

**REVIEW ARTIKEL: AKTIVITAS LIPOLITIK PROTEIN *LysB* DARI BEBERAPA MIKOBAKTERIOFAGA**

**Zafira Zahrah, Driyanti Rahayu**

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran

Jln. Raya Bandung Sumedang Km 21 Jatinangor 45363

[zafira15001@mail.unpad.ac.id](mailto:zafira15001@mail.unpad.ac.id)

**ABSTRAK**

TB (tuberkulosis) telah menjadi penyebab kematian ke sembilan di dunia. TB disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang merupakan bakteri kecil yang dapat menular dan dapat tersuspensi di udara. Protein *lysB* pada mikobakteriofaga dapat menjadi solusi karena dapat memotong ikatan esterifikasi *mycolic acid* dengan lapisan arabinogalactan pada mikobakteri dan memiliki aktivitas lipolitik. Mikobakteriofaga yang telah diketahui memiliki aktivitas lipolitik, diantaranya D29, Ms6, dan Bxz2. Aktivitas lipolitik pada mikobakteriofaga dapat diukur dengan pengujian menggunakan substrat *p*-nitrophenyl dengan variasi panjang rantai. Diperoleh Bxz2 dengan aktivitas lipolitik paling tinggi (2,7 U/mg) pada substrat pNPB (C4) dan Ms6 dengan efisiensi katalitik paling tinggi terutama pada pNPL (C12) dan pNPM (C14) sebesar 1,14 dan 1,13 min<sup>-1</sup>μM<sup>-1</sup>.

**Kata kunci:** *aktivitas lipolitik, mikobakteriofaga, protein lysB*

**ABSTRACT**

*TB (tuberculosis) has been the ninth leading cause of death in the world. TB is caused by Mycobacterium tuberculosis which is a small bacterium that can be contagious and can be suspended in the air. The lysB protein in mycobacteriophage may be the solution because it can bypass the esterification bond of mycolic acid with the arabinogalactan layer in mycobacteria and have lipolytic activity. Mycobacteriophage has been known to have lipolytic activity, such as D29, Ms6, and Bxz2. Lipolytic activity in mycobacteriophage can be measured by testing using p-nitrophenyl substrate with variation of chain length. Obtained Bxz2 with the highest lipolytic activity (2.7 U/mg) on pNPB (C4) and Ms6 substrate with the highest catalytic efficiency especially in pNPL (C12) and pNPM (C14) of 1.14 and 1.13 min<sup>-1</sup>μM<sup>-1</sup>.*

**Keywords:** *lipolytic activity, mycobacteriophage, lysine B*

Diserahkan: 4 Juli 2018, Diterima 4 Agustus 2018

**PENDAHULUAN**

TB (tuberkulosis) menempati urutan kesembilan pada penyebab kematian yang disebabkan oleh agen infeksi tunggal (*mycobacterium tuberculosis*) dan menempati peringkat di atas HIV / AIDS. Pada tahun 2016, diperoleh data sebanyak

6,3 juta kasus TB (naik dari 6,1 juta pada tahun 2015), setara dengan 61% dari perkiraan kejadian yaitu 10,4 juta kasus TB pada tahun 2016: 90% adalah orang dewasa, 65% adalah laki-laki, 10% adalah pasien dengan positif HIV (74% di Afrika) dan 56% berada di lima negara: India,

Indonesia, Cina, Filipina, dan Pakistan (World Health Organization, 2017).

Peningkatan prevalensi TB di antara pasien yang terinfeksi HIV, serta evolusi strain resisten obat, dan peningkatan perjalanan dan imigrasi penyakit TB baru-baru ini menimbulkan ancaman serius terhadap pengendalian TB (Glaziou, Sismanidis, Floyd, & Raviglione, 2015). Baru-baru ini, dilaporkan dari Italia terdapat kasus pertama TB, di mana 2 pasien didiagnosis dengan TB yang resistan terhadap semua obat anti-TB yang diketahui (Dookie, Rambaran, Padayatchi, Mahomed, & Naidoo, 2018).

TB disebabkan oleh bakteri *aerobic acid-fast* berbentuk batang, *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri kecil ini, dikeluarkan dari inang yang menular, dan dapat tetap tersuspensi di udara sebagai nuklei droplet selama berjam-jam (Zumla, *et al*, 2013).

Resistensi obat antituberkulosis terjadi akibat adanya mutasi pada bentuk aktif dari obat atau enzim-enzim yang berperan dalam pengaktifan obat. Obat-obat antibiotik TB yang sudah mengalami mutasi diantaranya, INH (Isoniazid) yang mengalami mutasi pada gen primer *katG* dan promotor *inhA* dengan nilai spesifitas mutasi individu 97-100%. Lalu ada RIF (rifampisin) yang mengalami mutasi pada gen primer *rpoB*, begitu juga pada gen primer pada obat-obat antituberkulosis lainnya seperti MOX (moxifloxacin); OFX

(ofloxacin); AMK (amikacin); KAN (kanamycin); CAP (capreomycin) (Rodwell *et al.*, 2014).

Dalam beberapa tahun terakhir, sifat terapeutik endolisin pada bakteriofaga telah banyak dimanfaatkan, Spesifisitas endolisin yang tinggi dan aktivitasnya terhadap bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik membuat endolisin sebagai agen antimikroba yang menarik. (Mehta, *et al*, 2013; Solanki, *et al*, 2013; Pangule, *et al*, 2010).

*Mycobacterium tuberculosis* termasuk dalam golongan *mycobacteria* yang menimbulkan tantangan lain untuk aplikasi endolysin sebagai anti-bakteri. Dinding sel mereka secara struktural berbeda bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Dinding sel mikobakteri terdiri dari kompleks mycolyl-arabinogalactan-PG (mAGP). PG (peptidoglikan) secara kovalen melekat pada arabinogalactan, yang diesterifikasi dengan asam lemak  $\beta$ -hidroksi panjang (*mycolic acid*), dan lapisan terakhir/terluar terdiri dari lipid *barrier* (Wolfe, Mahaffey, Kruh, & Dobos, 2010).

Mikobakteriofaga umumnya menghasilkan dua enzim litik, LysA dan LysB. LysA adalah hidrolase PG yang dapat mendegradasi dinding sel bakteri (peptidoglikan), lalu isi sel dengan cepat dikeluarkan karena tekanan osmotik internal yang tinggi (Schmelcher, Donovan, & Loessner, 2012). Dan LysB memotong

ikatan esterifikasi *mycolic acid* dengan lapisan arabinogalactan dan memiliki aktivitas lipolitik (Payne & Hatfull, 2012).

Terdapat 72 sekuen genomik protein LysB (tersedia pada GenBank) dari sumber mikrobakteriofaga yang berbeda (Henry, *et al*, 2011). Dalam hal ini, penulisan ingin menyampaikan aktivitas lipolitik protein lysB dari beberapa mikobakteriofaga, berikut mikobakteriofaga yang telah diketahui memiliki aktivitas lipolitik, diantaranya D29, Ms6, dan Bxz2.

## **METODE**

### ***Sumber data yang digunakan***

Referensi yang digunakan pada pada review artikel ini diperoleh dari internet berupa jurnal ilmiah nasional atau internasional yang dipercaya sebagai jurnal primer, kemudian text book yang resmi sebagai sumber data sekunder, dan website terpercaya sebagai sumber data tersier.

### ***Pencarian istilah dan strategi pencarian data***

Pencarian istilah yang dilakukan dalam mendapatkan referensi jurnal ilmiah terpercaya dan *text book* untuk *review article* ini yaitu dengan menggunakan kata-kata atau kalimat yang berhubungan dengan *LysB*, *mycobacteriophage lysB*, *lypolitic activity of LysB*, *mycobacteriophage LysB with lypolitic activity*. Strategi pencarian yang dilakukan untuk mendapatkan

referensi jurnal ilmiah dan *text book* terpercaya dengan menggunakan beberapa situs *search engine* seperti google.com, dan google scholar, juga digunakan situs-situs penyedia jurnal-jurnal ilmiah seperti ncbi, science direct, dan elsivier.

### ***Kriteria seleksi data (inklusi dan ekslusi)***

Kriteria inklusi dalam penyeleksian sumber-sumber yang sudah didapatkan baik berupa jurnal ilmiah atau text book resmi adalah yang memuat informasi mengenai mikrobakteriofaga yang mengandung *endolysin* berupa *lysB* dan telah diketahui memiliki aktivitas lipolitik, diantaranya D29, Ms6, dan Bxz2 dimana sudah diujikan pada substrat buatan atau pada *mycobacterium*. Untuk sumber jurnal digunakan jurnal dengan publikasi 10 tahun ke belakang terakhir. Kriteria ekslusi pada penyeleksian sumber adalah yang bukan merupakan jurnal ilmiah atau *text book* resmi atau sumber jurnal ilmiah yang tidak mencakup informasi mengenai mikrobakteriofaga D29, Ms6, dan Bxz2.

### ***Jumlah studi yang digunakan***

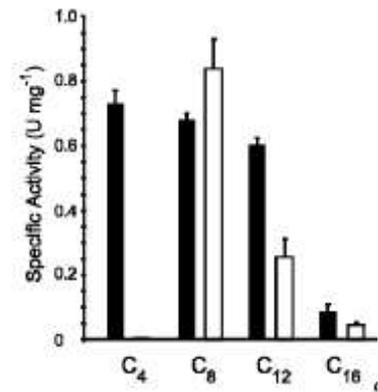
Jumlah sumber jurnal ilmiah yang didapatkan sebanyak 12 jurnal yang membahas mengenai protein LysB. Kemudian dari hasil skrining digunakan 5 sumber jurnal primer yang membahas mikrobakteriofaga D29, Ms6, dan Bxz2.

## HASIL

### *Aktivitas lipolitik Protein LysB pada mikobakteriofaga D29*

Pada penelitian yang dilakukan oleh Payne et al., 2009, protein LysB pada mikobakteriofaga D29 diekspresi dalam *E. coli* BL21 (DE3) yang membawa vektor pLAM3. Dan didapatkan 254-residu D29 LysB diekspresi dengan baik dengan hasil pemurnian hingga mendekati homogenitas dan kelarutan tinggi (> 10 mg/ml).

Untuk pengujian aktivitas lipolitik dari D29 LysB, Payne, et al, 2009, menggunakan metode yang diadaptasi dari penelitian Gilham dan Lehner, 2005 yaitu satu mililiter substrat p-nitrophenyl (50 mM) diinkubasi dengan 1 mg D29 LysB, lipase (*Pseudomonas fluorescens*) dalam buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) pada suhu kamar selama 30 menit. Pelepasan p-nitrophenol ditentukan dengan mengukur absorbansi pada 420 nm ( $A_{420}$ ). Dari penelitian tersebut didapatkan D29 LysB lebih aktif daripada lipase pada pNPB (Gambar 1). Dan terjadi penurunan aktivitas D29 LysB dengan substrat yang memiliki rantai lebih panjang (Gambar 1).



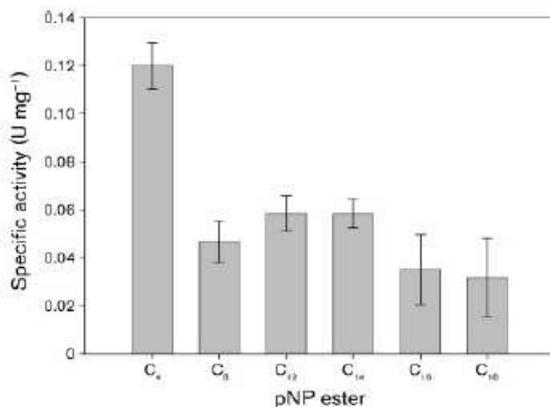
**Gambar 1.** Aktivitas lipolitik D29 lysB (bar hitam) dan Lipase (bar putih) (Payne et al., 2009).

Hou L, et al, 2010, melakukan uji aktivitas lipolitik D29 lysB dengan metode yang sama yaitu dengan p-nitrophenyl butyrate sebagai substrat. Dan didapatkan Suhu optimum dan pH untuk aktivitas lipolitik D29 lysB adalah 23 °C dan 7,5. Di bawah kondisi optimal, aktivitas spesifik D29 LysB adalah 1,3 U/mg yang dimana bila diamati nilainya lebih tinggi dari 0,72 U/mg yang dilaporkan pada penelitian Payne, et al, 2009 untuk protein D29 LysB.

### *Aktivitas lipolitik Protein LysB pada mikobakteriofaga Ms6*

Pada penelitian yang dilakukan oleh Gil, et al., 2008, protein LysB pada mikobakteriofaga Ms6 diekspresi dalam *E. coli* JM109 yang membawa vektor pMP302 yang kemudian dianalisis dengan SDS-PAGE. Analisis SDS-PAGE mengungkapkan keberadaan Ms6 LysB dengan massa molekul yang konsisten sesuai dengan prediksi massa molekul yaitu 38,3 kDa.

Pengujian aktivitas lipolitik dari Ms6 LysB pada suatu penelitian digunakan metode yang sama dengan pengujian D29 LysB yaitu menggunakan substrat p-nitrophenyl namun pada jumlah dan pengondisian yang berbeda yaitu sebanyak 1 mM substrat uji diinkubasi dengan 60 µg Ms6 LysB dan 0,2% Triton X-100 dalam 100 mM Tris / buffer HCl pH 7,5 pada suhu 23°C selama 30 menit. Pelepasan p-nitrophenol ditentukan dengan mengukur absorbansi pada 405 nm menggunakan microplate reader. Seperti ditunjukkan pada Gambar 2, LysB mampu menghidrolisis semua substrat yang diuji, dan menunjukkan aktivitas tertinggi (0,12 U/mg) dengan pNPB rantai pendek (C4) (Gil, *et al.*, 2008).



**Gambar 2.** Aktivitas lipolitik MS6 His-LysB terhadap variasi pNP esters (diukur menggunakan spektrofotometer) (Gil, *et al.*, 2008).

Gil, *et al.*, 2008, juga menjabarkan bahwa efisiensi katalitik tertinggi Ms6 LysB diamati pada pNPL (C12) dan pNPM (C14) yang relatif memiliki rantai panjang,

dengan efisiensi katalitik 1,14 dan 1,13 min<sup>-1</sup>µM<sup>-1</sup>.

Pada penelitian Gil, *et al.*, 2010 juga dilakukan pengujian aktivitas lipolitik Ms6 lysB yang diujikan langsung pada lipid dinding sel yang diekstrak dari *M. smegmatis*. 200 µg total lipid yang diekstrak dari *M. smegmatis* dikeringkan dalam tabung gelas dan diresuspensi dalam buffer PBS kemudian Ms6 LysB (360 µg) yang dihasilkan dari penelitian sebelumnya (Gil, *et al.*, 2008) ditambahkan dan sampel diinkubasi pada 37 °C selama 24 jam.

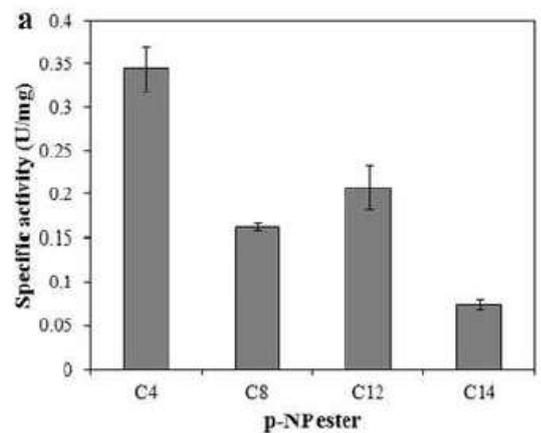
Analisis TLC dengan menggunakan larutan pengembang kloroform : methanol : air (20 : 4 : 0,5) mengungkapkan bahwa profil lipid berubah setelah ditambahkan MS6 LysB (Gambar 3, Jalur 1 dan 2) dengan menghilangnya salah satu lipid. Hasil yang sama diperoleh juga pada *M. tuberculosis* H37Ra (Gambar 3, jalur 4 dan 5) (Gil *et al.*, 2010).



**Gambar 3.** Ekstrak total lipid dari *M. smegmatis* (jalur 1), ekstraksi total lipid dari *M. smegmatis* dengan penambahan LysB (jalur 2), Mtb TDM Standard (3), ekstrak total lipid dari *M. tuberculosis* H37Ra (4), ekstrak total lipid dari *M. tuberculosis* H37Ra dengan penambahan LysB (5) (Gil et al., 2010).

Penelitian aktivitas lipolitik Ms6 LysB juga dilakukan oleh Grover, *et al*, 2014, dimana protein tersebut diekspresi dalam *E. coli* BL21 (DE3) yang membawa vektor pGS-21a. Pengujian aktivitas lipolitik dari LysB tersebut menggunakan metode yang sama yaitu menggunakan substrat p-nitrophenyl dengan variasi panjang rantai carbon (C4 hingga C14). 1 mM substrat diinkubasi dengan Ms6 LysB, dalam 0,05% surfaktan (Tween 80 atau Triton X-100) dalam buffer PBS, pH 7,4 selama 30 menit. Pelepasan p-nitrophenol ditentukan dengan mengukur absorbansi pada 405 nm menggunakan spektrofotometer UV-Visible. Seperti ditunjukkan pada Gambar

5, LysB mampu menghidrolisis semua substrat yang diuji, dan menunjukkan aktivitas tertinggi (0,34 U/mg) dengan pNPB rantai pendek (C4) yang dimana bila diamati nilainya lebih tinggi dari 0,12 U/mg yang dilaporkan pada penelitian Gil, *et al*, 2008 untuk protein Ms6 LysB.



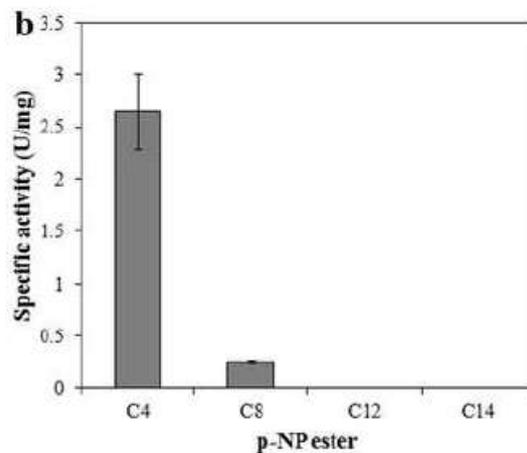
**Gambar 4.** Aktivitas lipolitik MS6 His-LysB terhadap variasi pNP esters yang diukur dengan LC-MS (Grover *et al.*, 2014).

#### **Aktivitas lipolitik Protein LysB pada mikrobakteriofaga Bxz2**

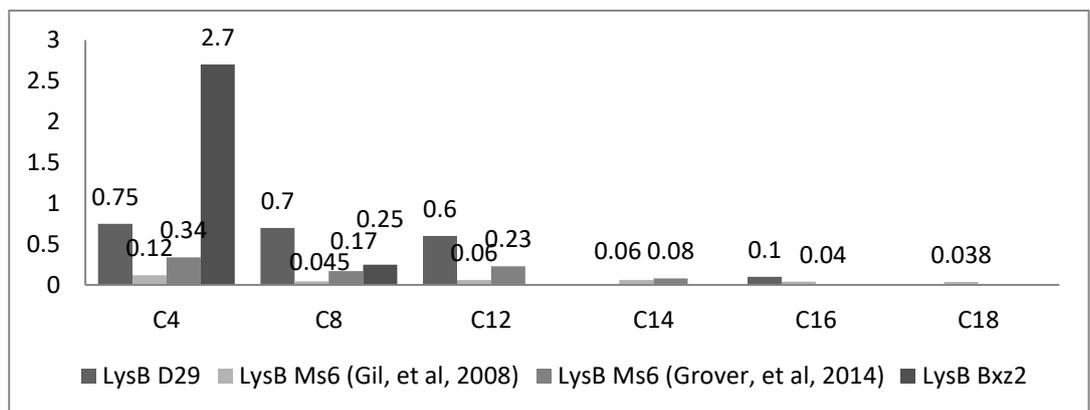
Pada penelitian Grover, *et al*, 2014, dilakukan pula pengujian protein LysB pada mikrobakteriofaga Bxz2 yang diekspresi dalam *E. coli* BL21 (DE3) yang membawa vektor pGS-21a. Pengujian aktivitas lipolitik Bxz2 LysB menggunakan metode yang sama dengan pengujian Grover, *et al*, 2014 pada protein Ms6 LysB. Dalam pengujian tersebut, Bxz2 LysB, memiliki aktivitas yang dapat dideteksi terhadap substrat p-NP ester dengan rantai karbon lebih pendek dari C8, dan

menunjukkan spesifitas substrat yang terbatas pada Bxz2 LysB dibandingkan dengan Ms6 LysB (Gambar 5 dan 6) (Grover et al., 2014).

**Gambar 5.** Aktivitas lipolitik Bxz2 His-LysB terhadap variasi pNP esters yang diukur dengan LC-MS (Grover et al., 2014).



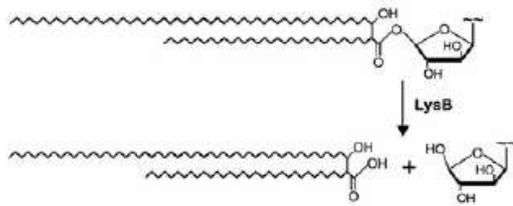
**Grafik 1.** Aktivitas Lipolitik lysB dari beberapa sumber mikobakteriofaga terhadap pNP esters (sebagai substrat)



## PEMBAHASAN

Mikobakteriofaga adalah virus yang menginfeksi mikobakteri (*host*) seperti *Mycobacterium smegmatis* dan *Mycobacterium tuberculosis* (Hatfull, 2010). Mikobakteriofaga adalah atipikal

dalam pengkodean enzim lipolitik, Lysin B, esterase yang menghidrolisis hubungan *mycolic acid* ke kompleks peptidoglycan-arabinogalactan (mAGP) (Gambar 6) (Gil et al., 2010).



**Gambar 6.** Diagram yang menggambarkan pembelahan LysB pada ikatan ester yang menghubungkan asam mycolic dan arabinogalactan (Payne et al., 2009).

Struktur kristal homolog LysB memiliki kesamaan dengan anggota keluarga hidrolase  $\alpha / \beta$ , yang mencakup cutinases, esterase xylan asetil dan lipase (Payne et al., 2009).

#### ***Mekanisme Aktivitas Lipolitik Protein LysB pada mikobakteriofaga D29***

Dalam penelitian Payne et al., 2009, struktur D29 LysB menunjukkan kesamaan dengan anggota keluarga hidrolase  $\alpha/\beta$  dengan situs aktif yang mengandung Ser, Asp dan His. Struktur D29 LysB memiliki kesamaan dengan cutinases dengan persentasi tidak lebih dari 21%. Enzim lipolitik sejenis cutinases dapat mendegradasi berbagai substrat, termasuk cutin, ester karboksilat, triasilgliserol (TAG), fosfolipid dengan kedua asam lemak panjang dan rantai pendek dan juga aktif dalam substrat terlarut, seperti short-chain p-nitrophenyl (pNP) ester (Parker, et al, 2007).

Payne, et al, menunjukkan bahwa D29 LysB mampu menghidrolisis asam lemak rantai panjang berupa substrat p-nitrophenyl dimana akan membebaskan p-nitrophenol. Aktivitas spesifik tertinggi D29 lysB diperoleh 0,72 U/mg pada substrat pNPB (C4), namun pada kondisi optimal pada suhu 23°C dan pH 7,5 diperoleh nilai yang lebih tinggi yaitu 1,3 U/mg seperti yang dilaporkan oleh Hou L, et al, 2010. Aktivitas LysB akan lebih tinggi apabila diinkubasi pada kondisi optimalnya.

#### ***Mekanisme Aktivitas Lipolitik Protein LysB pada mikobakteriofaga Ms6***

Pada penelitian yang dilakukan oleh Gil, et al, 2008, Ms6 LysB menunjukkan aktivitas terhadap substrat dengan panjang rantai dari C4 hingga C18, dan diperoleh efisiensi katalitik yang lebih tinggi ada pada C12 dan C14 menunjukkan bahwa ini adalah substrat terbaik untuk Ms6 LysB di antara pNP esters. Sehingga protein LysB dari Ms6 ini dapat diklasifikasikan sebagai lipase karena mampu mengkatalisis hidrolisis pada asam lemak rantai panjang.

Selain itu selain pada substrat buatan, pada penelitian Gil, et al, 2010 dilakukan pengujian aktivitas lipolitik Ms6 lysB pada lipid dinding sel yang diekstrak dari *M. smegmatis*. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa LysB tidak spesifik untuk *M. smegmatis*, karena mampu menghidrolisis lipid dari spesies

mikobakteri lain. Lipid yang dihidrolisis dari *M. smegmatis* oleh Ms6 LysB ditetapkan sebagai Msmeg\_1 (Gambar 3, Jalur 3).

### ***Mekanisme Aktivitas Lipolitik Protein LysB pada mikobakteriofaga Bxz2***

Dalam penelitian Grover, *et al*, 2014, Bxz2 LysB menunjukkan aktivitas terhadap substrat dengan panjang rantai  $\leq$  C8. Aktivitas esterase dari Bxz2 sangat tinggi (2,7 U/mg) namun menunjukkan spesifitas substrat yang terbatas pada substrat p-nitrophenyl dengan rantai yang lebih panjang. Esterase didefinisikan sebagai enzim yang bekerja pada larutan ester asam lemak rantai pendek seperti metil butirat, etil butirat dan triacetin.

Dari hasil yang diketahui protein LysB dari tiap masing-masing mikobakteriofaga memiliki nilai *specific activity* yang berbeda-beda karena sifat lipolitik yang dimiliki masing-masing pun berbeda. Ms6 LysB menunjukkan nilai *specific activity* yang lebih kecil dibandingkan dengan D29 LysB dan Bxz2 LysB (Grafik 1) namun memiliki aktivitas optimal karena dalam nilai yang diperoleh sudah dapat menghidrolisis lipid dinding sel dari *M. smegmatis* (Gil, *et al*, 2010). Dikarenakan Ms6 LysB memiliki kesamaan urutan asam amino 88% dengan Gp33 dari mikobakteriofaga Che8, Che8 merupakan faga yang juga menginfeksi *M. smegmatis*

(Gil, *et al.*, 2008). Sedangkan D29 LysB hanya berbagi amino 40% dengan protein MS6 LysB (Payne, *et al*, 2009) dan Bxz2 LysB memiliki kesamaan urutan asam 44% dengan Ms6 LysB (Grover, *et al*, 2014). Efisiensi katalitik Ms6 LysB pun jauh lebih baik daripada Bxz2 LysB untuk kedua substrat (C4 dan C8) (Grover, *et al.*, 2014).

### **SIMPULAN**

Dari ketiga mikobakteriofaga yang memiliki lysB diperoleh nilai *specific activity* yang berbeda-beda karena sifat lipolitik yang dimiliki masing-masing pun berbeda, D29 LysB sebagai cutinase, Ms6 LysB sebagai lipase, dan Bxz2 LysB sebagai esterase dan diperoleh Bxz2 dengan aktivitas lipolitik paling tinggi (2,7 U/mg) pada substrat pNPB (C4) dan Ms6 dengan efisiensi katalitik paling tinggi terutama pada pNPL (C12) dan pNPM (C14) sebesar 1,14 dan 1,13  $\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ . Protein LysB pada mikobakteriofaga Ms6 dapat dipastikan memiliki aktivitas lipolitik terhadap mikobakteri seperti *M. smegmatis* atau *M. tuberculosis* dilihat dari perubahan profil lipid pada mikobakteri.

### **UCAPAN TERIMAKASIH**

Penulis mengucapkan rasa syukur kepada Allah SWT. karena berkat rahmatNya penulis mampu menyelesaikan penulisan ini dan mengucapkan terimakasih kepada kedua orang tua yang selalu mendoakan. Terima kasih juga kepada

dosen metodologi penelitian pak Rizky Abdullah, Ph.D., Apt. karena telah memberikan ilmunya dan kepada dosen pembimbing yang telah membimbing penulis dengan sabar dan tak lupa kepada teman-teman seperjuangan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., Mahomed, S., & Naidoo, K. 2018. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1138–1151.
- Gil, F., Grzegorzewicz, A. E., Joa, M., Mcneil, M. R., Pimentel, M., & Pimentel, M. 2010. Mycobacteriophage Ms6 LysB specifically targets the outer membrane of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, 156, 1497–1504.
- Gil, F., Leandro, P., Joa, M., Mcneil, M., Pimentel, M., & Pimentel, M. 2008. The lytic cassette of mycobacteriophage Ms6 encodes an enzyme with lipolytic activity. *Microbiology*, 154, 1364–1371.
- Gilham, D., and Lehner, R. 2005. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*. 36: 139–147.
- Glaziou, P., Sismanidis, C., Floyd, K., & Raviglione, M. 2015. Global epidemiology of tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 5(a017798), 1–17.
- Grover, N., Paskaleva, E. E., Mehta, K. K., Dordick, J. S., & Kane, R. S. 2014. Growth inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by mycobacteriophage-derived enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 63, 1–6.
- Hatfull GF. 2010. Mycobacteriophages: genes and genomes. *Annu Rev Microbiol.* 64: 331–356.
- Henry, Marine., Coffey, Aidan, Jim O' Mahony., & Roy D. Sleator. 2011. Comparative modelling of LysB from the mycobacterial bacteriophage Ardmore, *Bioengineered Bugs*, 2(2), 88-95.
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J.M., and Engelhardt, H. 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 3963–3967.
- Hou L, Hao L, Qi J, Yang G. 2010. Expression and purification of lysin B in mycobacteriophage D29 and analysis of its enzymatic properties. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 26(4):517-22.
- Mehta KK, Paskaleva EE, Azizi-Ghannad S, Ley DJ, Page MA, Dordick JS and Kane RS. 2013. Characterization of AmiBA2446, A Novel Bacteriolytic Enzyme Active Against *Bacillus* Species. *Appl Environ Microbiol*; 79:5899-5906.
- Pangule PC, Brooks SJ, Dinu CZ, Bale SS, Salmon SL, Zhu G, Metzger DW, Kane RS and Dordick JS. 2010. Antistaphylococcal nanocomposite films based on enzyme nanotube conjugates. *ACS nano*. 4:3993-4000.
- Parker, S. K., Curtin, K. M. & Vasil, M. L. 2007. Purification and characterization of a mycobacterial phospholipase A: an activity associated with mycobacterial cutinase. *J Bacteriol* 189: 4153–4160.
- Payne, K. M., & Hatfull, G. F. 2012.

- Mycobacteriophage endolysins: Diverse and modular enzymes with multiple catalytic activities. *PLoS ONE*, 7(3).
- Payne, K., Sun, Q., Sacchettini, J., & Hatfull, G. F. 2009. Mycobacteriophage Lysin B is a novel mycolylarabinogalactan esterase. *Molecular Microbiology*, 73(3), 367–381.
- Rodwell, T. C., Valafar, F., Douglas, J., Qian, L., Garfein, R. S., Chawla, A., Catanzaro, A. 2014. Predicting extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* phenotypes with genetic mutations. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(3), 781–789.
- Schmelcher, M., Donovan, D. M., & Loessner, M. J. 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 7(10), 1147–1171.
- Solanki K, Grover N, Downs P, Paskaleva EE, Mehta KK, Lee L, Schadler LS, Kane RS and Dordick JS. 2013. Enzyme-based listericidal nanocomposites. *Sci Rep*. 3:1-6.
- Wolfe, L. M., Mahaffey, S. B., Kruh, N. A., & Dobos, K. M. 2010. Proteomic definition of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Proteome Research*, 9(11), 5816–5826.
- World Health Organization. 2017. *Global Tuberculosis*. *Jama*. Vol. 312. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.11450>
- Zumla A, Raviglione M, Hafner R, Fordham von Ryen. 2013. Current concepts: tuberculosis. *N Engl J Med*. 368:745-755.