdeliť na dve veľké podskupiny: bakteriocíny produkované gram pozitívnymi (G⁺) baktériami a bakteriocíny produkované gram negatívnymi (G⁻) baktériami. Zásadným rozdielom medzi týmito podskupinami je počet génov zapojených do ich biosyntézy. V prípade bakteriocínov G⁺ baktérií je do biosyntézy zapojených oveľa viac génov, ako je tomu u bakteriocínov G⁻ baktérií ⁷⁾. Zatiaľ čo u G⁺ baktérií sú tieto gény zoskupené do klastrov po 8–12, u G⁻ baktérií (napr. kolicíny *E. coli*), je klaster tvorený len 2–3 génmi, podieľajúcimi sa na ich produkcii ⁸⁾.

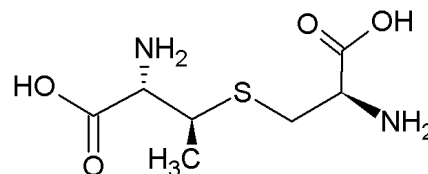
Spomedzi bakteriocínov produkovaných G⁺ baktériami sú najlepšie preskúmané bakteriocíny baktérií mliečného kvasenia. Tieto látky nachádzajú dôležité uplatnenie v potravinárstve pri fermentácii a konzervácii

mäsa či mlieka⁹⁾. Líšia sa v spektre baktérií, voči ktorým pôsobia, ale vo všeobecnosti sú účinné voči G⁺ druhom baktérií s nízkym obsahom GC motívov v genóme. Baktericídna aktivita voči G⁻ baktériám bola dokázaná iba v prípadoch, keď tieto mali porušenú integritu vonkajšej membrány, napríklad účinkom chelatačných činidiel (EDTA)¹⁰⁾. Klaenhammer¹¹⁾ rozdelil bakteriocíny baktérií mliečného kvasenia do štyroch tried, ktoré sa ďalej členia na podtriedy (tab. 1).

Trieda I, lantibiotiká, zahŕňa malé (< 5 kDa), posttranslačne modifikované peptidy o dĺžke 19–38 aminokyselín¹²⁾, ktoré sa vyznačujú nielen antibakteriálnymi, ale aj antivírusovými a protizápalovými aktivitami¹³⁾. Súčasťou ich polypeptidových reťazcov sú netypické aminokyseliny lantionín a β-metyllantionín (obr. 1). Tieto netypické aminokyseliny sa podieľajú na tvorbe kovalentných tioéterových väzieb medzi aminokyselinami, ktoré vedú k formovaniu vnútorných kruhov v rámci polypeptidového reťazca. To dáva molekulám lantibiotík charakteristickú cyklickú



1



2

Obr. 1. Štruktúra lantionínu – 1, β-metyllantionínu – 2

štruktúru. Táto štruktúra im zabezpečuje vyššiu biologickú aktivitu a proteolytickú stabilitu v porovnaní s lineárnymi peptidmi¹³⁾. Lantibiotiká môžu obsahovať aj ďalšie netypické aminokyselinové zvyšky (dehydroalanín, dehydrobutyrín), ktoré vznikajú posttranslačnými modifikáciami¹⁰⁾. Lantionín a β-metyllantionín takisto vznikajú v rámci posttranslačných modifikácií v dvoch enzýmovo katalyzovaných reakciách: najprv sa uskutoční dehydratácia Ser alebo Thr zvyšku a potom intramolekulová adícia tiolovej skupiny Cys na dehydratovanú aminokyselinu. Výsledkom je krížová tioéterová väzba v polypeptidovom reťazci lantibiotika¹⁴⁾. Dnes sú známe tri mechanizmy tvorby tioéterových väzieb v lantibiotikách¹⁵⁾. Pri prvom spôsobe LanB dehydratázy konvertujú Ser resp. Thr zvyšky nachádzajúce sa v prekurzorových peptidoch na dehydroalanín (Dha), resp. (Z)-dehydrobutyrín (Dhb). Následne sú za katalýzy LanC cyklázy intramolekulovou Michaelovou adíciou Cys tiolov na Dha alebo Dhb formované typické lantionínové (Lan, vznikajú zo Ser) a metyllantionínové (MeLan, vznikajú z Thr) tioéterové krížové väzby. Pri druhom spôsobe sú lantibiotiká produkované bifunkčnými modifikačnými enzýmami LanM, ktoré sú zodpovedné za dehydratáciu aj cyklizáciu¹⁵⁾. Goto a kol.¹³⁾ popísali tretí spôsob tvorby lantibiotík, ktorý je katalyzovaný novoobjaveným typom lantionínsyntetáz. Tieto enzýmy nazvali LanL a pozostávajú z troch samostatných katalytických domén: Ser/Thr kinázovej domény, fosfoSer/Thr

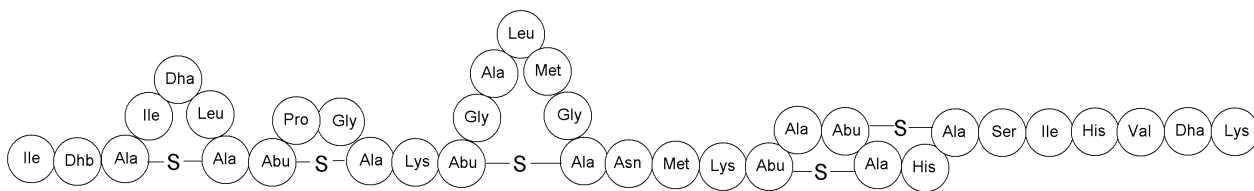
lyázovej domény a cyklázovej domény, podobnej LanC. Proteínkinázová doména zabezpečuje vznik dehydratovaných aminokyselín fosforyláciou Ser a Thr zvyškov, lyázová doména eliminuje fosfát a cyklázová doména katalyzuje pripojenie Cys zvyškov k dehydratovaným aminokyselinám a vznik charakteristických tioéterových kruhov¹³⁾.

Lantibiotiká sú syntetizované v neaktívnej forme s N-terminálnou signálnou sekvenciou, ktorá je počas maturácie z molekuly odštiepená a následne sa uvoľní aktívny peptid¹⁶⁾. Ich produkcia je regulovaná stratégiou „quorum sensing“. To znamená, že antimikróbný peptid slúži ako signálna molekula, na základe ktorej je kontrolovaná hustota bakteriálnej populácie, a zároveň slúži ako spúšťač regulačného systému, ktorý indukuje jeho vlastnú expresiu¹⁷⁾.

Na základe štruktúry a funkčných vlastností môžeme bakteriocíny I. triedy zaradiť do dvoch podtried.

Bakteriocíny **podtriedy Ia** majú kladný náboj a sú amfifílné¹⁸⁾. Do tejto podtriedy patria napr. nizín,

salivaricín A, lakticín 481, mutacín¹⁹⁾. Ako prvý z nich bol popísaný nizín v roku 1928 Rogersom²⁰⁾ a v súčasnosti patrí medzi najčastejšie používané komerčne dostupné bakteriocíny. Využíva sa vo viac ako 40 krajinách pri spracovaní syra a iných mliečnych produktov a pri konzervovaní potravín už vyše 50 rokov^{21–23)}. V praxi sa používa pod označením E234. Produkujú ho niektoré kmene *Lactococcus lactis* a pôsobí baktericídne na väčšinu baktérií mliečného kvasenia, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., vegetatívne bunky *Bacillus* spp. a *Clostridium* spp. Molekula nizínu pozostáva z 34 aminokyselinových zvyškov a má pentacyklickú štruktúru s jedným lantionínovým zvyškom v kruhu A a štyrmi β-metyllantionínovými zvyškami v kruhoch B, C, D a E (obr. 2)^{24–26)}. Momentálne je známych šesť rôznych molekúl nizínu, ktoré sa líšia v primárnej štruktúre proteínu: nizín A, nizín F, nizín Q, nizín U, nizín U2 a nizín Z²⁷⁾. Nizín využíva najmenej dva mechanizmy účinku. Prvý spočíva v tvorbe pórov v cytoplazmatickej membráne atakovanej bunky. Pri mikromolárnych koncentráciách nizínu sa na umiestnených membránach tvoria tzv. „non-targeted“ póry. V prípade týchto pórov molekula nizínu interaguje svojou polárnou časťou molekuly (C-koniec) iónovými silami s polárnou hlavičkou fosfolipidov membrány, čo spôsobí lokálne narušenie fosfolipidovej dvojvrstvy a hydrofóbna časť molekuly (N-koniec) sa môže zasunúť do vnútra membrány. Následne sa C-koniec nizínu



Obr. 2. Primárna štruktúra nizínu. Dha – dehydroalanín, Dhb – dehydrobutyrín, Abu – kyselina 2-aminobutyrová (podľa Cottera a kol.)³²⁾

translokuje z vonkajšej strany membrány na vnútornú. Na krátky čas (rádovo v milisekundách) sa vytvorí pór, dôsledkom čoho je strata membránového potenciálu a únik malých metabolitov (napr. ATP a aminokyselín) z bunky. Pretože nizín zabíja baktérie aj pri nanomolárnych koncentráciách, musí existovať aj iný mechanizmus tvorby pórov. Model takéhoto mechanizmu si vyžaduje prítomnosť cieľovej molekuly, na ktorú sa nizín špecificky naviaže. Touto molekulou je membránovo viazaný lipid II, ktorý je prekursorom peptidoglykánu. Nizín N-koncom svojej molekuly interaguje s lipidom II, čím príde ku konformačnej zmene v molekule, ktorá umožní inzerciu C-koncovej časti do membrány a vznik póru. Interakcia nizínu s lipidom II stabilizuje transmembránovú orientáciu nizínu. Navyše, väzbou nizínu na lipid II sa inhibuje aj syntéza peptidoglykánu.

Okrem týchto dvoch mechanizmov u citlivých kmeňov stafylokokov nizín indukuje aj ich autolýzu, výsledkom ktorej je masívna degradácia bunkovej steny. Deje sa tak vďaka nizínom navodenému uvoľneniu enzýmov N-acetylmuramoyl-L-alanínamidázy a N-acetylglukozaminidázy. Tieto dva enzýmy sú silné kationové proteíny, viazané elektrostatickými silami na bunkovú stenu. Silná väzba na membránu ich udržuje v inaktívnom stave – do aktívneho stavu sa dostanú práve po uvoľnení účinkom nizínu. Mechanizmy účinku nizínu sú podrobne popísané v prácach Héchara a Sahla¹⁸⁾ a Bauera a Dicka²⁸⁾.

V skupine génov pre biosyntézu nizínu boli identifikované popri géne pre tvorbu prepeptidu (*nisA*) aj gény pre enzýmy zabezpečujúce modifikáciu aminokyselín (*nisB*, *nisC*), odštiepenie vedúceho peptidu (*nisP*), sekréciu (*nisT*), imunitu (*nisI*, *nisFEG*) a dva gény regulujúce expresiu (*nisR*, *nisK*)²⁹⁾. Biosyntéza nizínu je regulovaná dvojzložkovým systémom, ktorý pozostáva z proteínového receptora pre membránovo viazanú histidínkinázu NisK a regulátora NisR. Odpoveď regulačného systému na zvýšenú extracelulárnu hladinu nizínu sa prejaví vo zvýšení expresie génov zodpovedných za imunitu (t.j. odolnosť samotného producenta na ním produkovaný nizín), syntézu a posttranslačné úpravy tohto lantibiotika³⁰⁾. Uvedený regulačný mechanizmus je základom pre vyrovnaný expresný systém indukovaný nizínom („*nisin-induced controlled expression system*“, NICE)³¹⁾.

Podtrieda Ib obsahuje globulárne peptidy bez náboja alebo s negatívnym nábojom (napr. cinamycín, mersacidín, aktagardín, lakticín 3147)³³⁾. Pôvodne sa

predpokladalo, že lantibiotiká podtriedy Ib účinkujú prostredníctvom inhibície enzýmov, zapojených do biosyntézy bunkovej steny baktérií. Neskôr sa ukázalo, že niektoré z nich majú podobne ako lantibiotiká podtriedy Ia kombinovaný mechanizmus účinku, t.j. inhibujú syntézu bunkovej steny a zároveň sa podieľajú na tvorbe pórov v cytoplazmatickej membráne. To pomáha vysvetliť ich mimoriadne vysokú aktivitu, niektoré sú účinné už v nanomolárnej koncentrácii. Cieľovou molekulou mersacidínu, aktagardínu a lakticínu 3147 je lipid II, v prípade cinamycínu podobných lantibiotík ako ich väzbové miesto slúži membránový fosfolipid fosfatidyletanolamín³⁴⁾.

In vitro pokusy ukázali, že dvojpeptidový bakteriocín lakticín 3147 je účinný voči *S. aureus* (vrátane metilín–oxacilín rezistentných kmeňov), enterokokom (vrátane enterokokov rezistentných na vankomycín), streptokokom (*Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. mutans*), *Clostridium botulinum* a *Propionibacterium acnes*³⁵⁾. Lakticín 3147 pôsobí prostredníctvom vzájomnej kooperácie aktivity oboch lantionín-obsahujúcich peptidov, pričom oba tieto peptidy sú potrebné pre zabezpečenie optimálnej aktivity bakteriocínu³⁶⁾. Šesť génov zabezpečujúcich produkciu lakticínu 3147 je lokalizovaných na prenosnom plazmide pMRC01 so známou sekvenciou nukleotidov (60,2 kb). Produkty troch z nich sú zodpovedné za posttranslačné úpravy, konkrétne dehydratáciu a tvorbu Lan kruhov, a za export lakticínu 3147 z bakteriálnej bunky³⁷⁾. Ďalšie dva gény kódujú malé prepeptidy, pravdepodobne tiež zohrávajúce úlohu v tvorbe lantionínových kruhov^{11, 38)}. Funkcia šiesteho génu zatiaľ nie je objasnená³⁷⁾.

Cytolyzín, enterokokálne dvojpeptidové lantibiotikum, vykazuje cídnu aktivitu voči širokému spektru bunkových typov, t.j. nielen voči mnohým G⁺ baktériám, ale aj voči eukaryotickým bunkám vrátane ľudských, hovädzím a konským erytrocytom, polymorfonukleárnym leukocytom, bunkám črevného epitelu a i.¹⁰⁾

Do **triedy II** sú začlenené malé (< 10 kDa), termostabilné, lantionín neobsahujúce peptidy, ktoré nepodliehajú posttranslačnej modifikácii. Väčšina z nich spôsobuje zvýšenie permeability cytoplazmatickej membrány cieľovej bunky s následným únikom molekúl z cytoplazmy. Aktívne sú už v nanomolárnych koncentráciách. Do **podtriedy IIa** patrí pediocín PA-1 a jemu podobné peptidy, napr. enterocín P, bavaricín A, bavaricín MN a i.^{19, 39, 40)}. Ich antimikróbné spektrum

účinku je úzke, ale všetky vykazujú vysokú špecifickú aktivitu voči potravinovému patogénu *Listeria monocytogenes*¹⁸⁾. Tieto peptidy majú konzervovanú sekvenciu na N-konci – „pediocínový box“ (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val) a dva cysteíny umiestnené v N-terminálnej časti peptidu tvoriace disulfidový mostík. Mechanizmus interakcie týchto bakteriocínov s membránou atakovanej bunky nie je zatiaľ známy. Jedným z možných vysvetlení je interakcia pozitívne nabitých a polárnych aminokyselinových zvyškov bakteriocínov podtriedy IIa s aniónmi fosfolipidov v cytoplazmatickej membráne, avšak detaily tejto interakcie neboli dosiaľ objasnené⁴¹⁾. Predpokladá sa aj, že prítomnosť „pediocín boxu“ v molekule bakteriocínu je zodpovedná za nešpecifickú väzbu bakteriocínu na povrch cieľovej bunky. C-terminálny koniec peptidu je menej konzervovaný a má hydrofóbny alebo amfifilný charakter. Vďaka tomu pravdepodobne penetruje do hydrofóbných častí membrány cieľovej bunky a spôsobuje uvoľňovanie vnútorného obsahu bunky⁴²⁾. Typickým bakteriocínom podtriedy IIa je pediocín PA-1. Je produktom *Pediococcus acidilactici* a pozostáva zo 44 aminokyselinových zvyškov (Mr 4,6 kDa). Na jeho produkciu a exporu sa zúčastňujú produkty génov lokalizovaných v rámci pediocínového operónu (*pedABCD*)⁴³⁾. V potravinárstve sa pediocoky uplatňujú pri príprave kvasenej zeleniny a mäsa⁴⁴⁾. V mliečnych produktoch rastú obmedzene, pretože nie sú schopné utilizovať laktózu⁴⁵⁾.

Bakteriocíny, tvorené dvoma peptidovými reťazcami s odlišnými aminokyselinovými sekvenciami spadajú do **podtriedy IIb** (napr. laktacín F, laktokocín G, plan-taricín S, enterocín L50 a i.)^{19, 46, 47)}. Pre biologickú aktivitu týchto molekúl sú potrebné oba peptidové reťazce²¹⁾. Mechanizmus ich účinku je založený na strate membránového potenciálu atakovanej bunky, úniku iónov z cytoplazmy a/alebo znížení intracelulárnej koncentrácie ATP⁴⁸⁾.

Niektorí autori vydeľujú v rámci II. triedy bakteriocínov aj **podtriedu IIc**. Do tejto skupiny zaraďujú bakteriocíny, ktoré sú vylučované z bakteriálnej bunky tzv. sec-systémom⁷⁾, ktorý slúži na translokáciu preproteínov, obsahujúcich N-terminálnu signálnu sekvenciu cez cytoplazmatickú membránu. Cintas a kol.⁴⁹⁾ sa prikláňajú k zrušeniu tejto podtriedy, nakoľko exkrécia bakteriocínov z bunky sec-systémom bola zistená aj u bakteriocínov podtriedy IIa. Aby mohli bakteriocíny IIc podtriedy využívať sekrečný sec-systém, musia byť ich cysteínové zvyšky najskôr oxidované. Eijsink a kol.⁵⁰⁾ do podtriedy IIc radia posttranslačne nemodifikované bakteriocíny, ktoré nepatria do podtried IIa a IIb. Cotter a kol.³²⁾ začleňujú do tejto podtriedy nemodifikované bakteriocíny s cyklickou štruktúrou, pričom na základe homológie aminokyselinových sekvencií navrhujú vytvorenie ďalších dvoch systematických podjednotiek: enterocín AS48 zaraďujú do IIc(i) a gasicín A a reutericín 6 do IIc(ii).

Do **triedy III** patria podľa Klaenhammera¹¹⁾ vysokomolekulárne termolabilné bakteriocíny (> 30 kDa). Cotter a kol.³²⁾ ich kvôli výraznej odlišnosti od ostatných bakteriocínov nazývajú bakteriolyzíny. Od iných bakteriocínov sa odlišujú mechanizmom účinku: spôsobujú hydro-

lyzu bunkovej steny citlivej bunky, čo má za následok lýzu bunky³²⁾. Patria sem extracelulárne enzýmy niektorých druhov baktérií, napr. hemolyzíny (lyzujú erytrocyty) a muramidázy (štiepia glykozidové väzby peptidoglykán v bunkovej stene baktérií)⁵¹⁾. Tieto proteíny vykazujú na N-konci homológiu s endopeptidázami, kým C-koniec je pravdepodobne zodpovedný za rozpoznávanie cieľového miesta na povrchu atakovanej bunky^{52, 53)}.

Bakteriocíny tvoriace veľké komplexy s inými makromolekulami (polysacharidy, lipidy) patria do **triedy IV**¹¹⁾. Antibakteriálnu aktivitu týchto bakteriocínov podmieňuje prítomnosť makromolekuly. Táto skupina bakteriocínov je zatiaľ málo preskúmaná⁵³⁾.

Autori Zouhir a kol.⁵⁴⁾ navrhujú nové prerozdelenie bakteriocínov G⁺ baktérií. Podľa homológie sekvenčných motívov navrhujú vytvorenie dvanástich skupín týchto bakteriocínov. Nové delenie má výhodu v tom, že už viac nedochádza k zaradeniu jedného bakteriocínu do viacerých tried, ako tomu bolo v niektorých prípadoch pri delení podľa Klaenhammera¹¹⁾.

Pri biokonzervácii potravín majú bakteriocíny mliečnych baktérií viacero výhod. Ich producentmi sú mikroorganizmy, ktoré sú všeobecne považované za bezpečné a pre eukaryotické bunky nie sú toxické. Okrem toho sú termostabilné a odolné voči zmenám pH. Vykazujú baktericídnu aktivitu voči širokému spektru potravinových patogénov a baktériám vyskytujúcim sa v pokazených potravinových produktoch. Benefitom používania bakteriocínov pri konzervovaní potravín je aj zníženie spotreby iných chemických konzervantov. Pri spracovaní potravín je možné použiť nižšie teploty a zároveň dodržať mikrobiologickú bezpečnosť a zachovať vitamíny, ako aj organoleptické vlastnosti potravín⁵⁵⁾. Bakteriocíny môžu byť do potravín pridávané dvoma cestami: 1. *ex situ* produkované v kultivačných médiách, alebo 2. produkciou *in situ*^{56, 57)}. Pri produkcii bakteriocínov *ex situ* môže byť problémom purifikácia a tiež ich zakoncentrovanie, čím môžu stúpať finančné náklady. Ďalším problémom môže byť legislatíva pri povoľovaní používania danej látky⁵⁸⁾. Naopak, produkcia bakteriocínov v potravinách *in situ* má viacero výhod. Producentské bunky baktérií môžu byť priamo pridávané do výrobkov ako štartovacie kultúry, ako prídavky alebo ako kokultúry v kombinácii so štartovacou kultúrou, prípadne ako protektívne kultúry (hlavne v prípade nefermentovaných potravín)²⁷⁾. Použitie producentských kultúr však vyžaduje zváženie viacerých selekčných kritérií. Použitý kmeň musí byť schopný adaptácie na ekologické podmienky daného produktu a musí byť schopný množiť sa v ňom. Taktiež musí byť odolný voči technologickému spracovaniu a spôsobu uchovávanía potraviny. Mal by produkovať bakteriocín v takom množstve, aby inhiboval rast cieľových patogénov a baktérií zodpovedných za kazenie potravín⁵⁸⁾. Navyše treba vziať do úvahy, že potraviny tvoria komplexný ekosystém so širokou škálou mikroorganizmov, ktoré medzi sebou interagujú. V *in vitro* podmienkach bola pozorovaná aj závislosť medzi produkciou bakteriocínov a niektorými vonkajšími faktormi, ako napr. pH, teplota alebo zloženie rastového média⁵⁹⁾. Skutočnosť, že gény, kódujúce bakteriocíny sú

lokalizované na plazmidoch dáva do budúcnosti možnosť ich úprav genetickými manipuláciami⁵⁸⁾.

Na hľadanie potenciálnych génov kódujúcich bakteriocíny bol vyvinutý softvér BAGEL (Bacteriocin Genome Mining Tool, <http://bioinformatics.biol.rug.nl/websoftware/bagel>), ktorý je prepojený s génovou bankou, GenBank (www.ncbi.nih.com/genomes/bacteria). Tento webový nástroj uľahčuje hľadanie a vzájomné porovnávanie génov pre bakteriocíny, ako aj génov zapojených do ich biosyntézy⁶⁾.

Iným webovým nástrojom je databáza bakteriocínov, BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org>), ktorá sumarizuje dosiaľ identifikované a charakterizované bakteriocíny aj s prepojením na príslušné publikácie v databáze PubMed. Databáza obsahuje údaje o štruktúre bakteriocínov, ich aminokyselinové sekvencie, 3D štruktúry (ak sú známe), ale aj údaje o fyzikálno-chemických vlastnostiach, ako je percentuálny obsah jednotlivých aminokyselín, izoelektrický bod, alebo relatívna molekulová hmotnosť. V databáze je možné hľadať jednotlivé látky na základe aminokyselinovej sekvencie, sekvencie je možné navzájom porovnávať alebo vyhľadávať bakteriocíny pomocou taxonomického vyhľadávača⁶⁰⁾. V januári 2011 bolo v databáze BACTIBASE zaradených 197 bakteriocínov, pričom 176 z nich produkujú G⁺ baktérie, 18 G⁻ baktérie a tri sú produktmi halobaktérií. Zo skupiny G⁺ baktérií sú dominantnými producentmi baktérie mliečneho kvasenia, z radu *Lactobacillales* eviduje BACTIBASE 127 bakteriocínov.

Oba vyššie spomenuté webové nástroje sú užitočnými pomôckami nielen pre oblasť základného výskumu, ale majú slúžiť aj pri výbere bakteriocínov pre spracovanie a konzervovanie potravín a tiež pri vývoji nových antimikróbnych liečiv pre medicínsku prax.

ZÁVER

Tento článok, venovaný bakteriocínom, nadväzuje na prehľadný článok⁶¹⁾, zaoberajúci sa antimikróbne pôsobiacimi látkami, produkovanými baktériami mliečneho kvasenia inej ako peptidovej štruktúry.

Časté a neuvážené používanie antibiotík v humánnej a veterinárnej medicíne spôsobuje v posledných desaťročiach nárast počtu patogénnych mikroorganizmov rezistentných voči antibiotikám, používaným v klinickej praxi. Nakoľko objav a vývoj nových účinných molekúl antibiotík v súčasnosti stagnuje, stále väčšia pozornosť sa sústreďuje na iné antimikróbne pôsobiace látky. Veľmi perspektívnymi pre použitie vo farmaceutickom a potravinárskom priemysle sa javia práve bakteriocíny produkované baktériami mliečneho kvasenia. Vďaka možnosti špecifického výberu medzi široko a úzko spektrálnymi bakteriocínmi a ich novej kombinácii sa dá predpokladať, že nevznikne voči nim rezistencia. Sľubnými sa ukazujú najmä lantibiotiká, ktoré nie sú

toxické pre eukaryotické bunky a sú účinné voči mnohým ľudským a zvieracím patogénom. Významné pokroky v biotechnológiách dávajú možnosť geneticky modifikovať bakteriálne bunky a pripraviť produkčné kmene schopné nadprodukcie cielene upravených antimikróbnych látok so želaným efektom.

LITERATÚRA

- Sobolov, M., Smiley, K. L.:** Metabolism of glycerol by an acrolein-forming lactobacillus. *J. Bacteriol.* 1960; 79, 261–266.
- Messens, W., De, V. L.:** Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 2002; 72, 31–43.
- Riley, M. A., Chavan, M. A.:** Introduction. In: Riley, M. A., Chavan, M. A., eds. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, 1st ed. Berlin, Springer-Verlag, 2007.
- Klaenhammer, T. R.:** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochim.* 1988; 70, 337–349.
- Gratia, A.:** Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comp. Rend. Soc. Biol.* 1925; 93, 1040–1042.
- de Jong, A., van Hijum, A. F. T., Bijlsma, J. J. E., Kok, J., Kuipers, O. P.:** BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucl. Acids Res.* 2006; 34, W273–W279.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., Holo, H.:** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 1996; 70, 113–128.
- Riley, M. A., Wertz, J. E.:** Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 2002; 84, 357–364.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Havarstein, L. S., Hernandez, P. E., Nes, I. F.:** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 2001; 7, 281–305.
- Tobajas, M., Mohedano, A. F., Casas, J. A., Rodriguez, J. J.:** A kinetic study of reuterin production by *Lactobacillus reuteri* PRO 137 in resting cells. *Biochem. Eng. J.* 2007; 35, 218–225.
- Klaenhammer, T.:** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993, 12, 39–85.
- Konings, W. N., Kok, J., Kuipers, O. P., Poolman, B.:** Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Opin. Microbiol.* 2000; 3, 276–282.
- Goto, Y., Li, B., Claesen, J., Shi, Y., Bibb, M. J., van der Donk, W. A.:** Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. *PLoS Biol.* 2010; <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.1000339> (21.01.2011).
- Wiley, J. M., van der Donk, W. A.:** Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 2007; 61, 477–501.
- Xie, L., Miller, L. M., Chatterjee, C., Averin, O., Kelleher, N. L., van der Donk, W. A.:** Lacticin 481: *in vitro* reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science* 2004; 303, 679–681.
- de Vos, W. M., Kuipers, O. P., van der Meer, J. R., Siezen, R. J.:** Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 1995; 17, 427–437.

17. **Quadri, L. E.:** Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 2002; 82, 133–145.
18. **Héchar, Y., Sahl, H. G.:** Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from gram-positive bacteria. *Biochimie* 2002; 84, 545–557.
19. **Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., Tagg, J. R.:** The diversity of bacteriocins produced by gram-positive bacteria. In: Riley, M. A., Chavan, M. A., eds. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, 1st ed. Berlin, Springer-Verlag, 2007.
20. **Rogers, L.:** The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriology* 1928; 16, 321–325.
21. **Delves-Broughton, J.:** Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 1990; 40, 100–117.
22. **Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L.:** Bacteriocins: natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 71, 1–20.
23. **Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meany, B., Hill, C.:** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Leeuwenhoek* 2002; 82, 165–185.
24. **Gross, A., Morell, J. L.:** Structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* 1971; 93, 4634–4635.
25. **Shiba, T., Wakamiya, T., Fukase, K., Ueki, Y., Teshima, T., Nishikawa, M.:** Structure of the lanthionine peptides nisin, ancovenin and lanthiopeptin. In: G. Jung and H.-G. Sahl eds. *Nisin and novel lantibiotics*, 1st ed. Leiden, ESCOM Science Publishers, 1991.
26. **Ross, R. P., Morgan, S., Hill, C.:** Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 2002; 79, 3–16.
27. **Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., Reinheimer, J.:** Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. In: Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M., eds. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*, 1st ed. Oxford, Wiley-Blackwell, 2010.
28. **Bauer, R., Dicks, L. M. T.:** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 2005; 101, 201–216.
29. **Riley, M. A., Wertz, J. E.:** Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002; 56, 117–137.
30. **Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G. G. A., Luesink, E. J., de Vos, W. M.:** Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 27299–27304.
31. **De Vos, W. M.:** Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999; 2, 289–295.
32. **Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P.:** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 2005; 3, 777–788.
33. **Altena, K., Guder, A., Cramer, C., Bierbaum, G.:** Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66, 2565–2571.
34. **Machaidze, G., Seelig, J.:** Specific binding of cinnamycin (Ro 09-0198) to phosphatidylethanolamine. Comparison between micellar and membrane environments. *Biochemistry* 2003; 42, 12570–12576.
35. **Galvin, M. H., Ross, R. P.:** Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.* 1999, 28, 355–358.
36. **Ryan, M. P., Jack, R., Josten, W., Sahl, H.-G., Jung, G., Ross, R. P., Hill, C.:** Extensive post-translational modification, including serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lacticin 3147. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 37544–37550.
37. **Dougherty, B., Hill, C., Wiedman, J., Richardson, D. R., Venter, J. C., Ross, R. P.:** Sequence and analysis of the 60-kb conjugative, bacteriocin producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol. Microbiol.* 1998; 29, 1029–1038.
38. **Gilmore, M. S., Segarra, R. A., Booth, M. C., Bogie, C. P., Hall, L. R., Clewell, D. B.:** Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 1994; 176, 7335–7344.
39. **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. *J. Appl. Bacteriol.* 1993; 75, 113–122.
40. **Kaiser, A. L., Montville, T. J.:** Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62, 4529–4535.
41. **Ennahar, S., Sashihara, S., Sonomoto, K., Ishizaki, A.:** Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000; 24, 85–106.
42. **Kazazic, M. M., Nissen-Meyer, J., Fimland, G.:** Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology* 2002; 148, 2019–2027.
43. **Eom, J. E., Moon, S. K., Moon G.-S.:** Heterologous production of pediocin PA-1 in *Lactobacillus reuteri*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 20, 1215–1218.
44. **Knorr, D.:** Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends Food Sci. Technol.* 1998; 9, 295–306.
45. **Papagianni, M., Anastasiadou, S.:** The bacteriocins of pediococci. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories* 2009; 8, 3–19.
46. **Stephens, S. K., Floriano, B., Cathcart, D. P., Bayley, S. A., Witt, V. F., Jiménez-Díaz, R., Warner, P. J., Ruiz-Barba, J. L.:** Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64, 1871–1877.
47. **Cintas, L. M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L. S., Holo, H., Hernández, P. E., Nes, I. F.:** Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 2000; 182, 6806–6814.
48. **Garneau, S., Martin, N. I., Vederas, J. C.:** Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 2002; 84, 577–592.
49. **Cintas, L. M., Casaus, P., Hararstein, L. S., Hernandez, P. E., Nes, I. F.:** Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63, 4321–4330.
50. **Eijsink, V. G., Axelsson, L., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Holo, H., Nes, I. F.:** Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Leeuwenhoek* 2002; 81, 639–54.
51. **Jack, R. W., Tagg, J. R., Bibek, R.:** Bacteriocins from gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 1995; 59, 171–200.

52. **Lai, A. C., Tran, S., Simmonds, R. S.:** Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002; 215, 133–138.
53. **Johnsen, L., Fimland, G., Nissen-Meyer, J.:** The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* 2005; 280, 9243–9250.
54. **Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., Hamida, J. B.:** A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. *Protein J.* 2010; 29, 432–439.
55. **Thomas, L. V., Clarkson, M. R., Delves-Broughton, J.:** Nisin. In: Naidu, A. S. ed. *Natural food antimicrobial systems*, 1st ed. New York, CRC Press, 2000.
56. **Schillinger, U., Geisen, R., Holzappel, H. W.:** Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci Tech.* 1996; 7, 158–164.
57. **Stiles, M. E.:** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 1996; 70, 331–345.
58. **Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Omar, N. B.:** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol* 2007; 120, 51–70.
59. **Kečerová, K., Pristaš, P., Javorský, P.:** Bacteriocin production and sensitivity. *Folia Microbiol.* 2004; 49, 172–174.
60. **Hammami, R., Zouhir, A., Le Lay, Ch., Hamida, J. B., Fliss, I.:** BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiol.* 2010; 10, 22–27.
61. **Kišňová Sepová, H., Bilková, A., Bilka, F., Bezáková, L.:** Antimikróbne pôsobiace látky produkované baktériami mliečného kvasenia. *Čes. slov. Farm.* 2010; 59, 155–159.

Abstrakta z akcí ČFS v časopisu Česká a slovenská farmacie

Redakce časopisu Česká a slovenská farmacie nabízí možnost zveřejňovat limitované množství abstrakt z odborných akcí pořádaných Českou farmaceutickou společností, například symposií, seminářů, pracovních dnů apod.

Jednotlivá abstrakta (písmo Courier New, velikost 12, řádkování 2), by neměla přesáhnout 1 rukopisnou stranu formátu A4.

Počet abstrakt předem dohodnou předsedové příslušných sekcí, které akci pořádají, případně osoby zodpovědné za akci s redakcí časopisu, která poskytne i bližší informace.

Lze zveřejnit rovněž na internetových stránkách ČFS (www.cfs-cls.cz)

Kontakt:

doc. RNDr. Pavel Komárek, PhD., vedoucí redaktor, Katedra farmaceutické technologie a kontroly léčiv IPVZ
100 05 Praha 10, Ruská 85, e-mail: komarek@ipvz.cz, tel.: 271 019 278