

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Goran N. Vukotić

**PROTEINAZE MLEČNO-KISELINSKIH  
BAKTERIJA: DIVERZITET U MEZOFILNIM  
VRSTAMA LAKTOBACILA I UTICAJ NA  
AKTIVNOST BAKTERIOCINA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Goran N. Vukotić

**PROTEINASES OF LACTIC ACID  
BACTERIA: DIVERSITY IN MESOPHILIC  
SPECIES OF LACTOBACILLI AND IMPACT  
ON BACTERIOCCIN ACTIVITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

MENTOR: dr Đorđe Fira, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet,

MENTOR: dr Milan Kojić, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko  
inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

dr Đorđe Fira, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet,

dr Milan Kojić, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko  
inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Branko Jovčić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Natalija Polović, docent,  
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Majci i ocu.*

*Reči su izlišne, jednostavno hvala za sve.*

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Ovom prilikom želim da se zahvalim:*

*Pre svih svojim mentorima,*

*Prof. dr Đorđu Firi, redovnom profesoru Biološkog fakulteta koji me je uveo u svet nauke svojim fascinantnim teorijskim znanjem i pristupom eksperimentalnom radu, što je uvek bio tu za mene, što sam u svakom trenutku mogao da mu se obratim za pomoć, i što sam istu i dobijao. Hvala na svim savetima i pruženoj slobodi u istraživačkom radu,*

*i dr Milanu Kojiću, naučnom savetniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, naučniku bez premca koji me svojim radom svakodnevno inspiriše. Hvala na svom trudu i pomoći tokom izrade ove teze, a posebno hvala na svim podsticajnim razgovorima i širenju vidika.*

*Veliko hvala mom uzoru, mladom vanrednom profesoru Biološkog fakulteta dr Branku Jovčiću, na svoj podršci i iskrenoj pomoći u ključnim trenucima. Hvala na stalnoj spremnosti za argumentovanu diskusiju, na efikasnom planiranju i sprovođenju u delo svih zamisli, kao i na uvek pozitivnoj atmosferi u radu.*

*Veliko hvala i mom fakultetskom profesoru dr Ljubiši Topisiroviću, redovnom profesoru Biološkog fakulteta i utemeljivaču laboratorije 06, na prijemu u laboratoriju i svu podršku tokom prvih godina mog rada.*

*Dr Ivani Strahinić hvala što me uvela u svet eksperimentalne nauke, hvala na strpljenju i razumevanju za sve moje početničke greške. Hvala što je uvek bila tu za mene i za svu podršku od prvog dana do danas.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Nataliji Polović, docentu Hemijskog fakulteta, na sjajnoj saradnji i velikoj pomoći u radu. Hvala na divnoj atmosferi i svom uloženom trudu.*

*Mom drugu i bakteriocinskom saborcu Nemanji Mirkoviću, posebno hvala za svaki zajednički radni dan.*

*Iako zvuči kao floskula, zaista sam zahvalan celoj našoj laboratorijskoj družini, svakom ponaosob. Begović, Jelka, Nato, Amarela, Majo, Mico, Kaća, Sanja, Brankice, Goco, Jovanka, Marija, Mala Kaćo, Jelena, Milka, Dušanka, Ceco, Miki i Nikola, hvala na prijatnoj atmosferi za rad i kolegijalnoj podršci koja nije izostala nijednog dana tokom ovih pet godina.*

*Hvala i mom kumu Nemanji Stanisavljeviću, mom saborcu na fakultetu i doktorskim studijama, na profesionalnoj, ali pre svega prijateljskoj podršci tokom ovih jedanaest godina.*

*Na kraju, najveće hvala mojoj Neveni na neizmernoj ljubavi i bezrezervnoj podršci.*

Proteinaze mlečno-kiselinskih bakterija: diverzitet u mezofilnim vrstama laktobacila i uticaj na aktivnost bakteriocina

## REZIME

Mlečno-kiselinske bakterije su mikroorganizmi od izuzetnog značaja kako za industriju fermentisanih proizvoda, tako i za medicinu gde kao probiotici dobijaju sve veći značaj. Proteinaze i bakteriocini, molekuli koje ove bakterije sekretuju u ekstraćelijsku sredinu, imaju važnu ulogu u oba ova aspekta.

Proteinaze su veliki ekstraćelijski enzimi uključeni u prvi korak digestije proteina iz vanćelijske sredine i neophodne su za efikasan rast bakterija u sredinama siromašnim malim peptidima i slobodnim aminokiselinama. U ovom radu je analizirana proteolitička aktivnost različitih mezofilnih laktobacila, pripadnika *Lb. casei* i *Lb. plantarum* grupa prema pet različitih proteina mleka. Utvrđeno je da *Lb. zae* LMG17315 poseduje najefikasniju proteolitičku aktivnost, s obzirom da hidrolizuje sve ponuđene supstrate. Takođe pokazano je da se proteinaze ovog soja odvajaju u medijum u aktivnom obliku. *Lb. casei* ATCC393, soj sa kontroverznim sistematičkim statusom, pokazao je sličnu, ali manje efikasnu proteolitičku aktivnost. Prisustvo različitih proteinaznih gena u ispitivanim sojevima analizirano je DNK-DNK hibridizacijom i PCR metodom. Utvrđeno je da LMG17315 poseduje sekvence gena koje kodiraju katalitičke domene za tri, a ATCC393 za jednu proteinazu. Kod soja LMG17315 je utvrđeno da poseduje *prtP*-sličan i *prtR*-sličan gen, dok je kod oba soja pronađen i novi proteinazni gen, označen kao *prtPI*. S obzirom na dosadašnji problematičan sistematički status ovih sojeva urađena je i njihova molekularna determinacija čime je stečen bolji uvid u njihove filogenetske odnose. Iako je u relevantnoj literaturi predloženo da ATCC393 treba da bude reklasifikovan u vrstu *Lb. zae*, dobijeni rezultati ukazuju na značajne razlike između soja ATCC393 i tipskog soja *Lb. zae* LMG17315.

Analizirani sojevi vrste *Lb. plantarum*, takođe su efikasno hidrolizovali proteine mleka, iako kod ove vrste do sada nije opisana proteinaza odgovorna za ovakvu aktivnost. Slično kao kod *Lb. zae* LMG17315 i kod *Lb. plantarum* LMG9208 je detektovano prisustvo *prtR*-sličnog gena, ranije uočenog samo u vrsti *Lb. rhamnosus*. Katalitički region ovog gena je sekvenciran, i poređenjem sa ostalim proteinaznim genima utvrđeno je da se radi o novom tipu proteinaze, s

obzirom na razlike na nivou nukleotidne i aminokiselinske sekvence. Kod ostalih sojeva *Lb. plantarum* nisu detektovani analizirani geni, što ukazuje da poseduju novi do sada neokarakterisani tip proteinaze.

U drugom delu istraživanja, ispitivana je regulacija ekspresije bakteriocina LcnB kod soja *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501, kao i moguća interakcija ovog bakteriocina i proteinaze PrtP. Bakteriocini su bakterijski antimikrobni molekuli, strukturno i funkcionalno raznovrsni. LcnB je bakteriocin poznatog načina i spektra delovanja, međutim nisu definisani njegov aktivni i vezujući domen, niti su poznati mehanizmi regulacije njegove ekspresije. Pokazano je da je antimikrobna aktivnost LcnB bakteriocina zavisna od koncentracije peptida u medijumu za rast bakterija, pri čemu sa porastom ove koncentracije, raste i aktivnost LcnB. Međutim, analizom aktivnosti promotora *lcnB* gena, uočeno je da u istim uslovima dolazi do opadanja aktivnosti ovog promotora. S obzirom na dobijene rezultate, ispitana je interakcija LcnB bakteriocina i proteinaze PrtP, čija je ekspresija na sličan način regulisana koncentracijom peptida u medijumu. Konstruisani su mutanti kojima su ovi geni inaktivirani pomoću insercije pG<sup>+</sup>host9 vektora. Nasuprot ishodnom soju, PrtP<sup>-</sup> mutant je pokazao povišen nivo bakteriocinske aktivnosti. Takođe, izgubila se zavisnost aktivnosti od pomenutih uslova spoljašnje sredine, tako da variranje koncentracije peptida u medijumu nije uticalo na ovu aktivnost. Na osnovu dobijenih rezultata postulirano je da u prisustvu proteinaze PrtP dolazi do hidrolize bakteriocina LcnB od strane ovog enzima. Ova hipoteza je testirana dodavanjem proteinaznog ekstrakta dobijenog iz LcnB<sup>-</sup> mutanta u uzorak bakteriocina dobijenog iz PrtP<sup>-</sup> mutanta. Aktivnost proteinazom tretiranog bakteriocina se smanjivala dok nije dostigla nivo aktivnosti ishodnog soja BGMN1-501. Time je pokazano da proteinaza narušava aktivnost LcnB bakteriocina, ali ne u potpunosti, najverovatnije putem hidrolize nakon koje digerirani LcnB zadržava nešto nižu aktivnost. Da do isecanja dela bakteriocina zaista dolazi potvrđeno je izolacijom i analizom molekulske mase samog LcnB bakteriocina iz ishodnog soja BGMN1-501, nakon njegovog rasta u uslovima koji indukuju ekspresiju PrtP proteinaze. Pomoću RF-HPLC i LC/MS utvrđeno je da je molekulska masa ovog bakteriocina manja od one koja je izračunata na osnovu aminokiselinske sekvence. Poređenjem veličina detektovane i očekivane molekulske mase zaključeno je da do hidrolize dolazi između šeste i sedme aminokiseline sa N terminusa LcnB bakteriocina.

**Ključne reči:** *Lactobacillus*, *Lactococcus*, proteinaze, PrtP, PrtR, kazein, bakteriocinska aktivnost, LcnB, digestija, medijum zavisna aktivnost

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna genetika i genetičko inženjerstvo

**UDK broj:** [579.864:577.15]:579.22(043.3)



Proteinases of lactic acid bacteria: diversity in mesophilic species of lactobacilli and impact on bacteriocin activity

## SUMMARY

Lactic acid bacteria are microorganisms of great importance for the industry of fermented products as well as for medicine, where they are gaining great attention as probiotics. Proteinases and bacteriocins, molecules secreted by these bacteria, have important roles in both of these aspects.

Proteinases are large enzymes involved in the first steps of digestion of extracellular proteins and are necessary for efficient bacterial growth in environments with low concentrations of small peptides and free amino acids. The proteolytic activity of different mesophilic lactobacilli, members of *Lb. casei* and *Lb. plantarum* groups, was tested against five main milk proteins, in this thesis. It was determined that *Lb. zae* LMG17315 possessed the most efficient proteolytic activity, since it hydrolyzed all given substrates. In addition, it was shown that proteinases of this strain could be released from cell wall in active form. *Lb. casei* ATCC393, a strain with controversial systematics, showed similar, but less efficient proteolytic activity. Presence of different proteinase genes in tested strains was analyzed with DNA-DNA hybridization and PCR. It was determined that strain LMG17315 possessed gene sequences coding for catalytic domains of three proteinases, while ATCC393 possessed only one such sequence. Two of these genes in strain LMG17315 were similar to previously characterized *prtP* and *prtR* genes, while the third one was a new proteinase gene, here named *prtP1*. The same gene was found in the genome of ATCC393. Considering the problematic taxonomic status of these strains, methods of molecular determination were applied for better understanding of their phylogenetic relationship. Although many authors suggest that ATCC393 should be reclassified in taxon *Lb. zae*, results obtained in this work highlighted some significant differences between these strains.

Analyzed strains of *Lb. plantarum* also showed potent proteolytic activity, even though proteinases in this species are not described. Similarly to *Lb. zae* LMG17315, *prtR*-like gene was found in *Lb. plantarum* LMG9208. This proteinase gene was previously found only in species *Lb. rhamnosus*. Catalytic region of the gene found in LMG9208 was sequenced and, as

observed for *prtP1*, comparing the sequence with other proteinase genes indicated that it belongs to a new proteinase type. Analyzed genes were not found in other strains of *Lb. plantarum*, suggesting that they possess new, unknown type of proteinase.

In the second part of this research, regulation of expression of bacteriocin LcnB was investigated in *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501, as well as possible interaction between this bacteriocin and proteinase PrtP. Bacteriocins are bacterial antimicrobial proteins, showing great diversity in structure and function. LcnB is a bacteriocin of known antimicrobial spectrum but neither its mechanism of action, nor active/binding site are defined. The study showed that its activity was dependent of the peptide concentration in growth medium, where higher concentrations led to higher antimicrobial activity. Nevertheless, the analysis of *lcnB* promoter activity showed that the same conditions caused a decrease in *PlcnB* activity. Considering these results, possible interaction between bacteriocin LcnB and proteinase PrtP was studied, given that proteinase activity showed similar dependence of peptide concentration in medium. For that purpose, mutants in both genes (*prtP* and *lcnB*) were constructed by inactivation through insertion of pG<sup>+</sup>host9 vector. Compared to the original strain, PrtP<sup>-</sup> mutant exhibited elevated level of bacteriocin activity. Moreover, dependence on medium conditions was lost, since variations in peptide concentration had no influence on this activity. Based on these results, it was postulated that PrtP proteinase hydrolyzed LcnB bacteriocin. This hypothesis was tested by adding proteinase extract obtained from LcnB<sup>-</sup> mutant into bacteriocin sample obtained from PrtP<sup>-</sup> mutant. Activity of this bacteriocin lowered with the treatment, until it reached the level of the original BGMN1-501 activity. This result proved that proteinase impairs bacteriocin LcnB activity, but not completely, probably through digestion of bacteriocin molecules which renders them less active. Isolation and molecular mass analysis of LcnB bacteriocin from the original BGMN1-501 strain grown in conditions favoring proteinase PrtP expression were further used to fully confirm the hypothesis. RF-HPLC and LC/MS analysis showed that molecular mass of LcnB bacteriocin was lower than predicted. After comparative analysis of obtained and predicted molecular mass values, it was determined that hydrolysis occurs between sixth and seventh amino acid on the N terminus of LcnB bacteriocin.

**Key words:** *Lactobacillus*, *Lactococcus*, proteinases, PrtP, PrtR, casein, bacteriocin activity, LcnB, digestion, medium dependent activity

**Scientific field:** Biologija

**Specific topic:** Molecular genetics and genetic engineering

**UDCnumber:** [579.864:577.15]:579.22(043.3)

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. ROD <i>Lactobacillus</i> .....	2
1.2. ROD <i>Lactococcus</i> .....	5
1.3. BAKTERIOCINI MKB .....	6
1.4. PROTEOLITIČKA AKTIVNOST MKB .....	8
1.4.1. Proteinaze MKB .....	9
1.4.2. Ostale uloge proteinaza MKB .....	13
1.5. KARAKTERISTIKE ODABRANIH VRSTA I SOJEVA .....	15
1.5.1. <i>Lactobacillus casei</i> grupa .....	15
1.5.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> grupa.....	17
1.5.3. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGMN1-501 .....	17
2. CILJEVI RADA.....	19
3. MATERIJAL I METODE .....	20
3.1. BAKTERIJSKI SOJEVI .....	20
3.2. KORIŠĆENI PLAZMIDI .....	21
3.3. MEDIJUMI ZA KULTIVISANJE BAKTERIJA.....	22
3.4. ISPITIVANJE PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI.....	23
3.4.1. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti celih ćelija.....	23
3.4.2. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti  proteinaznog ekstrakta .....	24
3.4.3. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu .....	24
3.5. IZOLOVANJE DNK.....	25
3.5.1. Izolacija totalne DNK iz laktobacila i laktokoka.....	25
3.5.2. Mini metoda za izolovanje plazmida iz laktokoka .....	26
3.5.3. Mini metoda za izolovanje plazmida iz <i>E. coli</i> .....	26
3.6. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK.....	27
3.6.1. Digestija DNK restrikcionim enzimima .....	27
3.6.2. Lančana reakcija polimeraze ("PCR").....	27
3.7. HORIZONTALNA GEL ELEKTROFOREZA DNK.....	29

3.8. DNK/DNK HIBRIDIZACIJA ("SOUTHERN BLOT") .....	29
3.8.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane.....	29
3.8.2. Obeležavanje probe sa digoksinom-dUTP-om .....	30
3.8.3. Hibridizacija sa digoksinom-dUTP-om obeleženom probom .....	30
3.9. GEL ELEKTROFOREZA U PULSIRAJUĆEM POLJU ("PFGE").....	31
3.10. LIGACIJA DNK FRAGMENTA .....	32
3.11. TRANSFORMACIJA ĆELIJA SA DNK.....	32
3.11.1. Priprema kompetentnih ćelija <i>E. coli</i> .....	32
3.11.2. Transformacija kompetentnih <i>E. coli</i> ćelija temperaturnim šokom ("Heat shock")..	33
3.11.3. Transformacija laktokoka elektroporacijom.....	33
3.12. KONSTRUKCIJA FUZIONOG VEKTORA I MERENJE AKTIVNOSTI PROMOTORA.....	34
3.13. KONSTRUKCIJE MUTANATA .....	35
3.13.1. Inaktivacija <i>prtP</i> gena i <i>lcnB</i> gena.....	36
3.14. METODE RADA SA BAKTERIOCINIMA.....	36
3.14.1. Difuzioni metod u bunarićima .....	36
3.14.2. Ispitivanje uticaja proteinaznog ekstrakta na aktivnost LcnB <i>in vitro</i> .....	37
3.15. MERENJE DIJAMETRA ZONA INHIBICIJE RASTA .....	38
3.16. IZOLACIJA I DETEKCIJA BAKTERIOCINA LcnB.....	38
3.16.1. Taloženje LcnB bakteriocina amonijum sulfatom.....	38
3.16.2. Određivanje mase bakteriocina LcnB.....	38
4. REZULTATI.....	40
DIVERZITET PROTEINAZA U MEZOFILNIM VRSTAMA LAKTOBACILA .....	40
4.1. ANALIZA PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI.....	40
4.1.1. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti <i>Lb. zaeae</i> LMG17315 .....	40
4.1.2. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti <i>Lb. casei</i> ATCC393 .....	41
4.1.3. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti različitih sojeva <i>Lb. plantarum</i> .....	42
4.1.4. Hidroliza ostalih proteina mleka.....	43
4.2. UTVRĐIVANJE PRISUSTVA RAZLIČITIH PROTEINAZNIH GENA U ODABRANIM SOJEVIMA .....	43
4.2.1. DNK/DNK hibridizacija.....	43

4.2.2. Potvrda rezultata hibridizacije PCR reakcijama .....	45
4.3. METODE MOLEKULARNE DETERMINACIJE .....	46
UTICAJ PROTEINAZE PrtP NA AKTIVNOST BAKTERIOCINA LcnB .....	47
4.4. UTICAJ MEDIJUMA NA AKTIVNOST PROMOTORA $P_{lcnB}$ .....	47
4.5. KONSTRUKCIJA MUTANATA <i>L. lactis</i> BGMN1-501 .....	48
4.6. UTICAJ MEDIJUMA NA BAKTERIOCINSKU AKTIVNOST KOD BGMN1-501 I NJEGOVOG PrtP <sup>-</sup> MUTANTA .....	50
4.7. UTICAJ PROTEINAZE PrtP NA AKTIVNOST BAKTERIOCINA LcnB <i>in vitro</i> .....	51
4.8. DETEKCIJA BAKTERIOCINA LcnB <i>in vivo</i> .....	52
5. DISKUSIJA .....	55
6. ZAKLJUČCI .....	68
6.1. DIVERZITET PROTEINAZNIH GENA U MEZOFILNIM VRSTAMA LAKTOBACILA .....	68
6.2. UTICAJ PROTEINAZE PrtP NA AKTIVNOST BAKTERIOCINA LcnB .....	69
LITERATURA .....	70

# 1. UVOD

Mlečno-kiselinske bakterije (MKB) su heterogena grupa mikroorganizama grupisanih na osnovu nekoliko zajedničkih karakteristika, od kojih najznačajnije mesto zauzima proizvodnja mlečne kiseline kao glavnog produkta fermentacije šećera. Ostale sličnosti među MKB su morfološke (Gram-pozitivne koke ili bacili) i fiziološke prirode (nesporulišuce, fermentišuce, anaerobne, ali aerotolerantne bakterije) i premda se po ovim kriterijumima više od 20 različitih rodova može okarakterisati kao MKB, iz praktičnih razloga glavnim rodovima se smatraju: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*. Pripadnici ovih rodova prirodno naseljavaju različita staništa, poput površine biljaka ili kože, gastrointestinalnog (GIT) i urogenitalnog trakta (UGT) ljudi i životinja. Mogu se naći u silaži, fermentisanim mlečnim i drugim proizvodima, ali i u mleku sisara. Iako među navedenim rodovima bakterija ima i životinjskih i humanih patogena (npr. neke vrste iz rodova *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Carnobacterium*), MKB se tradicionalno smatraju bezbednim mikroorganizmima, dok pojedini sojevi imaju i status humanih i životinjskih probiotika (ispoljavaju blagotvorne i protektivne efekte na zdravlje). Prema načinu fermentacije šećera sve MKB se mogu svrstati u dve grupe, u one koje proizvode mlečnu kiselinu kao jedini proizvod metabolizma (homofermentativne) i u one koji uz istu proizvode i značajne količine CO<sub>2</sub> i etanola ili acetata, formata ili sukcinata (heterofermentativne) (Wright & Axelsson 2012). Navedeni metaboliti se izbacuju u spoljašnju sredinu čime dolazi do njenog zakišeljavanja, što je iskorišćeno u prehrambenoj industriji, najviše u industriji fermentisanih mlečnih proizvoda. Zakišeljavanjem mleka onemogućava se rast većine štetnih i patogenih sojeva koji mogu kontaminirati hranu, a nizak pH dovodi do grušanja mleka što predstavlja jedan od ključnih koraka u tehnološkom procesu. Pored toga, MKB mogu sintetisati i različite sebi svojstvene bioaktivne peptide, egzopolisaharide i enzime koji umnogome doprinose osobinama finalnog proizvoda, bilo da se radi o njegovoj prezervaciji, ukusu, teksturi ili o pozitivnim efektima koje takav proizvod ima na zdravlje potrošača. Konačno, unošenje MKB konzumiranjem fermentisanih prehrambenih proizvoda dovodi do njihovog povećanog prisustva u organizmu domaćina, gde mogu ostvariti različita terapijska dejstva putem imunomodulacije, ekskluzije

patogena, ojačavanja mukozne barijere, inhibiranja angiotenzin-I-konvertujućeg enzima, sinteze vitamina i dr. Sojevi sa pomenutim osobinama su označeni kao probiotici i to su razlozi zašto se neke od ovih bakterija učestalo i veoma dugo koriste u procesima proizvodnje različitih prehrambenih proizvoda koji zauzimaju značajno mesto u humanoj i životinjskoj ishrani. Pored navedenih sojeva, treba istaći da u okviru MKB postoje i sojevi koji svoja probiotička svojstva ispoljavaju nakon kolonizacije oralne duplje ili genitalnog trakta.

Vrste MKB koje se najviše koriste u prehrambenoj industriji pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Lactococcus* i na njima će biti fokus ove disertacije.

## 1.1. ROD *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* čini najbrojniji rod u okviru MKB i odlikuje se izuzetnim diverzitetom u pogledu broja vrsta i njihovih osobina. Prema poslednjoj verziji Berdžejevog uputstva za bakteriološku sistematiku rod čini 120 vrsta, broj sa nesumnjivom tendencijom rasta. Laktobacili su uglavnom nepokretne bakterije štapićastog oblika i često su povezane u lance. Diverzitet ekoloških niša koje pripadnici ovog roda zauzimaju je veoma izražen – laktobacili se nalaze u mlečnim i drugim fermentisanim proizvodima, žitaricama, mesnim prerađevinama, pivu, vinu, voću i voćnim sokovima, ukiseljenom povrću, silaži, kiselom testu, vodi, zemlji itd. Pored toga, mogu se naći i u humanoj usnoj duplji i crevima, dok pojedine vrste često predstavljaju dominantne bakterije u genitalnom traktu žena (Hammes & Hertel 2009; Ravel et al. 2011). Heterogenost roda ogleda se u fiziološkoj, filogenetskoj i genetičkoj raznovrsnosti. U okviru roda postoji posebna podela po tipu metabolizma šećera i to na a) obligatno homofermentativne – proizvode isključivo mlečnu kiselinu, b) fakultativno heterofermentativne – u zavisnosti od dostupnog šećera, pored mlečne mogu proizvoditi i sirćetnu kiselinu, kao i alkohol i CO<sub>2</sub> i c) obligatno heterofermentativne (Hammes & Hertel 2009). Takođe postoji podela na mezofilne i termofilne vrste, u pogledu temperaturnog opsega u kojem rastu. Tako mezofilne vrste rastu u opsegu od 5 – 40°C, dok su za termofilne granice između 15 i 55°C. U cilju rasvetljavanja kompleksnih filogenetskih odnosa unutar roda danas se koriste uporedne analize sve dostupnijih genomskih sekvenci. Ovakvim *in silico* analizama podržana je ranija podela na tri grupe: *Lb. casei* grupu, "salivarijus klaster" i "acidofilus kompleks". Uočena su velika variranja u pogledu



veličina genoma (1,3 – 3,3 Mb), kao i dihotomija između pomenutih grupa – npr. za acidofilusni kompleks je utvrđeno da je srodniji rodovima *Leuconostoc* i *Oenococcus* (Barrangou et al. 2011; Wright & Axelsson 2012; Canchaya et al. 2006).

Neke vrste laktobacila se tradicionalno koriste u proizvodnji različitih fermentisanih mlečnih, mesnih i drugih proizvoda. Tako se *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Lb. acidophilus* koriste u proizvodnji jogurta, *Lb. helveticus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u proizvodnji sireva poput parmezana, mocarele, provolonea i švajcarskih sireva (Stiles 1996), *Lb. kefir* i *Lb. kefiranofaciens* u proizvodnji kefira (Teuber 2009), *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* i *Lb. plantarum* u proizvodnji različitih kobasica i salama (Stiles 1996; Wright & Axelsson 2012), *Lb. plantarum* i *Lb. brevis* u proizvodnji kiselog kupusa i krastavaca (Breidt et al. 2013), *Lb. buchneri* u produkciji silaže (Hu et al. 2009) itd. Osim protektivne uloge ostvarene snižavanjem pH, korišćeni laktobacili pozitivno utiču na ukus i druge organoleptičke osobine finalnog proizvoda. To je između ostalog posledica i toga što laktobacili metabolizmom šećera i aminokiselina proizvode aromatična jedinjenja poput diacetila, acetata, benzaldehida, krezola, skatola kao i različite amine, karbonilna i sumporna jedinjenja koji imaju pozitivne efekte na aromu proizvoda (Tanous et al. 2002). Takođe, izuzetno značajna je i aktivnost ekstraćelijskih proteinaza koje svojim delovanjem kroz produkciju ili uklanjanje različitih peptida direktno utiču na ukus i teksturu proizvoda (Savijoki et al. 2006). Poznato je i da delovanjem proteinaza mogu nastati tzv. bioaktivni peptidi sa različitim povoljnim osobinama (npr. antihipertenzivni, antimikrobni, antioksidativni peptidi). Ono što laktobacilima omogućava da tako značajno utiču na finalne osobine proizvoda je svojstvo tolerancije na nizak pH (donja granica pH 3,6-4), kao i da često predstavljaju dominantne bakterije u hrani u poslednjim fazama fermentacije (Hammes & Hertel 2009).

Laktobacili su i važni činiooci zdrave vaginalne mikrobiote. U studiji Ravela i saradnika (Ravel et al. 2011) na uzorku od 396 žena utvrđeno je da se vaginalne mikrobiološke zajednice mogu svrstati u pet grupa, od kojih u četiri laktobacili predstavljaju dominantnu populaciju, a u petoj su zastupljene sa nešto manjim procentom. Najprisutnije vrste su *Lb. iners*, *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri* i *Lb. jensenii*. I u ovom slučaju snižavanje pH ima protektivnu ulogu u sprečavanju kolonizacije sredine od strane nepoželjnih mikroorganizama poput *Neisseria gonorrhoeae* (Graver & Wade 2011). Interesantno, pokazano je takođe i da je D- oblik mlečne kiseline koje

ove bakterije sintetišu još efektivniji mikrobiocid od same kiselosti u borbi protiv HIV-a ili patogenih bakterija. Najnovija istraživanja pokazuju da je prisustvo *Lb. crispatus*, za razliku od ranijeg mišljenja koje se odnosilo na sve laktobacile, ključno za održavanje protektivnih svojstava vaginalnog mukusa (Nunn et al. 2015).

Konačno, najveći broj probiotika koji se danas široko koriste u preventivi ili u terapijama izvesnih kliničkih stanja, dolaze iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije, probiotici su "živi mikroorganizmi koji nakon primene u odgovarajućoj količini, doprinose zdravlju konzumenta". S obzirom na ovakvu definiciju broj sojeva koji su označeni kao potencijalni probiotici je izuzetno veliki, kao i spektar njihovog delovanja, međutim osim pomenutih rodova retko koje druge bakterije zadobijaju status probiotika ili kandidata. Jedno od osnovnih probiotičkih delovanja odnosi se na regulisanje sastava crevne ili vaginalne mikrobiote, tj. na efekat smanjivanja broja štetnih bakterija, bilo direktno – smanjivanjem pH sredine ili proizvodnjom antimikrobnih peptida (bakteriocina), bilo indirektno kroz imunomodulaciju, tj. pozitivno delovanje na imunski odgovor domaćina. Najčešće korišćeni laktobacilusni probiotici su sojevi iz vrsta *Lb. rhamnosus*, *Lb. reuteri*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* i *Lb. fermentum*, a njihova povoljna delovanja su pokazana u tretmanima različitih vrsta dijareja, inflamatornih bolesti i sindroma creva, netolerancije na laktozu, različitih alergija pa čak i kardiovaskularnih bolesti i nekih kancera (Pandey et al. 2015). Pokazano je čak i povoljno delovanje probiotika iz GIT-a na centralni nervni sistem (Lyte 2011; Bravo et al. 2011). Međutim, sistematske i meta-analize su pokazale da su ovi rezultati varijabilni i da se još uvek nedovoljno zna i o sastavu mikrobiote čoveka i o njenoj ulozi u različitim bolestima, kao i o samim mehanizmima delovanja probiotika. Postoje ozbiljna ograničenja u izvođenju zaključaka iz ovakvih istraživanja, pre svega usled nekonzistentnosti u metodama i pristupima različitih istraživača (*in vitro*, *ex vivo*, animalni modeli, klinička ispitivanja), kao i zbog različitosti sojeva i njihovih kombinacija koje se ispituju. Poznato je da međusobno srodni sojevi iste vrste mogu imati različite fiziološke efekte na organizam domaćina, te se rezultati dobijeni sa jednim ne mogu ekstrapolirati na druge sojeve (Gerritsen et al. 2011). Uzimajući sve ovo u obzir, kao i činjenicu da je promet na tržištu probiotika preko 30 milijardi dolara godišnje (Reid 2012), postoji opasnost od nepravilne upotrebe termina probiotik kao i njihove primene, i to će biti jedan od izazova nauke o probioticima u budućnosti.

## 1.2. ROD *Lactococcus*

Rod *Lactococcus* odlikuje se dosta manjim biodiverzitetom od roda *Lactobacillus*, ali predstavlja još važnije činioce u procesima proizvodnje mlečnih proizvoda – korišćenjem starter kultura uglavnom sačinjenih od laktokoka u svetu je 2010. godine proizvedeno preko 20 miliona metričkih tona sira (Statistical Yearbook FAO 2013). Rod sadrži svega pet vrsta, što ga čini mnogo kompaktnijim i sa manje podela u odnosu na *Lactobacillus*. Bakterije ovog roda su nepokretne okruglaste ćelije, koje mogu formirati kraće lance. Laktokoke su aerotolerantni fakultativni anaerobi, koje energiju za rast dobijaju fosforilacijom na nivou supstrata, proizvodeći L- mlečnu kiselinu fermentacijom šećera. Za razliku od laktobacila, u pitanju su isključivo homofermentativni organizmi sa mezofilnim temperaturnim opsegom rasta (10-40°C) (Teuber 2009).

Mogu se izolovati iz mleka i gotovo svih vrsta mlečnih proizvoda, a mogu se naći i u biljnom materijalu. Zbog svoje primene u industrijskoj proizvodnji, *Lactococcus lactis* je jedna od najbolje opisanih vrsta Gram-pozitivnih bakterija uopšte. Ova vrsta sa svoje dve podvrste, *L. lactis* subsp. *cremoris* i *L. lactis* subsp. *lactis*, primenjuje se kao starter kultura u proizvodnji mekih i tvrdih sireva poput čedera, kamembera, edamera, gaude i sl., zatim kefir, kiselog mleka, kisele pavlake, maslaca, kazeina itd. (Teuber 2009). Sojevi *L. lactis* subsp. *cremoris* i *L. lactis* subsp. *lactis* se kao starter kulture koriste kako samostalno, tako i u međusobnim kombinacijama i kombinacijama sa laktobacilima i streptokokama.

Osim već pomenutog snižavanja pH sredine što vodi sprečavanju razvijanja nepoželjne mikrobiote, razlozi za široku upotrebu laktokoka u proizvodnji mlečnih proizvoda su i :

- a) proizvodnja bakteriocina;
- b) proteolitička aktivnost;
- c) proizvodnja egzopolisaharida;
- d) proizvodnja jedinjenja koja povoljno utiču na ukus i aromu proizvoda (najznačajniji – diacetil) (von Wright 2011).

Zanimljivo je da su navedene osobine uglavnom kodirane genima na plazmidima (Teuber 2009).

### 1.3. BAKTERIOCINI MKB

Premda pripadaju različitim familijama (*Lactobacillaceae* i *Streptococcaceae*), laktobacili i laktokoke dele mnoge zajedničke karakteristike, što je najverovatnije posledica adaptacije na uslove sredine u kojima žive. Jedna od tih karakteristika je i proizvodnja malih ribozomalno sintetisanih antimikrobnih peptida – bakteriocina čija je primarna uloga u ubijanju ili inhibiranju rasta kompetirajućih bakterija, a na koje bakterije-proizvođači imaju specifičan sistem samozaštite (Cotter et al. 2013). Bakteriocini spadaju među najintenzivnije proučavane molekule MKB, za šta su ključna dva razloga: prvi je njihova uloga u bioprezervaciji hrane tj. produžavanju njenog roka trajanja, a drugi potencijalna klinička primena kao alternativa ili dopuna terapiji antibioticima. S obzirom na sve veću učestalost rezistencija na antibiotike kod patogenih bakterija, velika pažnja se pridaje bakteriocinima u nadi da će ovi molekuli predstavljati makar delimično rešenje za nedostatak adekvatnih antibiotika. U poslednje vreme razvijeni su i softverski alati za tzv. "genome mining" odnosno pretragu po sekvencama celih genoma sekvenciranih organizama u potrazi za novim bakteriocinskim genima. Na ovaj način do sada je detektovano skoro pet stotina potencijalnih bakteriocina (Morton et al. 2015) i taj broj će nesumnjivo rasti.

Većina do danas dobro opisanih bakteriocina su bakteriocini MKB (Riley 2009; Nes et al. 2015), ali s obzirom na diverzitet njihovih producenata, i bakteriocini čine veliku i heterogenu grupu molekula. Do sada je bilo više pokušaja klasifikacije bakteriocina, npr. prema veličini, homologiji ili strukturi, međutim otkrivanje novih bakteriocina koji su imali slična, ali i drugačija svojstva je uslovljavalo promenu klasifikacije (Rea et al. 2011). Po najnovijoj klasifikaciji svi bakteriocini su svrstani u dve klase – one koji prolaze značajne posttranslacione modifikacije (klasa I) i nemodifikovane peptide (klasa II), u koje uglavnom spadaju bakteriocini MKB (Cotter et al. 2013; Nes et al. 2013). Heterogenost u okviru ovih klasa ilustrovana je u tabeli 1, iz koje se vidi i da iako npr. postoji pet potklasa klase II, potklasa IId predstavlja grupu vrlo raznovrsnih bakteriocina – zapravo neraspoređenih ostalom klasifikacijom.

Spektar delovanja bakteriocina MKB je takođe heterogen, mada većina bakteriocina deluje na blisko srodne vrste. Međutim, često se uočava i aktivnost prema kompetirajućim vrstama koje nastanjuju isti habitat. S obzirom da MKB koje ih proizvode nastanjuju prehrambene proizvode, humani i životinjski GIT i UGT, mnogi bakteriocini izražavaju dejstvo

na patogene značajne za humano i životinjsko zdravlje, kao što je npr. *Listeria monocytogenes*. Primeri bakteriocina sa širim spektrom delovanja su nizin iz *L. lactis*, bakteriocin L23 i fermenticin HV6b iz *Lb. fermentum*, ili laktocilin iz *Lb. gasseri* koji imaju vrlo širok spektar inhibitorynog delovanja, uključujući i različite Gram-negativne patogene čoveka (Pascual et al. 2008; Kaur et al. 2013; Donia et al. 2014).

Jedan od bakteriocina koji je prvi izučen, a istovremeno i jedan od najpotentnijih je nizin – jedini bakteriocin koji se danas koristi u preko 80 zemalja kao prehrambeni aditiv, i to najviše za inhibiciju patogenih vrsta *Listeria monocytogenes* u sirevima i *Clostridium botulinum* u mesnim proizvodima. U iste svrhe koriste se još i pediocin PA-1, sakacini A i P, mada još uvek nemaju status aditiva hrani (Collins et al. 2010).

**Tabela 1. Neki bakteriocini klase 1 i 2 (modifikovano iz Cotter et al. 2013).**

Grupa	Osobina	Primer
<i>Klasa I (modifikovani)</i>		
<b>Lantibiotici</b>	Lantioninski mostovi	Nizin, Mersacidin
<b>Linaridini</b>	Dehidratacija aminokiselina	Cipemycin
<b>Proteusini</b>	Višestruke hidroksilacije, epimerizacije i metilacije	Politeonamid A
<b>Saktibiotici</b>	Sadrže S- $\alpha$ -C veze	Subtilozin A, Turicin CD
<b>Tiopeptidi</b>	Sadrže centralni piridinski, dihidroperidinski ili piperidinski prsten	
<b>Glikocini</b>	Sadrže S- vezane glikopeptide	Sublancin 168
<i>Klasa II (nemodifikovani ili ciklični)</i>		
<b>Ia peptidi (pediocinu slični bakteriocini)</b>	Kozerviran YGNGV motiv	Pedocin PA-1, enterocin CRL35, karnobakteriocin BM1
<b>Ib peptidi</b>	Dvopeptidni bakteriocini	ABP118, Laktacin F
<b>Ic peptidi</b>	Ciklični peptidi	Enterocin AS-48
<b>IId peptidi</b>	Linearni, nemodifikovani jednopeptidni bakteriocini	Laktokokcin A, <b>Laktokokcin B</b> , Laktokokcin M, LsbB
<b>Ile peptidi</b>	Neribozomalna sideroforna modifikacija	MccE492, MccM

S obzirom na sve veću opasnost koju predstavlja širenje rezistencija na antibiotike među patogenim sojevima, sve više istraživanja posvećuje pažnju potencijalnoj primeni bakteriocina u medicini. U tom smislu, do danas je pokazano antimikrobno delovanje nekolicine bakteriocina MKB na neke sojeve streptokoka, stafilokoka, enterokoka i klostridija rezistentne na antibiotike,

kao i na neke patogene iz roda *Propionibacterium*. Međutim, iako su mnogi patenti prijavljeni i novi proizvodi izlaze na tržište, ostaje da se vidi njihov stvarni učinak. Prepreka uspešnoj primeni bakteriocina na svim poljima jeste još uvek nedovoljno poznavanje njihovog mehanizma delovanja, rezistencije i regulacije ekspresije tako da su i fundamentalna istraživanja na ovom polju još uvek u zamahu (Collins et al. 2010; Cotter et al. 2013; Nes et al. 2015).

#### 1.4. PROTEOLITIČKA AKTIVNOST MKB

Još jedna u nizu adaptacija na životne uslove ogleda se u tome što su i laktobacili i laktokoke – "probirljivi" mikroorganizmi, odnosno u tome što za rast zahtevaju prisustvo velikog broja različitih nutrijenata u sredini. Ovo je svakako posledica života u sredinama poput mleka i GIT-a, koje su bogate aminokiselinama, šećerima, nukleotidima, vitaminima, mikroelementima i sl., što je dovelo do gubitka značajnog broja gena, ali i do zadobijanja ili dupliranja nekih drugih. Smatra se da je kod svih MKB gubitak gena u odnosu na zajedničkog evolutivnog pretka – evolutivni trend (Makarova et al. 2006).

Ovaj trend se najbolje ogleda u gubitku gena odgovornih za biosintetske enzime, zbog čega su sve laktokoke i laktobacili iz mlečnih proizvoda ili GIT-a auktotrofi u nekoj meri. Primera radi, humani crevni komensal *Lb. johnsonii* ne poseduje nijedan gen odgovoran za biosintezu aminokiselina ili purinskih nukleotida (Pridmore et al. 2004). Istovremeno sa redukcijama genoma, odvijalo se uvećavanje fonda gena za različite metaboličke enzime, peptidaze i transportere, koji omogućavaju efikasnije iskorišćavanje svih nutrijenata dostupnih u spoljašnjoj sredini.

Problem metabolizma proteina usled nedostatka biosintetskih enzima kod laktokoka i laktobacila rešen je postojanjem efikasnog proteolitičkog sistema koji omogućava hidrolizu proteina i unos oslobođenih peptida i aminokiselina iz spoljašnje sredine u bakterijske ćelije. Proteolitički sistemi su od presudnog značaja za efikasan rast MKB u mleku, što omogućava i njihovu uspešnu primenu u proizvodnji fermentisanih proizvoda. Proteolitički sistemi MKB sastoje se uglavnom iz:

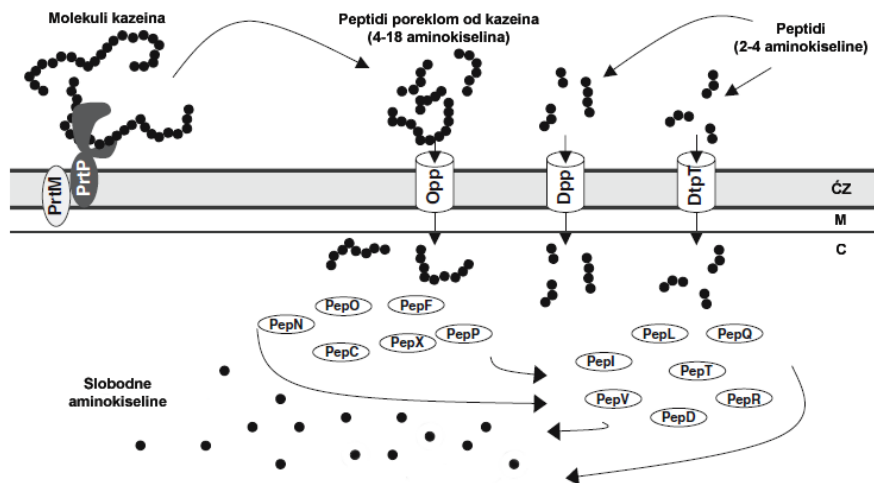
- a) jedne do dve ekstraćelijske proteinaze;
- b) nekoliko membranskih transportera;

c) većeg broja intracelularnih peptidaza.

S obzirom da je količina slobodnih aminokiselina u sredini kao što je mleko nedovoljna za brz bakterijski rast, i s obzirom da bakterije ne mogu unositi velike polipeptide u ćelije, ekstraćelijske proteinaze služe za hidrolizu velikih proteina prisutnih u medijumu do nivoa oligopeptida (4 – 30 ak). Peptidi manji od 18 ak bivaju zatim delovanjem transportnih proteina prebačeni u unutrašnjost bakterijskih ćelija, gde na njih deluju intracelularne peptidaze dajući slobodne aminokiseline kao produkt svog delovanja (Savijoki et al. 2006).

### 1.4.1. Proteinaze MKB

Ekstraćelijske proteinaze ("Cell-envelope proteinase" – CEP), ili kako ih neki autori nazivaju "laktocepini" su veliki (~ 200 kDa) enzimi čija aktivnost predstavlja prvi korak u hidrolizi i konzumiranju proteina prisutnih u medijumu u kom bakterije žive. Do sada je klonirano i okarakterisano nekoliko gena laktokokalnih i laktobacilusnih proteinaza, počevši od laktokokalne PrtP proteinaze (Kok et al. 1985). Najveći broj podataka o ovim enzimima, kao i o ostalim činiocima proteolitičkog sistema, došao je iz proučavanja najkorišćenijih bakterija u industriji fermentisanih proizvoda – vrste *L. lactis*. Proces razgradnje kazeina, unosa i dalje digestije peptida, kao i regulacija ovih procesa, detaljno su opisani u ovom organizmu (Slika 1).



Slika 1. Šematski prikaz funkcionisanja proteolitičkog sistema kod MKB. PrtP – ekstraćelijska proteinaza, PrtM – šaperon odgovoran za translokaciju PrtP, Opp – permeaza oligopeptida, Dpp/DtpT – transporteri. Pep – unutarćelijske peptidaze. Modifikovano iz Savijoki et al. (2006).

### 1.4.1.1. PrtP proteinaza laktokoka

PrtP proteinaza se sintetise u obliku preproteina sa adekvatnom lider sekvencom koja nascentni protein usmerava ka ćelijskoj membrani gde uz pomoć šaperona, PrtM proteina, biva prebačen u spoljašnju sredinu. Nakon toga dolazi do autokatalitičke aktivacije hidrolitičkim odsecanjem prodomena na N- terminusu, dok sami enzimi ostaju vezani svojim C-terminusom za ćelijski zid tj. samu bakteriju. Međutim i ovaj region može biti podložan autodigestiji, čime dolazi do oslobađanja aktivnih molekula u medijum (Haandrikman et al. 1991). Sami enzimi imaju izraženu multidomensku strukturu i definisano je osam domena:

**Preprodomen** – kao što je prethodno navedeno, ovaj domen sadrži lider sekvencu karakterističnu za Gram-pozitivne bakterije, dužine oko 40 ak, koja je odgovorna za translokaciju kroz membranu i ispravnu lokalizaciju proteina. Drugi deo je tzv. prodomen (~ 150 ak), koji se iseca nakon translokacije u spoljašnju sredinu. Ova digestija predstavlja trenutak aktivacije enzima. Važno je napomenuti da se radi o autokatalitičkoj obradi, tj. isecanju od strane već aktivnih proteinaza (Laan & Konings 1991);

**Katalitički ili proteazni (PR) domen** – ovaj domen (~ 500 ak) je odgovoran za katalitičku aktivnost proteinaza i pokazano je da je ta aktivnost praktično nezavisna od ostatka enzima – enzimi kojima je odstranjeno preko 800 ak sa C termina zadržavaju nepromenjenu katalitičku aktivnost (Bruinenberg et al. 2000). Katalitički domen pripada superfamiliji subtilizin-proteaza serinskog tipa i ovo je evolutivno najočuvaniji domen enzima. Postoji velika sličnost u ovom domenu između proteinaza iz različitih organizama – laktokoka, laktobacila, streptokoka, kao i ostalih subtilaza (npr. iz roda *Bacillus*). Poravnanja sekvenci nekih proteinaza iz različitih izvora prikazana su na slici 2.

**Insert domen** – ovaj domen nalazi se unutar katalitičkog domena i predstavlja domen koji nije obavezno prisutan u različitim proteinazama MKB. Dugačak je oko 135 ak, i ta sekvenca je varijabilnija u odnosu na ostatak katalitičkog domena. Funkcija mu nije do kraja definisana – delecione analize su pokazale da uklanjanje ovog domena smanjuje aktivnost proteinaza do tri puta, a smatra se i da utiče na supstratnu specifičnost.



```

PrtR NQDTLTKGNVKGWNE-GYQGQGMVVAVIDSGVQA-HDDLRLSDDSTAAI-TKEKAEAAISKLG--YGSYVNSKIPFAYDYV-NNDSV
PrtP DAKANSMANVQAVWSNYKYKGEGETVVSVIDSGIDPTHKDNRLSDDKDVKL-TKSDVEKFTDTVK--HGRYFNSKVPYGFNYADNNDTI
PrtH DSSADNNANVSTVWNNYKYKGEGETVVSVIDTGIDPNHKLRLSDDSKVKL-TKDKVNAFTKESG--YGRYFTDKVPYGHNYSDNNDNI
PrtB DESADQMAQVQDVWQEQKLGEGMVISIIDTGIDSSHQDLKLDLDSGVSTAL-SKSEVESDKSKLG--HGKYYTEKVPYGYNYADKNDQI
Csp NIDSNKIITVPKWNNT-GYKGEGETVVAVIDSGLDTNHDALQLNDSTKAKYQNEQQMNAAKAKAGINYGKWNKVI FGHNYVDVNTL
ScpA TIRDLNDPSQVKTLEKAGKAGTVAVIDAGFDKNHEAWRLDTKTARYQSKEDLEKAKKEHGTYG-WVNDKVAYYHDYSKDGKT-

PrtR NTGTTVAGSTHEGHEVAGIIAANGTTADGATGNEKATTVYKGVAPAEQILAMQVIFEFADENAN--DISRAIRDAVTLGANAIQMSLG
PrtP TDD--KVDEQHGMHVAGIIGANGTG-----DDPAKSVVGVAPAEQLLAMKVFNSNDSAKTGSATVVAIEDSAKIGADVLNMSLG
PrtH TDD--NPSEQHGMHVAGIIVAANGTA-----DSVNSVVGVAPEAQLLAMKAFNSNDSASTDSTSIIGAIIDDSAKLADVLNMSLG
PrtB VDN--CCGEMHGQHVAGIAGANGQ-----VKGVAPDAQLLAMKVFNSNNAKNSGAYDDDIISAIEDSVKLGADVLNMSLG
Csp KE---VKSTSHGMHVTSIATANPSK-----KDTNELIYGVAPAEQVMFMRVFSDEKRGTPALYVKAIEDAVKLGADSINLSLGG
ScpA ----AVDQEHSTHVSGILSGNAPSE-----TKEPYRLEGAMPEAQLLLMVVEIV-NGLADYARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGN

PrtR IGVTEQDLTDEEQAAVQYATDHGVFVSI SAGNNANAGSIIGSKTSNDISTAYSPKNDSTYGDPGAASAMTVA-AEKSAT-----
PrtP SNSGNQTLDEPELAAVQANANESGTA AVISAGNSGTSGSATEGVNKDYGLQDNEMV---GSPGTSRGATTVASAENTDV- (145) -K
PrtH SVSGEQTEDEPEVA AVERATKKGTA AVISAGNSGTSNSEIEGVNKAYYGNPDMETL---GNPGTARSATTVASAENTKA- (145) -A
PrtB SVSSDVGSPDPOQQA VAKASEAGVINVISAGNSGVAGSTADGNPNVNTGTSELSTV---GTPGVTPDALTVASAENSKV- (150) -N
Csp ANGLSVNADRLIKALEMARLAGVSVVIAAGNDGTFGSGASKPSALY---PDYGLV---GSPSTAREAISVASYNNTTL- (139) -N
ScpA AALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSFSGGKTRLPADH---PDYGVV---GTPAADSTLTVASYSPDKQ- (128) -T

```

**INS**

```

PrtR GDKSEMDGFSWGLPMADYTLKPDISAPGDNVISTAI-DPTTNTQTYATESGTSMAGFPYNAGA-ALLVMQKIKATRDLQAGADLVKAV
PrtP YTEDKMSDFTSYGPVSNLSFKPDITAPGGNIWSTQN-----NNGYTNMSGTSMASPFPIAGSQALLKQALNNKNNPFYAYYKQLKGT
PrtH RQTDLMSDFTSYGPTSSLA FKPDISAPGGHIWSTQN-----NNGYTNMSGTSMASPFPIAGTQALVSVQTMNDKNGAFYATYQRMSAE
PrtB SRAGKMSDFTSWGPTEPELDFKPEITAPGGKIYSLAN-----DNKYQMSGTSMSAPFVAGSEALILQGIK-----KQGLNLSGE
Csp PNAGVLSDFSSWGLTADGQLKPDLSAPGGSIIYAAIN-----DNEYDMMSGTSMASPHVAGATALLKQYLL-----KEHPELKKG
ScpA ASGTKLSRFSSWGLTADGNIKPDIAAPGQDILSSVA-----NNKYAKLSGTSMSAPLVAGIMGLLQKKQYE-----TQYPMPTFS

PrtR KLALMNAADPMKDINYPDTY-----ISPRRQAGAGQIDVSVQAGDL (930)
PrtP ALTDFLKVTMNTAQPIINDINYNVIVSPRRQAGGLVDVKAIDA (1263)
PrtH ERTPFIKTLEMNTASIQPDI SHDNVIVSPRRQAGGFINANATI QAL (1162)
PrtB ELVQFAKNSAMNTSHPVYDTEHTKEIISPRRQGSGEINVKDAINN (1257)
Csp DIERTVYKLLMSTAKAHLNKD-TGAYTSRRQAGAGIIDVAAA VQT (933)
ScpA ERLDLAKKVLMSATALYDED-EKAYFSRRQAGAGAVDAKKASAA T (582)

```

**Slika 2. Poravnanje sekvenci PR-domena različitih proteinaza MKB. Označene su aminokiseline D, H i S koje čine katalitičku trijadu. INS predstavlja poziciju i broj aminokiselina I-domena. Svaka sekvencija počinje N-terminusom zrele proteinaze. Brojevi u zagradama predstavljaju broj aminokiselina do kraja proteinaze. Csp i ScpA – ekstracelularne proteinaze streptokoka. Preuzeto iz Paštar (2003).**

**A i B domeni** – veliki domeni (~ 400 ak i 500 ak) nepoznate funkcije. Delecijom B domena narušava se stabilnost, ali ne i aktivnost i specifičnost katalitičkog dela enzima, tako da se smatra da je njegova primarna uloga u stabilizaciji proteinaza.

**Heliks domen** – domen od 200 ak koji obuhvata deo enzima od B domena do ćelijskog zida. Ime je dobio po pretpostavljenom modelu strukture koji predviđa da je ceo domen sačinjen od većeg broja alfa-heliksa koji čine strukturu upredene zavojnice (eng. "coiled coil"). Smatra se da učestvuje u pozicioniranju proteinaze, tj. omogućuje da katalitički i A i B domeni što više prodru u spoljašnju sredinu i ostvare bliži kontakt sa supstratom.

**W domen** – ili zidni ("wall") domen (~ 100 ak) je deo enzima koji se nalazi inkorporiran u peptidoglikan bakterijske ćelije i može se naći u mnogim ekstraćelijskim proteinima Gram-pozitivnih bakterija. Smatra se da zahvaljujući specifičnom aminokiselinskom sastavu proteinaze mogu kroz ovaj domen ostvariti elektrostatičku interakciju sa ćelijskim zidom.

**AN domen** – ili ukotvljujući ("anchor") domen, je mali C-terminalni deo proteina preko koga zahvaljujući aktivnosti enzima sortaze dolazi do kovalentnog povezivanja (eng. "crosslinking") ostatka enzima sa ćelijskim zidom (Siezen 1999; Savijoki et al. 2006).

Neposredno nakon otkrića proteinaza u *L. lactis*, prema supstratnoj specifičnosti definisana su prvo dva tipa PrtP proteinaza, P<sub>I</sub> i P<sub>III</sub> tip, a zatim i mnoštvo intermedijarnih tipova (Exterkate et al. 1993).

#### **1.4.1.2. Proteinaze laktobacila**

Nakon što je otkriveno da se *prtP* gen može naći i kod *Lb. paracasei* (Kojic et al. 1991; Holck & Naes 1992), znanje o broju, vrstama i prisustvu različitih proteinaznih gena u laktobacilima se stalno uvećavalo i komplikovalo. Dok sve laktokoke imaju istu proteinazu PrtP (sa malim varijacijama), kod laktobacila postoji mnogo šira raznovrsnost. Tako, pored PrtP iz *Lb. paracasei*, iz laktobacila su okarakterisane i PrtB iz *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Gilbert et al. 1996), PrtH i PrtH2 iz *Lb. helveticus* (Pederson et al. 1999; Genay et al. 2009) i PrtR iz *Lb. rhamnosus* (Pastar et al. 2003). Mada granice među ovim tipovima nisu definisane, sve ove proteinaze karakterišu značajne razlike na nivou nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci kao i različite biohemijske osobine enzima. Poslednja u nizu, PrtL izolovana je i okarakterisana iz *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (Villegas et al. 2015). Iako je prema aminokiselinskoj sekvenci ovaj enzim najbližiji PrtB proteinazi već opisanoj u istoj vrsti (95% na nivou katalitičkog domena, dok ostali domeni pokazuju manju identičnost), autori ističu niz razlika u osobinama enzima kao argument zašto ovaj enzim svrstavaju u poseban tip. I zaista, supstratna specifičnost, sposobnost odvajanja sa ćelijskog zida, osetljivost na pH, koncentraciju soli i temperaturu, značajno variraju među opisanim proteinazama. Međutim, važno je istaći je da za fenotipske razlike mogu biti odgovorne minimalne varijabilnosti na genetičkom nivou. Naime, za velike razlike koje postoje u supstratnoj specifičnosti u okviru različitih PrtP proteinaza odgovorne su razlike u pojedinačnim aminokiselinama na nekoliko pozicija (Vos et al. 1991; Exterkate et al. 1993). S obzirom na sve navedeno, ne postoje jasno definisani kriterijumi na osnovu kojih bi se neka novootkrivena proteinaza svrstala u neki od već postojećih tipova tj. na osnovu kojih bi se izdvojila kao novi tip. Kako su otkrivane, proteinazama su imena davana na osnovu vrsta iz kojih su izolovane i smatralo se, s obzirom na uočene razlike, da je

pojedini tip enzima specifičan za vrstu. Međutim, kako su sekvence celih genoma postajale dostupne za sve veći broj sojeva, došlo se do otkrića da se proteinazni (*prt*) geni prethodno asocirani sa jednom vrstom mogu pojaviti u drugim vrstama. Tako je npr. u genomu probiotičkog soja *Lb. rhamnosus* GG, pored *prtR* gena, nađen još jedan putativni proteinazni gen (*prtP*-like), čija je sekvenca sličnija *prtP* genu prethodno asociranim sa *Lb. paracasei* i *L. lactis* (Kankainen et al. 2009). S druge strane, još komplikovanija slika stekla se uvidom u raznovrsnost gena kod *Lb. helveticus* kod koje je pokazano prisustvo bar pet različitih *prt* gena u genomima različitih sojeva (Griffiths & Tellez 2013). Navedena otkrića su povećala sumnju oko aktivnosti prvobitno opisanih *prt* gena i nametnula pitanja o distribuciji i značaju prisustva različitih proteinaznih gena u rodu *Lactobacillus*.

Osim *Lb. paracasei* kod kog je nađena PrtP proteinaza, svi ostali laktobacili kod kojih je ovaj enzim opisan su termofilni laktobacili. Dosta se zna o njihovoj genetici, regulaciji ekspresije i fiziologiji. Nasuprot tome, nema podataka o proteinazama i njihovoj distribuciji kod mezofilnih laktobacila. Takođe, dok se dosta zna o načinu i efikasnosti hidrolize kazeina od strane različitih proteinaza, malo podataka je dostupno o eventualnoj sposobnosti hidrolize drugih proteina (tzv. proteina surutke), koji čine značajnu proporciju proteina u mleku (~ 20%). Najzastupljeniji među tim proteinima su  $\beta$ -laktoglobulin i  $\alpha$ -laktalbumin.

## **1.4.2. Ostale uloge proteinaza MKB**

### **1.4.2.1. Proizvodnja mlečnih proizvoda**

Hidroliza proteina mleka igra veoma važnu ulogu u procesima proizvodnje mlečnih proizvoda, prvenstveno jer omogućava rast bakterija koje su neophodne za proces – smatra se da su peptidi poreklom iz kazeina odgovorni za 90% rasta laktokoka u mleku. Međutim, kao što je već navedeno, i sama enzimaska aktivnost ima neposredne efekte na finalni proizvod – poznato je naime da peptidi koji nastaju delovanjem ovih enzima mogu značajno uticati na teksturu i ukus sireva, prvenstveno na stepen gorčine (Lemieux & Simard 1992). Pokazalo se da sirevi pravljeni korišćenjem starter kultura koje ne poseduju proteinaze imaju loše organoleptičke osobine. Zato se za peptide nastale hidrolizom proteina mleka kaže i da su "prekursori ukusa" (Buist 1997).

Važno je napomenuti i da formiranje ukusa kod sireva zavisi od aktivnosti proteinaza na još jedan posredan, ali podjednako važan način. Naime, kako se proces fermentacije odvija sa vremenom dolazi do lize bakterijskih ćelija i oslobađanja unutarćelijskog sadržaja u spoljašnju sredinu tj. gruš, što za posledicu ima kontakt intracelularnih bakterijskih enzima sa peptidima nastalim prethodnom proteolizom. Kao rezultat aktivnosti ovih enzima nastaju različiti alkoholi, aldehidi, karboksilne kiseline, estri itd., koji mogu značajno uticati na aromu finalnog proizvoda (Smit et al. 2005). Međutim, sam proces lize je kontrolisan proteinom autolizinom AcmA, za koji je pokazano da može biti supstrat za PrtP proteinazu (Buist et al. 1998). Degradacijom autolizina, PrtP može smanjiti lizu ćelija, što ima direktne posledice na dinamiku zrenja sira kao i na njen ishod.

#### **1.4.2.2. Probiotička aktivnost**

Nedavno su fon Šilde i saradnici (2012) pokazali da je PrtP proteinaza ključan činilac u antiinflamatornoj aktivnosti probiotičkih sojeva laktobacila. Radeći na mišjem modelu kolitisa, oni su pokazali direktnu vezu između produkcije PrtP proteinaze iz vrsta *Lb. casei* i *Lb. paracasei* i smanjenja inflamacije tkiva. Analizirajući ovu aktivnost došli su do otkrića da PrtP proteinaza može specifično hidrolizovati proinflamatorni hemokin IP-10 odgovoran za regrutaciju limfocita koja posledično dovodi do zapaljenske reakcije i oštećenja tkiva. Osim inflamatornih bolesti creva, smatra se da je narušavanje regulacije u proizvodnji i odgovoru ćelija imunskog sistema na proinflamatorne hemokine osnov razvoja različitih inflamatornih bolesti, poput psorijaze, lupusa ili reumatoidnog artritisa. Zahvaljujući tome što ima kapacitet hidrolize niza hemokina uključenih u ove bolesti, autori spekuliraju da se prečišćena PrtP proteinaza može koristiti kao lek. Ove tvrdnje potkrepljene su eksperimentima u kojima je miševima sa kolitisom intraperitonealno ubrizgavan ekstrakt PrtP proteinaze što je dovelo do smanjenja regrutacije imunskih ćelija, inflamacije i amelioracije bolesti (von Schillde et al. 2012; Hörmannspenger et al. 2013).

### 1.4.2.3. Proizvodnja bioaktivnih peptida

Veliku pažnju poslednjih decenija privlači proizvodnja bioaktivnih peptida bakterijskom hidrolizom proteina različitog porekla. Tako je pokazano da razlaganjem proteina mleka može doći do oslobađanja peptida sa značajnim imunomodulatornim, antihipertenzivnim, antioksidativnim i antibakterijskim svojstvima, a može doći i do formiranja opioidima-sličnih peptida (Hayes et al. 2007; Korhonen & Pihlanto 2007). Po istom principu pokazano je da bakterijska fermentacija može dovesti do smanjenja alergenosti proteina mleka ili soje, što može imati izuzetnog značaja za ishranu alergičnih ili imunokompromitovanih pacijenata (Bu et al. 2013; Frias et al. 2008).

Velike nade polažu se u "funkcionalnu hranu", koja bi bila napravljena uz pomoć mikroorganizama koji bi je već tokom procesa proizvodnje obradili na način da može doprineti zdravlju, ne računajući samu nutritivnu vrednost. Nakon toga, te bakterije bi bile unete u organizam konzumiranjem hrane, gde bi svojim raznovrsnim probiotičkim delovanjem mogle dodatno doprineti opštem zdravlju potrošača.

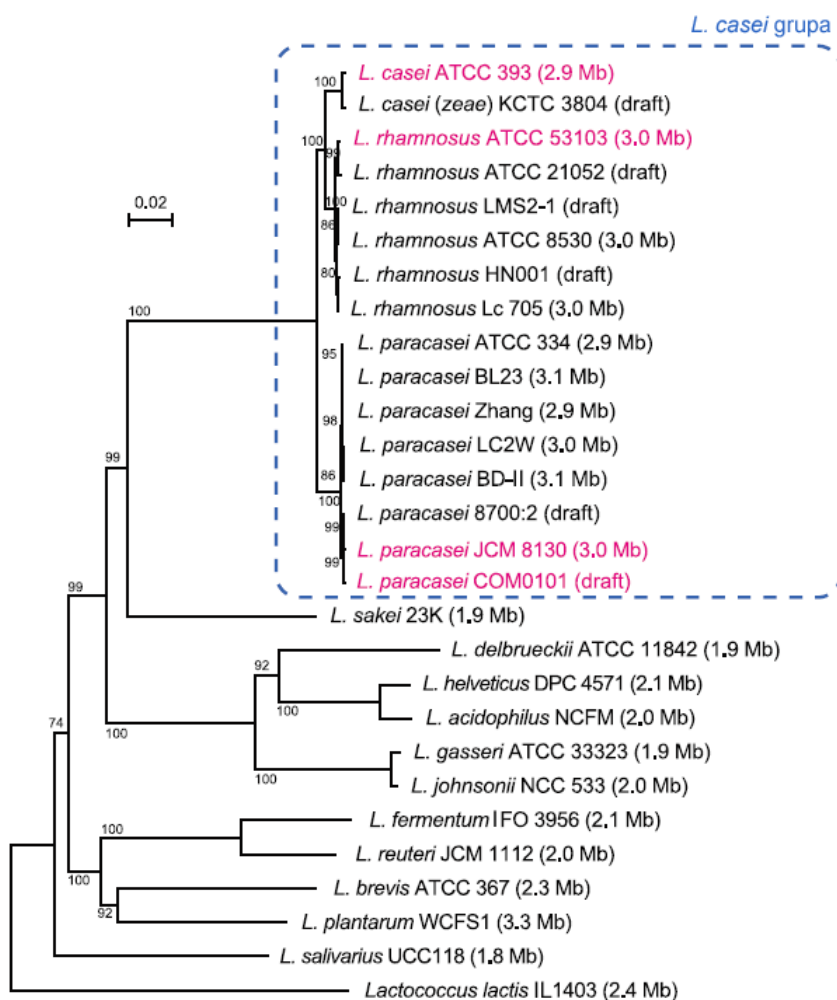
## 1.5. KARAKTERISTIKE ODABRANIH VRSTA I SOJEVA

U okviru ove disertacije rađeno je na predstavnicima *Lb. casei* grupe (*Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* i *Lb. zaeae*) i *Lb. plantarum* grupe (*Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, i *Lb. pentosus*), kao i na vrsti *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

### 1.5.1. *Lactobacillus casei* grupa

Vrste *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* i *Lb. zaeae* su filogenetski i fenotipski povezane vrste i zajedno čine *Lb. casei* grupu u okviru mezofilnih fakultativno heterofermentativnih laktobacila (Slika 3). Ova grupa pokazuje izuzetnu ekološku adaptabilnost i pripadnici istih vrsta izolovani su iz sirovih i fermentisanih mlečnih i biljnih proizvoda, kao i iz humane i životinjske usne duplje GIT-a i UGT-a. Klasifikacija i nomenklatura ove grupe je kontroverzna. Predstavnik vrste *Lb. casei* je soj ATCC393 za koga se brojnim genetičkim analizama pokazalo da ima najviše sličnosti sa *Lb. zaeae*, i da svojim osobinama ne predstavlja

većinu izolata svoje vrste. *Lb. zae* je slabo okarakterisana vrsta, izolovana iz kukuruznog sirupa koji nastaje industrijskom obradom kukuruza, prvobitno deponovana 1959. godine od strane sovjetskog naučnika Kuznjecova (Mills & Lessel 1973). Međutim, nedugo nakon deponovanja soja u američku kolekciju kultura (ATCC, broj 15820), utvrđeno je da se ovaj soj ni po jednoj fenotipskoj karakteristici ne razlikuje od već definisanog tipskog soja ATCC393, zbog čega je inicijalno predloženi naziv za novu vrstu *Lactobacterium zae* – odbačen. S druge strane, tokom godina sakupljen je veliki broj dokaza koji su sugerisali ne samo da ATCC393 nije reprezentativan soj za vrstu *Lb. casei*, već da iz iste treba da bude isključen. Istovremeno, predloženo je da vrsta *Lb. paracasei* bude "ukinuta" kako bi se zapravo ujedinila sa *Lb. casei* (Dicks et al. 1996).



Slika 3. Filogenetski odnosi između genoma svih sekvenciranih laktobacila, na osnovu poređenja sekvenci 34 ribozomalna proteina. S obzirom na problematičnu klasifikaciju i često mešanje *Lb. casei* i *Lb. paracasei* u literaturi, svi sekvencirani sojevi ovih vrsta su ovde predstavljene kao *Lb. paracasei*. U zagradama su naznačene veličine genoma. Modifikovano iz Toh et al. (2013).

S obzirom da je različitim analizama pokazano da soj ATCC393 najviše sličnosti pokazuje sa ATCC15820, kao i da se ta dva soja razlikuju od ostalih sojeva *Lb. casei* grupe, predloženo je da se ta oni izdvoje u novu vrstu, *Lactobacillus zae* (Dellaglio et al. 2002). Ovo, ipak, nije prihvaćeno od strane Komisije internacionalnog komiteta za sistematiku bakterija, najviše zbog nomenklaturnih pravila (Tindal 2008). Berdžejevo uputstvo za bakteriološku sistematiku prepoznaje *Lb. zae* kao posebnu vrstu.

### **1.5.2. *Lactobacillus plantarum* grupa**

*Lb. plantarum* je raznovrsna mezofilna vrsta, čiji se pripadnici mogu izolovati iz veoma različitih ekoloških niša, kao što su mlečni proizvodi, fermentisani biljni i mesni proizvodi, biljni materijal, humana pljuvačka i GIT (Siezen et al. 2010). Veliki broj različitih bakteriocina je izolovan iz ove vrste (da Silva Sabo et al. 2014), a neke pripadnike karakteriše i proizvodnja antifungalnih agenasa (Yang & Chang 2010). Sekvenciranjem genoma *Lb. plantarum* WCFS1 utvrđeno je da su genomi ove vrste među najvećim u laktobacilima (> 3 Mb), ali nije detektovan *pvt* gen (Kleerebezem et al. 2003).

Iako nije član *Lb. casei* grupe, kod jednog soja *Lb. plantarum* je pokazano prisustvo katalitičkog dela *pvtP* gena (Strahinic et al. 2010).

S obzirom da ne postoje literaturni podaci o proteinaznim genima kod *Lb. plantarum* i *Lb. zae*, analizirana je njihova proteolitička aktivnost kao i prisustvo različitih *pvt* gena.

### **1.5.3. *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501**

*L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5 je prirodni izolat iz domaćeg polutvrdog sira za koji je pokazano da proizvodi dva bakteriocina i ekstraćelijsku proteinazu. Čišćenjem plazmida dobijen je niz derivata sa različitim osobinama. BGMN1-501 je derivat koji je zadržao sposobnost proizvodnje jednog od dva originalna bakteriocina (laktokokcin B ili *LcnB*), kao i proteinaze (*PvtP*). BGMN1-596 je derivat bez plazmida koji je senzitivan na delovanje oba bakteriocina, i nema proteinazu (Gajic et al. 1999). Lokalizacijom genetičkih determinanti definisano je da se *lcnB* i *pvtP* geni nalaze na istom plazmidu pMN80, veličine oko 80 kb (Kojic et al. 2006).

Laktokokcin B spada u IIId grupu bakteriocina, u koju je svrstan zato što se radi o malom (~ 5 kDa) katjonskom hidrofobnom peptidu koji nije sličan pediocinu, ne trpi posttranslacione modifikacije i koji ima uzak spektar delovanja – svoj efekat ispoljava samo na laktokoke. Ovakvi bakteriocini imaju mehanizam sekrecije i regulacije ekspresije baziran na "quorum sensing"-u, procesu na kom se zasniva komunikacija i koordinacija između bakterijskih ćelija. Sintetiše se u obliku prekursora sa karakterističnom signalnom sekvencom dvoglicinskog tipa, koja usmerava protein ka odgovarajućem transporteru u membrani gde dolazi i do njenog isecanja. Mehanizam delovanja LcnB je dobro opisan i zasniva se na interakciji sa proteinima manozno fosfotransferaznog (man-PTS) sistema koji služi za unos šećera. Nakon vezivanja za membranske delove ovog sistema dolazi do permeabilizacije ćelijske membrane što potom uzrokuje rasipanje protona, curenje ćelijskih komponenti i konačno lizu ćelija (Venema et al. 1993; Diep et al. 2007).

Sastav medijuma značajno utiče na ekspresiju PrtP i LcnB. Prethodno je navedeno da se osnovnom fiziološkom ulogom proteinaza smatra obezbeđivanje peptida neophodnih za rast bakterija putem hidrolize velikih proteina iz spoljašnje sredine. U eksperimentima u kojima je varirana koncentracija peptida u medijumu, pokazano je da se ekspresija PrtP proteinaze snižava u uslovima kada je koncentracija peptida u medijumu za rast visoka, i obrnuto. Veći broj istraživanja je objasnio da je u osnovi ovog fenomena regulacija na nivou transkripcije *prtP* gena, čiji je mehanizam regulacije detaljno opisan (Guédon et al. 2001).

U sličnim eksperimentima, pokazano je da aktivnost LcnB bakteriocina takođe zavisi od koncentracije peptida u medijumu, ali na suprotan način; naime, aktivnost LcnB bakteriocina se povećava sa porastom koncentracije peptida u medijumu (Gajic et al. 1999; Venema et al. 1997). Ovo povećanje u aktivnosti tumačilo se uglavnom na sličan način – povećanjem ekspresije *lcnB* gena, iako za to nije bilo konkretnih dokaza. Dosadašnja istraživanja nisu dovodila ova dva fenomena u vezu.



## 2. CILJEVI RADA

S obzirom na temu ove disertacije, glavni ciljevi i podciljevi su bili sledeći:

### I. Analiza diverziteta proteinaza u mezofilnim vrstama laktobacila:

- 1) Karakterizacija proteolitičke aktivnosti odabranih sojeva mezofilnih laktobacila *L. casei*, *Lb. plantarum* i *Lb. zaeae*;
- 2) Analiza prisustva i distribucije tri različita *prt* gena u proteolitički aktivnim sojevima;
- 3) Molekularna karakterizacija sojeva u cilju boljeg uvida u sličnosti i razlike među analiziranim sojevima;

### II. Ispitivanje uticaja proteinaze PrtP na aktivnost bakteriocina LcnB:

- 1) Analiza regulacije ekspresije bakteriocina LcnB zavisne od medijuma; Ispitivanje uticaja sastava medijuma na transkripciju *lcnB* gena;
- 2) Analiza posttranslacione regulacije ekspresije LcnB bakteriocina. Ispitivanje interakcija između proteina PrtP i LcnB, odnosno da li LcnB bakteriocin može biti supstrat za delovanje PrtP proteinaze.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. BAKTERIJSKI SOJEVI

Spisak bakterijskih sojeva, transformanata različitim konstruktima i mutanata korišćenih u ovom radu prikazan je u Tabeli 2.

**Tabela 2. Sojevi korišćeni u radu**

Bakterijski soj	Karakteristike sojeva	Izvor soja
<u><i>Lactobacillus zeae</i></u>		
LMG17315	Izolat iz kukuruznog sirupa	BCCM/LMG kolekcija
<u><i>Lactobacillus casei</i></u>		
ATCC393 <sup>T</sup>	Izolat iz sira	ATCC kolekcija
<u><i>Lactobacillus paracasei</i></u>		
BGHN14	Prirodni izolat iz domaćeg sira, PrtP <sup>+</sup>	Laboratorijska kolekcija
<u><i>Lactobacillus rhamnosus</i></u>		
BGT10	Humani vaginalni izolat, PrtR <sup>+</sup>	Laboratorijska kolekcija
<u><i>Lactobacillus plantarum</i></u>		
LMG9208	Izolat iz kiselog kupusa Prt <sup>+</sup>	BCCM/LMG kolekcija
LMG18024	Izolat iz bivoljeg mleka Prt <sup>+</sup>	BCCM/LMG kolekcija
BGPV2-45a	Prirodni izolat iz sira, Prt <sup>+</sup>	Laboratorijska kolekcija
BGBUK 2-5	Prirodni izolat iz domaćeg sira, Prt <sup>+</sup>	Laboratorijska kolekcija
BGGA-8	Prirodni izolat iz domaćeg sira, Prt <sup>+</sup>	Laboratorijska kolekcija
BGHO10	Humani oralni izolat, Prt <sup>+</sup>	Laboratorijska kolekcija
<u><i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i></u>		
BGMN1-501	Derivat soja BGMN1-5 sa pMN80 plazmidom, Prt <sup>+</sup> , LcnB <sup>+</sup>	(Gajic et al. 1999)
BGMN1-596	Derivat soja BGMN1-5, očišćen od svih plazmida, Prt <sup>-</sup> , LcnB <sup>s</sup> , LcnB <sup>-</sup>	(Gajic et al. 1999)
BGMN1-501/pG <sup>+</sup> host9prtP	PrtP <sup>-</sup> , LcnB <sup>+</sup> , LcnB <sup>f</sup>	Ovaj rad
BGMN1-501/pG <sup>+</sup> host9lcnB	PrtP <sup>+</sup> , LcnB <sup>-</sup> , LcnB <sup>f</sup>	Ovaj rad
<u><i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i></u>		
NCDO712	PrtP <sup>+</sup> , Lac <sup>+</sup>	(Gasson 1983)

MG7284	Derivat soja NCDO712, očišćen od plazmida, PrtP <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup>	(Gasson 1983)
MG7284/pNZ8150lacZ1P <sub>lcnB</sub>		Ovaj rad
MG7284/pNZ8150lacZ1		Ovaj rad
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Δ80dlacZ_M15_(lacZYA-argF)U169recA1endA1hsdR17(rk-mk-)supE44thi-IgyrArelA1	(Hanahan 1983)
EC101	JM101 koje nose repA gen pWV01 na hromozomu	(Law et al. 1995)

Prt<sup>+</sup>/Prt<sup>-</sup>, proteolitički aktivan/neaktivan; Lac<sup>-</sup>, nema sposobnost fermentacije laktoze, LcnB<sup>S</sup> i LcnB<sup>F</sup> – Senzitivnan/rezistentan na LcnB

### 3.2. KORIŠĆENI PLAZMIDI

Plazmidi korišćeni u radu prikazani su u Tabeli 3.

**Tabela 3. Korišćeni plazmidi**

Plazmid	Karakteristike plazmida	Izvor ili referenca
<b>pG<sup>+</sup>host9</b>	Em <sup>r</sup> , termosenzitivan vektor	(Maguin et al. 1992)
<b>pG<sup>+</sup>host9prtP</b>	pG <sup>+</sup> host9 koji nosi deo <i>prtP</i> gena	Ovaj rad
<b>pG<sup>+</sup>host9lcnB</b>	pG <sup>+</sup> host9 koji nosi deo <i>prtP</i> gena	Ovaj rad
<b>Q6</b>	M13mp10 sa 1.1 kbp koji nosi fragment <i>prtP</i> gena	(Kojic et al. 1991)
<b>pUT/Km</b>	Mini-Tn5 <i>lacZ1</i>	(de Lorenzo et al. 1990)
<b>pBSlacZ1</b>		Ovaj rad
<b>pNZ8150</b>	standardni ekspresioni vektor; Cm <sup>r</sup>	(Mierau & Kleerebezem 2005)
<b>pNZ8150lacZ1</b>		Ovaj rad

<b>pNZ1850lacZ1P<sub>lcnB</sub></b>		Ovaj rad
<b>pGem-T Easy</b>	3015bp, Amp <sup>r</sup> , vektor za kloniranje PCR produkata	Promega
<b>pGem-T-easy<sub>lcnB</sub></b>	pGEM-T-easy koji nosi <i>lcnB</i> gen	Ovaj rad
<b>pGEM-T-easyP<sub>lcnB</sub></b>	pGEM-T-easy koji nosi <i>lcnB</i> promotor	Ovaj rad
<b>pBlueScript</b>	2961 bp; Amp <sup>r</sup> ; vektor za kloniranje PCR produkata	Stratagene

\*Amp<sup>r</sup>, rezistencija na ampicilin; Em<sup>r</sup>, rezistencija na eritromicin; Cm<sup>r</sup>, rezistencija na hloramfenikol;

### 3.3. MEDIJUMI ZA KULTIVISANJE BAKTERIJA

Za gajenje laktobacila korišćen je MRS medijum (Merck, GmbH Dermšlad, Nemačka), dok je za laktokoke korišćen M17 medijum (Merck), obogaćen sa 0,5% glukozom. Bakterije su gajene na 30°C, u mikroaerofilnim uslovima. Za rast sojeva *E. coli* korišćen je LB (Luria-Bertani broth) medijum koji sadrži: tripton (10 g/l), ekstrakt kvasca (5 g/l) i NaCl (5 g/l). *E. coli* sojevi i transformanti su inkubirani na 37°C, u aerobnim uslovima. Čvrste podloge za rast bakterija dobijane su dodavanjem agara (Torlak, Beograd, Srbija) (15 g/l). Za dobijanje mekog agara dodavano je 7 g/l agara u medijum. Medijumi su sterilisani 15 min na 121°C.

Za rast derivata laktokoka koji su nosili plazmide, odgovarajući antibiotici su dodavani u podloge (eritromicin ili hloramfenikol, 10 µg/ml). Sojevi *E. coli* transformisani različitim vektorima gajeni su u LB medijumu sa odgovarajućim antibiotikom (eritromicin, ampicilin i hloramfenikol, 300 µg/ml, 100 µg/ml i 30 µg/ml, redom). Za selekciju kloniranih fragmenata (plavo-bela selekcija) u *E. coli* DH5α i EC101 korišćen je X-Gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil-b-d-galaktopiranozid) u koncentraciji od 20 µg/ml.

Za ispitivanje proteolitičke aktivnosti bakterije su gajene na MCA (mlečno-citratni agar) podlozi koja sadrži: obrano mleko u prahu (44 g/l), Na-citrat x 2H<sub>2</sub>O (8 g/l), ekstrakt kvasca (1 g/l), glukoza (5 g/l) i agar (17 g/l). Medijum je sterilisan 20 min na 117°C.

Za ispitivanje uticaja koncentracije peptida u medijumu na bakteriocinsku aktivnost odgovarajućih sojeva laktokoka, kao i na transkripciju bakteriocinskog promotora, različite

koncentracije kazitona su dodavane u GM17 medijum. Kaziton (Difco, Becton Dickinson and Company, NJ, SAD) je hidrolizat kazeina, dobijen digestijom od strane pankreatičnih enzima i dodavan je u medijum u različitim koncentracijama.

Hemijski definisan medijum (CDM) je korišćen za gajenje BGMN1-501 u cilju izolacije bakteriocina LcnB iz što čistije smeše. CDM se sastojao od: glukoze (10 g/l), Na-acetata (6 g/l), NH<sub>4</sub>-citrata (1 g/l), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3 g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3 g/l), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5 g/l), MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,032 g/l), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,02 g/l), paraaminobenzojeve kiseline (0,2 mg/l), folne kiseline (0,1 mg/l), nikotinske kiseline (1 mg/l), pantoteinske kiseline (1 mg/l), piridoksina (2 mg/l), riboflavina (1 mg/l), biotina (1 mg/l), tvina 80 (1 mg/l) i kazitona (5 g/l).

Stokovi svih sojeva su čuvani u odgovarajućim medijumima za rast sa 15% glicerola na – 80°C.

### **3.4. ISPITIVANJE PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI**

#### **3.4.1. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti celih ćelija**

Proteolitička aktivnost odabranih sojeva i konstrukata je ispitivana prema (Kojic et al. 1991). Nakon rasta od 48h na MCA podlogama, ćelije su skupljane i resuspendovane u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 7 (30 mg vlažne mase ćelija u 200 ~~0l~~ pufera). Za analizu aktivnosti i "celih ćelija" suspenzija je mešana sa različitim supstratima, rastvorenim u istom puferu. Kao supstrati u reakcijama korišćeni su  $\alpha$ -<sub>s</sub>1-,  $\beta$ - ili  $\kappa$ - kazein (Sigma, Deizenhofen, Nemačka)  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin (Lactalis, Retiers, Francuska) kao i smeša proteina surutke (laboratorijski napravljena). Koncentracije supstrata su bile 5 mg/ml za kazeine i 3 mg/ml za  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin i smešu proteina surutke. Nakon inkubacije od 3 ili 4 sata na 30°C, ćelije su oborene centrifugiranjem (13000 rpm, 10 min), supernatant je uziman i pripreman za nanošenjena SDS-PAGE. Priprema za nanošenjena gel je obuhvatala temperaturnu denaturaciju svih proteina zagrevanjem 10 min na 100°C, i mešanje sa istom zapreminom pufera za nanošenje na SDS-PAGE. Pufer se sastojao iz 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) sa (u %): SDS 4 (w/v), glicerol 20 (w/v), 2-merkaptioetanol 10 (v/v), i bromofenol plavo 0,07 (w/v).

Smeša proteina surutke je napravljena prema sledećoj proceduri: sveže mleko je centrifugirano 10 min na 4000 g. Zatim je pH obranog mleka podešen na 4,6 pomoću 1 N HCl da bi se isprecipitali kazeini. Nakon jednog sata inkubacije na 30°C i centrifugiranja na 10000 rpm, dobijeni supernatant je dijaliziran 48 h prema destilovanoj vodi da bi se odstranila laktoza, a nakon toga zamrznut i liofilizovan.

### **3.4.2. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti proteinaznog ekstrakta**

Da bi se analiziralo da li se aktivne proteinaze odvajaju sa ćelijskog zida primenjen je postupak dobijanja proteinaznog ekstrakta: ćelije su gajene na MCA podlogama, sakupljane i resuspendovane u 0,1 M Na-fosfatnom (NaPi) puferu pH 7 i ostavljane 30 min na sobnoj temperaturi, da se omogući odvajanje enzima sa ćelijskog zida. Nakon toga, ćelije su obarane centrifugiranjem, a supernatanti su sakupljeni. Ovako dobijen proteinazni ekstrakti su mešani sa supstratima u odnosu 1:1 (v/v) i inkubirani na 30°C. Iz reakcione smeše su uzimani uzorci posle 15, 30, 60, 120, 180 i 240 min od početka reakcije i pripremani za SDS-PAGE.

Za proveru o kojem tipu proteinaze se radi, u kontrolne reakcije je dodavan PMSF (fenilmetilsufonil fluorid, 1 mM finalno), specifični inhibitor serinskih proteinaza.

### **3.4.3. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu**

Hidroliza mlečnih proteina praćena je njihovim kretanjem kroz SDS-poliakrilamidne gelove pre i posle reakcije sa bakterijskim proteinazama. Pravljen je diskontinuiran sistem gelova, koji se sastojao iz gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje. Debljina gelova je bila 1,5 mm. Gel za koncentrovanje je sadržao sledeće komponente: 5% akrilamid/bisakrilamid, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,005% TEMED, 0,07% NH<sub>4</sub>-persulfat. U gelu za razdvajanje koncentracija akrilamida je bila finalno 15%, a pufer je bio 0,38 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% NH<sub>4</sub>-persulfat. Gel za razdvajanje je nalivan do 4/5 zapremine ploča, ostavljan 30 min na sobnoj temperaturi da polimeriše, a zatim je u ostatak prostora nalivan gel za koncentrovanje koji je takođe ostavljan da polimeriše. Korišćena je aparatura za vertikalnu elektroforezu firme Hoeffer (Hoeffer SE 600, Amersham Biosciences, CA, SAD). Pufer za

elektroforezu se sastojao iz 25 mM Trisa pH 8,3, 186 mM glicina i 0,1% SDS-a. Elektroforeza je tekla pri konstantnoj struji od 10 mA preko noći. Gelovi su bojeni komazi-plavim (Comassie brilliant blue R250) u rastvoru sastava: 45% metanol, 45% voda, 10% sirćetna kiselina i 0,25% komasi plavo, 3-4 h uz mešanje. Odbojavanje gelova je vršeno u rastvoru sastava: 70% voda, 20% metanol, i 10% sirćetna kiselina, uz mešanje. Reciklaža odbojivača je vršena filtriranjem kroz aktivni uglj, koji za sebe vezuje komazi plavo.

### **3.5. IZOLOVANJE DNK**

#### **3.5.1. Izolacija totalne DNK iz laktobacila i laktokoka**

Ukupna DNK iz laktobacila i laktokoka je izolovana po modifikovanoj mini metodi (Hopwood 1985) i rađena je na sledeći način: Talog dobijen centrifugiranjem bakterija iz 3 ml logaritamske faze kulture ( $OD_{600nm} = 0,6-0,8$ ) je opran u 500  $\mu$ l TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM NaCl) i resuspendovan u 500  $\mu$ l PP pufera (0,5 M saharoza, 40 mM  $NH_4$ -acetat, 10 mM Mg-acetat, pH 7). Dodat je lizozim u koncentraciji 8 mg/ml (za laktobacile) ili 4 mg/ml (za laktokoke). Liza je vršena inkubiranjem 30 min na 37°C, nakon čega je dodavano 250  $\mu$ l 2% SDS-a i suspenzija intenzivno vorteksovana u trajanju od jednog minuta. Nakon ovog koraka vršeno je odstranjivanje proteina višestrukom (do potpunog gubitka međufaze) fenolnom ekstrakcijom, pri čemu je svaki put dodavano 250  $\mu$ l nestrano fenol - hloroforma, rastvor intenzivno mešan u trajanju od 30 sec i centrifugiran 5 min na 13000 rpm. Supernatant je odvajan u nove mikrotube u koje je dodavana 1/10 volumena 3M Na-acetata (pH 4,8) i 1 volumen 2-propanola, a zatim je smeša lagano mešana i inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Ukupna DNK je taložena centrifugiranjem, a zatim je talog totalne DNK ispran hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiran 2 min na 13000 rpm, sušen i resuspendovan u 50  $\mu$ l bidestilovane vode. RNK je uklanjana dodavanjem 1  $\mu$ l RNK-aze (10 mg/ml) i inkubiranjem 30 min na 37°C. Izolovana DNK je stabilna i pogodna za umnožavanje lančanom reakcijom polimeraze (PCR) ili za digestiju restrikcionim enzimima. Sva centrifugiranja su rađena pomoću stonih centrifuga 5415D (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), osim ako drugačije nije naznačeno.

### 3.5.2. Mini metoda za izolovanje plazmida iz laktokoka

Plazmidi iz laktokoka su izolovani prema proceduri O' Salivana i Klaenhamera (O'Sullivan & Klaenhammer 1993). Talog dobijen centrifugiranjem bakterija iz 10 ml logaritamske kulture ( $OD_{600nm} = 0,6-0,8$ ) je opran u 500  $\mu$ l TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM NaCl) i resuspendovan u 200  $\mu$ l pufera koji sadrži (25% saharozu sa lizozimom (30 mg/ml). Smeša je inkubirana 1 h na 37°C, a zatim je dodavano 400  $\mu$ l alkalnog rastvora SDS-a (3% SDS, 0,2 M NaOH), nakon čega je smeša inkubirana 7 min na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja 300  $\mu$ l 3 M Na-acetata, pH 4,8, ohlađenog na ledu, uzorci su ostavljeni 10 min na -20°C, a zatim centrifugirani 20 min, 13000 rpm. Supernatant je prebacivan u nove mikrotube uz dodavanje 650  $\mu$ l 2-propanola i centrifugiran 15 min na 13000 rpm. Dobijeni talog je resuspendovan u 320  $\mu$ l vode i dodavano je 200  $\mu$ l 7,5 M NH<sub>4</sub>-acetata sa 0,5 mg/ml etidijum-bromida, a zatim i 350  $\mu$ l smeše fenol-hloroforma. Dobijena smeša je intenzivno vorteksovana, a zatim centrifugirana 10 min na 13000 rpm. Gornja (vodena) faza je prebacivana u nove mikrotube, a DNK iz rastvora je precipitirana dodavanjem hladnog etanola (96%, -20°C) i centrifugiranjem 20 min, 13000 rpm. Uzorak je zatim ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiran 5 min na sobnoj temperaturi, a talog je nakon odstranjivanja etanola sušen 15 min na 42°C i resuspendovan u 20  $\mu$ l dd H<sub>2</sub>O. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1  $\mu$ l RNK-aze (10 mg/ml) 30 min na 37°C.

### 3.5.3. Mini metoda za izolovanje plazmida iz *E. coli*

Za izolaciju plazmida iz *E. coli* korišćena je metoda koju je opisao Braun (Brown 1997) uz modifikacije. Talog iz 3 ml prekonocne kulture je resuspendovan u 200  $\mu$ l E1 rastvora (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, finalno pH 8,0), a zatim liziran dodavanjem rastvora E2 (200 mM NaOH, 1% SDS), i laganim mešanjem. Neutralizacija liziranih ćelija je vršena dodavanjem 200  $\mu$ l E3 rastvora (3,1 M K-acetat, pH 5,5) i snažnim mešanjem. Zatim je smeša centrifugirana 10 min na 13000 rpm, supernatant je prebačen u nove mikrotube, u koje je potom dodato 200  $\mu$ l smeše fenol-hloroforma uz intenzivno mešanje u trajanju od 1 min. Nakon novog centrifugiranja gornja (vodena) faza je prebacivana u nove mikrotube, a DNK iz rastvora je precipitirana



dodavanjem 2-propanola i centrifugiranjem 20 min, 13000 rpm. DNK je zatim prana hladnim etanolom (75%, -20°C) i centrifugirana, a nakon toga sušena na 42°C u trajanju od 15 min ili do gubitka mirisa etanola. Nakon toga, talog je resuspendovan u 50 µl rastvora RNK-aze (0,1 mg/ml), a smeša je potom inkubirana na 37°C u trajanju od 30 min. Nakon toga plazmidna DNK je spremna za enzimske reakcije.

Izolacija plazmida iz *E. coli* koji su korišćeni za sekvenciranje rađena je pomoću kita "QIAprep Spin Miniprep" (Qiagen GmbH, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača.

### **3.6. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK**

#### **3.6.1. Digestija DNK restrikcionim enzimima**

Uslovi za sečenje DNK restrikcionim enzimima, količina enzima, pufer i temperatura inkubacije, određivani su prema uputstvu proizvođača (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija).

#### **3.6.2. Lančana reakcija polimeraze ("PCR")**

Umnožavanje željenih fragmenata različitih DNK je vršeno PCR (Polymerase chain reaction) metodom. Sva umnožavanja su vršena u smešama od 30 ili 50 µl koristeći GeneAmp PCR System 2700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States). Smeše su sadržale: 1X KAPA *Taq* pufer, 1 U *Taq* polimeraze (Kapa Biosystems, Voburn, SAD), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM svakog nukleotida i 1,5 µM svakog prajmera. Količina DNK uzorka u reakcijama bila je oko 1 ng. Uslovi PCR amplifikacije u bili: inicijalna denaturacija na 94°C 5 min; zatim 30 ciklusa denaturacije na 94°C 30 sec praćene hibridizacijom prajmera na 55°C 30 sec i elongacijom na 72°C u trajanju 60 sec po kilobazi umnožene DNK.

Umnoženi PCR produkti su nakon prečišćavanja propuštanjem kroz kolonice QIAquick PCR Purification KIT (Qiagen) sekvencirani u centru za sekvenciranje Macrogen, Amsterdam,

Holandija. Sekvence su upoređivane i deponovane uz pomoć podataka, "BLAST" programa u okviru NCBI baze podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

PCR reakcija u kojoj je korišćen BOX prajmer rađena je po sledećem programu: početna denaturacija 7 min na 95°C, umnožavanje DNK fragmenata u 33 ciklusa: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 53°C, polimerizacija 8 min na 65°C; poslednji ciklus polimerizacija 16 min na 65°C (Lozo 2008).

PCR reakcija u kojoj je korišćen (GTG)<sub>5</sub> prajmer rađena je po sledećem programu: početna denaturacija 7 min na 94°C, umnožavanje DNK fragmenata u 33 ciklusa: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 40°C, polimerizacija 8 min na 65°C; poslednji ciklus polimerizacija 16 min na 65°C (Lozo 2008).

Spisak prajmera i njihovih sekvenci nalazi se u tabeli 4. Prajmerski parovi P15C i P06C, PR1 i PR2, i Prti i IP6RXba, korišćeni su radi umnožavanja katalitičkih domena proteinaza *prtP*, *prtP*-like i *prtR* gena. Prajmerski par LactABM-F i LactB-R je služio za umnožavanje celog *lcnB* gena, a par PlcnB-FW i PlcnB-REV, za umnožavanje njegovog promotora.

**Tabela 4. Prajmeri korišćeni u radu**

Naziv prajmera	Matrica	Sekvenca prajmera (5' - 3')	Izvor ili referenca
P15C	<i>Lb. paracasei</i>	AACCAAATCTGATGTTG	(Strahinic et al. 2010)
P06C	BHGN14	AGTTGCTTCCGCTGAAA	(Strahinic et al. 2010)
PR1	<i>Lb. rhamnosus</i> BGT10	GCCAGCACAGTTGCTTTAGG	Ovaj rad
PR2		GAAGATTCAGCCAAACTG	Ovaj rad
Prti	<i>Lb. rhamnosus</i> BGT10	CAACACCGGGACCACGGTG	(Pastar et al. 2003)
IP6RXba		CTGATCGTGGACGGTGTTC	(Pastar et al. 2003)
GTG <sub>5</sub>	<i>Lb. zeae</i> LMG17315 i	GTGGTGGTGGTGGTG	(Versalovic et al. 1994)
BoxA1R	<i>Lb. casei</i> ATCC393	CTACGGCAAGGCGACGCTGAG	(Versalovic et al. 1994)
LactABM-F	pMN80 plazmid	GAAGAGGCAATCAGTAGAG	(Alegría et al. 2010)
LactB-R	pMN80 plazmid	CCAGGATTTTCTTTGATTTACT TC	(Alegría et al. 2010)
PlcnB-FW	pMN80 plazmid	CTGCAGAGTTATTAACATTTGT TAACG	Ovaj rad
PlcnB-REV	pMN80 plazmid	GAGCTCGATTTTTCATAATAAT CTCC	Ovaj rad

\*Podvučenu sekvencu prepoznaje restrikcioni enzim *Pst*I

### **3.7. HORIZONTALNA GEL ELEKTROFOREZA DNK**

Elektroforetsko razdvajanje molekula DNK rađeno je na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su napravljeni otapanjem 1% agaroze (Sigma) u 1X TAE puferu (40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA) uz dodavanje etidijum bromida (0,5 µg/ml). Elektroforeza je vršena pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. Veličine DNK fragmenata određivana je na osnovu poređenja u pokretljivosti fragmenata poznatih veličina (standardi) na istom agaroznom gelu.

Razdvajanje umnoženih DNK fragmenta pomoću (GTG)<sub>5</sub> ili BOX prajmera je rađena na horizontalnim 1,5% agaroznim gelovima. Elektroforeza je tekla 20 h na +4°C, pri konstantnom naponu od 60 V.

Prečišćavanje, tj. elucija željenih fragmenata DNK iz agaroznih gelova vršena je pomoću QIAquick Gel extraction kita prema uputstvu proizvođača (Qiagen).

### **3.8. DNK/DNK HIBRIDIZACIJA ("SOUTHERN BLOT")**

Ispitivanje prisustva katalitičkih domena različitih proteinaza u ispitivanim sojevima rađeno je metodom DNK/DNK hibridizacija koju je opisao Sadern (Southern 1975).

#### **3.8.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane**

Nakon elektroforeze DNK, agarozni gel je tretiran 0,25 M HCl 15 min, da bi došlo do depurinacija molekula DNK. Gel je zatim ispiran u destilovanoj vodi, a potom potopljen 20 min u denaturacioni (0,5 M NaOH i 1,5 M NaCl), a zatim 2 puta po 20 min u neutralizacioni pufer (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, finalno pH 7,5). Tretirani gel je postavljen na 3MM papire, koji čini most između pufera u rezervoaru i gela, a koji su prethodno potopljene u rastvor 20 x SSC pufera (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat, finalno pH 7) tako da je gel bio okrenut licem nadole, a oko gela su postavljeni graničnici. Preko zadnje strane gela je postavljena najlonska membrana dužine i širine kao i sam gel, a preko nje dva 3MM papira navlažena u 20 x SSC puferu, pri čijem postavljanu su uklonjeni mehurići vazduha. Preko svega toga je postavljen sloj upijajućeg papira debljine desetak centimetara i sve je ravnomerno opterećeno tegom od 1 kg i uravnoteženo

pomoću libele. Transfer DNK je vršen preko noći u 20 x SSC puferu. Nakon toga najlonska membrana je dva puta potopljena u 5 x SSC pufer u trajanju od 2 min. Membrana je sušena na sobnoj temperaturi, zatim stavljena između dva 3MM papira i pečen 2 sata na 80°C u pećnici, radi fiksiranja DNK za membranu.

### **3.8.2. Obeležavanje probe sa digoksinin-dUTP-om**

Kao probe korišćeni su DNK fragmenti koji kodiraju za katalitičke domene iz tri različita *prt* gena – *prtP*, *prtR* i *prtP*-like. Oni su isečeni iz pGEM-T Easy vektora, razdvojeni agaroznom gel elektroforezom i eluirani iz agaroznih gelova pomoću QIAquick Gel Extraction Kit-a (Qiagen).

Za obeležavanje probe korišćen je "DIG DNA Labeling and Detection Kit" (Roche Diagnostics GmbH, Majnhajm, Nemačka). U 1 µg DNK probe dodavani su 2 µl dNTP smeše za obeležavanje (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP i 0,65 mM dTTP i 0,35 mM DIG-11-dUTP, pH 7,5), 2 µl mešavine heksanukleotida (10 puta koncentrovan) i Klenov enzim za obeležavanje (2 U/µl), a bidestilovana voda je dodata do finalne zapremine od 15 µl. Ova smeša je inkubirana preko noći. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8, dok su neugrađeni nukleotidi odstranjeni tako što je proba precipitirana 96% etanolom. Zatim je proba denaturisana kuvanjem 10 min na 100°C, a potom prebačena na led do narednog koraka hibridizacije. Na ovaj način je dobijena neradioaktivno obeležena proba.

### **3.8.3. Hibridizacija sa digoksinin-dUTP-om obeleženom probom**

Hibridizacija DNK sa probom rađena je na sledeći način: nakon pečenja membrana je pakovana u kesicu sa 10 ml hibridizacionog pufera (5 x SSC koji sadrži 0,1% N-lauril sarkozil, 0,02% SDS, 1% kazein) i inkubirana 1 h na temperaturi od 65°C. Zatim je u kesicu dodato 1 ml svežeg hibridizacionog pufera na svakih 10 cm<sup>2</sup> površine membrane u koji je prethodno dodata neradioaktivno obeležena i denaturisana proba. Hibridizacija se odvijala preko noći na 65°C. Membrana je nakon hibridizacije oprana dva puta po 15 min: prvo u rastvoru I (2 x SSC, 0,1% SDS) na sobnoj temperaturi, a zatim u rastvoru II (0,5 x SSC, 0,1% SDS) na 65°C. "DIG DNA

Labeling and Detection Kit" (Roche Diagnostics) korišćen je za detekciju hibrida. Pranje membrane i detekcija hibrida su vršeni po uputstvu proizvođača.

### 3.9. GEL ELEKTROFOREZA U PULSIRAJUĆEM POLJU ("PFGE")

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) metoda je rađena u cilju sticanja detaljnijeg uvida u filogenetske odnosa između analiziranih sojeva laktobacila, sa posebnim naglaskom na ispitivanje sličnosti i razlika između *Lb. casei* ATCC393 i *Lb. zaeae* LMG17315, za koje je sistematika i dalje sporna. Takođe, ista metoda je korišćena za potrebe provere mutanata laktokoka dobijenih insercionom mutagenezom pomoću derivata pG<sup>+</sup>host9 plazmida.

PFGE je rađena po protokolu koju su opisali Kojić i saradnici (Kojic et al. 2006). Pojedinačne kolonije sa MRS ili GM17 podloge zasejane su u tečne medijume i inkubirane na 30°C preko noći. Prekonoćna kultura je potom razblažena 100 puta u adekvatnom medijumu i inkubirana na 30°C do postizanja log faze rasta ( $OD_{600} = 0,2-0,6$ ). Čelije dobijene obaranjem 1,5 ml logaritamske kulture oprane su u 1 ml EET pufera (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM TRIS, pH 7,5-8), a potom je dodato 50 µl fenola. Smeša je homogenizovana i ponovo centrifugirana. Nakon toga fenol je izvučen sa dna mikrotube, a ostatak je centrifugiran, nakon čega je "supernatant" odliven a ćelije resuspendovane u 50 µl EET pufera. Smeša je potom inkubirana 10 min na 42°C. Po isteku vremena, dodato je 50 µl 2% InCert agaroze (Lonza, Rockland, SAD) istopljene i ohlađene na 42°C u 50 µl inkubirane smeše, dobro promešano i izliveno u kalupe koji su ostavljeni na 4°C kako bi se stegli. Nakon 10 min blokčići su izvučeni iz kalupa i preneti u 500 µl rastvora sa lizozimom (EET pufer, 0,05% N-lauril sarkozin, lizozim 4 mg/ml) i inkubirani 24 h na 37°C.

Nakon 24 h, rastvor sa lizozimom je odliven, a blokčići su inkubirani 24 h na 50°C u 500 µl rastvora sa proteinazom K (EET pufer, 0,5% SDS, 0,5 µg/ml proteinaza K). Kada su blokčići postali prozirni (nakon 24 h), rastvor je odliven, a dodato je 10 ml rastvora PMSF-a u vodi (0,5 mM). Smeša je mešana na sobnoj temperaturi 30 min, a potom je postupak ponovljen, odliven je prethodni rastvor, a dodato novih 10 ml rastvora sa PMSF-om. Nakon ponovnog mešanja 30 min na sobnoj temperaturi, prethodni rastvor je odliven, a dodato je 5 ml sterilne bidestilovane vode, i ovaj postupak je takođe ponovljen dva puta. Nakon toga blokčići su podvrgnuti digestiji sa *NotI*

restrikcionim enzimom za laktobacile odnosno *Sma*I za laktokoke. Prvo su isečeni blokčići sa inkorporiranim totalnom DNK inkubirani 30 minuta u 1 x Tango puferu (300 µl) na sobnoj temperaturi, a potom 3 sata na 30°C u smeši (100 µl) kojoj je dodat enzim. Nakon 3 h inkubiranja, ceo rastvor je odliven a reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 µl STOP pufera (40% saharoza, 100 mM EDTA pH 8, brom fenol plavo). Za PFGE korišćen je 1,5% (laktobacili) odnosno 1,2% (laktokoke) agarozni gel rastvoren u 0,5 x TBE puferu. Uslovi pod kojima je tekla elektroforeza su konstantna voltaža, trajanje pulsa od 8 sek u trajanju od 8 h i 18 sek u trajanju od 10 h. Uzorci laktobacila su razdvajani 18 h pod naponom od 250 V, dok su uzorci laktokoka razdvajani 15 h pod naponom od 300 V.

### **3.10. LIGACIJA DNK FRAGMENTA**

U cilju kloniranja DNK fragmenata u vektore za kloniranje, rađena je ligacija (spajanje) eluiranih DNK fragmenta i vektora komplementarnim lepljivim krajevima u ligacionom puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ditioneitol, 1 mM ATP) sa 1U T4 DNK ligaze (Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD) u odgovarajućem odnosu u finalnoj zapremini od 20 µl i inkubiranjem 16 h na 16°C.

Ovako pripremljene ligacione smeše korišćene su za transformaciju *E. coli* i *L. lactis* koje su prethodno indukovane kompetentnim na način opisan u sledećem odeljku.

### **3.11. TRANSFORMACIJA ĆELIJA SA DNK**

#### **3.11.1. Priprema kompetentnih ćelija *E. coli***

Kompetentne *E. coli* ćelije pripremljene su po modifikovanoj proceduri sa rubidijum hloridom (Hanahan 1983). Nekoliko kolonija sveže izrasle kulture *E. coli* inokulisano je u LB medijumu (100 ml), koji je inkubiran na 37°C uz intenzivnu areaciju na 180 rpm, do optičke gustine kulture od OD<sub>600</sub> = 0,4. Rast bakterijske kulture je zaustavljen inkubiranjem kulture 15 min na ledu. Nakon hlađenja bakterije su obarane iz medijuma, centrifugiranjem 10 min na 3000 rpm u kliničkoj centrifugi (5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) na 4°C. Supernatant je

odlivan, a ćelije resuspendovane laganim mešanjem u istom volumenu prethodno ohlađenog 0,1 M CaCl<sub>2</sub> i inkubirane na ledu 15 min. Ćelije su zatim ponovo obarane centrifugiranjem na 3000 rpm, 10 min, a potom resuspendovane u 8 ml RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 15% glicerol, pH 6,8 finalno). Suspenzija ćelija je podeljena u alikvotne od po 200 µl, koji su naglo zamrzavani u tečnom azotu, a zatim čuvani na -80°C.

### **3.11.2. Transformacija kompetentnih *E. coli* ćelija temperaturnim šokom ("Heat shock")**

Transformacija kompetentnih *E. coli* ćelija vršena je izlaganjem ćelija temperaturnom šoku u prisustvu plazmidne DNK ili ligacione smeše. Pre dodavanja DNK zamrznute ćelije su otapane na ledu. Suspenziji otopljenih ćelija dodavano je oko 200 ng plazmidne DNK ili ligacione smeše (u zapremini do 20 µl), a zatim je sve inkubirano 1 h na ledu u z povremeno mešanje. Nakon inkubacije ćelije su izlagane temperaturnom stresu u trajanju od 90 sekundi na 42°C, a zatim su inkubirane 5 min na ledu. Ćelije su posle transformacije regenerisane dodavanjem 300 µl LB medijuma i inkubirane uz intenzivnu aeraciju 30 do 60 min zavisno od ekspresije antibiotske rezistencije na 37°C. Ćelije su zatim razmazivane na selektivne LB čvrste podloge i inkubirane na 37°C 16 h ili do pojave transformanata.

### **3.11.3. Transformacija laktokoka elektroporacijom**

Laktokoke su transformisane metodom elektroporacije prema metodi koju su opisali Holo i Nes (Holo & Nes 1989), uz modifikacije. Prekonoćna kultura laktokoka je razblažena 100 puta u GM17 medijumu sa 1% glicinom. Kultura je inkubirana na 30°C do dostizanja log faze rasta, OD<sub>600</sub> = 0,2-0,6. Nakon centrifugiranja 10 min na 3000 rpm u kliničkoj centrifugi (5804R), talog bakterija iz 10 ml kulture je opran dva puta u 20 ml sterilne bidestilovane vode uz nežno mešanje i finalno resuspendovan u 200 µl vode. Nakon dodavanja 1 µg plazmidne DNK, ~~smeša~~ je inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi, a zatim je promešana i prebačena u kivete za elektroporaciju (dijametra 0,2 cm). Elektropulsiranje bakterija je rađeno u Gene Pulser aparatu (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) pri otporu od 200Ω, gde su bakterije podvrgnute električnom pulsnu jačine 2,45 kV/cm. U kivetu je zatim odmah dodavan tečni GM17 medijum i smeša je

inkubirana 2 h na 30°C a zatim zasejavana selektivne GM17 čvrste podloge i inkubirana na 30°C 48 h ili do pojave transformanata.

### 3.12. KONSTRUKCIJA FUZIONOG VEKTORA I MERENJE AKTIVNOSTI PROMOTORA

Radi ispitivanja uticaja sastava medijuma na aktivnost promotora bakteriocinskog gena *lcnB*, konstruisan je transkripcioni fuzioni vektor za laktokoce nazvan pNZ8150lacZ1. *lacZ1* gen je prvo, bez promotora, isečen iz pUT/Km vektora pomoću *EcoRI* i *HindIII* restrikcionih enzima i kloniran u pBlueScript vektor, prethodno digeriran istim enzimima. Takav vektor, nazvan pBSlacZ1 je onda transformisan u *E. coli* DH5 $\alpha$ , odakle je prečišćen i izolovan u većoj količini. Odatle je *lacZ1* gen subkloniran u pNZ8150 vektor, koristeći *PstI* i *HindIII* restrikcione enzime što je rezultiralo pNZ8150lacZ1 konstruktom, kojim su transformisane ćelije *E. coli* EC101. Polilinker region se u ovom konstruktu nalazio tačno ispred *lacZ1* gena, i sadržao je sekvence koje prepoznaju *ScaI*, *PstI*, *EcoRI*, *SmaI* i *BamHI* enzimi, što je iskorišćeno za kloniranje promotora *lcnB* gena.  $P_{lcnB}$  promotor je prvo umnožen PCR-om pomoću odgovarajućih prajmera (LactABM-F i LactB-R) iz genoma BGMN1-501 i kloniran u pGEM-T Easy vektor, čime je dobijen pGEM-T-easy $P_{lcnB}$ . Odavde je promotor isečen sa *PstI* i *EcoRI*, i prebačen u pNZ8150lacZ1 čime je napravljen pNZ8150lacZ1 $P_{lcnB}$ , kojim je konačno transformisan *L. lactis* subsp. *cremoris* MG7284.

Aktivnost promotora *lcnB* gena je praćena  $\beta$ -galaktozidaznim esejom. Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze je merena kroz degradaciju orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozida (ONPG, Sigma), pomoću metode koju je opisao Miler (Miller 1972) uz određene modifikacije. Transformanti su su prvo striklovani na čvrste podloge GM17, koje su sadržale hloramfenikol (7,5  $\mu$ g/ml) i X-Gal u višku (50  $\mu$ g/ml), pri čemu se razvila karakteristična plava boja kod onih koji su nosili pNZ8150lacZ1 $P_{lcnB}$ .  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost je testirana nakon rasta transformanata u CDM medijumu sa različitom koncentracijom kazitona (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% i 7%). Nakon dostizanja logaritamske faze ( $OD_{600} = 1,5$ ), 1 ml bakterijske kulture je oboren centrifugiranjem i resuspendovan u 500  $\mu$ l PP pufera koji je sadržao lizozim (4 mg/ml). Degradacija ćelijskog zida je trajala 30 min na 37°C, nakon čega je suspenzija centrifugirana, (5 min na 5000 g), a talog



resuspendovan u Z puferu (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 50 mM β-merkaptotanol). Nakon homogenizovanja smeši je dodato 40 μl hloroforma i 20 μl 1% rastvora SDS kako bi se ćelije lizirale, odnosno došlo do permeabilizacije membrane. Potom je smeša homogenizovana vorteksovanjem oko 1 min. Nakon 5 min inkubacije na sobnoj temperaturi, smeši je dodato 200 μl rastvora ONPG (4 mg/ml). Kao posledica reakcije β-galaktozidaze i ONPG dolazi do razvijanja žute boje, čiji je intenzitet proporcionalan količini β-galaktozidaze. Nakon nastanka žute boje reakcija je zaustavljena dodavanjem 250 μl rastvora 1 M Na-karbonata. Nakon centrifugiranja smeše (13000 rpm, 1 min), gornji deo je prenet u kivete za spektrofotometar. Merena je apsorbancija na talasnoj dužini od 550 nm i 420 nm (A<sub>550</sub> i A<sub>420</sub>). β-galaktozidazna aktivnost se izražava u Miller-ovim jedinicama, a preračunava se kao  $(52A_{420}/(t \cdot v \cdot OD_{600}))$ , gde je t vreme potrebno za nastanak žute boje u minutima, v je početna zapremina kulture u ml, i OD<sub>600</sub> je optička gustina merena na talasnoj dužini od 600 nm.

Kao kontrola, korišćeni su transformanti *L. lactis* subsp. *cremoris* MG7284 koji su nosili pNZ8150lacZ1 (bez *lcnB* promotora).

### 3.13. KONSTRUKCIJE MUTANATA

U ovim eksperimentima korišćen je vektor pGhost9, čija je replikacija direktno zavisna od temperature na kojoj se odvija rast ćelija. Ovaj plazmid se normalno replikuje na permisivnoj temperaturi (28°C), dok se na temperaturama iznad 37°C integriše u hromozom domaćina putem homologe rekombinacije ukoliko za to postoji mogućnost, ili se gubi iz populacije (Maguin et al. 1992). Na ovaj način moguće je izvršiti disrupciju željenog gena i njegovu inaktivaciju, ukoliko se u vektor prethodno uklonira deo ciljanog gena preko koga će se odviti homologa rekombinacija.

### 3.13.1. Inaktivacija *prtP* gena i *lcnB* gena

Gen *prtP* je inaktiviran u genomu soja BGMN1-501 metodom integracije po prethodno opisanom protokolu (Maguin et al. 1996), uz minimalne modifikacije. Deo *prtP* gena, odgovoran za katalitički domen proteinaze veličine 1,1 kb je prvo iz M13-Q6 vektora isečen pomoću restrikcionih enzima *HindIII* i *EcoRI*, a zatim kloniran u pG<sup>+</sup>host9, prethodno otvoren istim enzimima, čime je dobijen pG<sup>+</sup>host9*prtP* konstrukt. Čelije soja BGMN1-501 su zatim transformisane ovim konstruktom, a dobijeni transformanti inicijalno inkubirani 48 h na 28°C. Selektovani transformanti su zatim zasejani na sveže GM17 podloge sa eritromicinom i inkubirani na 37°C kako bi se usled nemogućnosti vektora da se replicira, omogućili uslovi za njegovu inserciju u genom domaćina. Nakon toga, dobijeni transformanti su testirani na proteolitičku aktivnost dok su, kao kontrola u testovima, korišćeni transformanti inkubirani na 28°C.

Na sličan način je inaktiviran i *lcnB* gen. PCR fragment od 578 bp, koji je sadržao *lcnB* gen, je prvo kloniran u komercijalni pGem-T Easy (Promega) vektor, čime je napravljen pGem-T-easy*lcnB*. Iz konstrukta pGem-T-easy*lcnB*, *lcnB* fragment je isečen pomoću *EcoRI* enzima, i kloniran u pG<sup>+</sup>host9, prethodno otvoren istim enzimom, da bi se dobio pG<sup>+</sup>host9*lcnB*. Takav konstrukt je po istoj proceduri korišćen za transformaciju BGMN1-501, a dobijeni transformanti su testirani na bakteriocinsku aktivnost na način opisan u sledećem odeljku.

## 3.14. METODE RADA SA BAKTERIOCINIMA

### 3.14.1. Difuzioni metod u bunarićima

Difuzioni test u bunarićima rađen je tako što su Petrijeve šolje sa tankom čvrstom podlogom prvo prelivane sa 10 ml GM17 mekog agara koji je inokulisan sa 100 µl prekončne kulture ( $10^5$ - $10^6$  ćelija/ml finalno) indikatorskog soja. Zatim su u mekom agaru pravljene bunariće prečnika 5 mm u koje je dodavano po 60 µl "LcnB ekstrakata" testiranih sojeva. Testirani sojevi su gajeni u GM17 medijumu sa različitim koncentracijama kazitona (0,5%, 1%, 2%, 4%, 6%, i 8%). LcnB ekstrakti testiranih sojeva su dobijani centrifugiranjem prekončne

kulture soja 10 min na 13000 rpm i filtracijom dobijenih supernatanata kroz 0,45 µm filtere. Prisustvo i aktivnost bakteriocina su ispitivani na osnovu pojave prozračne zone odgovarajućeg prečnika oko ivice bunarića, kao posledice manje ili veće inhibicije rasta soja BGMN1-596 senzitivnog na LcnB bakteriocin (Lozo et al. 2004).

Alternativno, prilikom testiranja frakcija dobijenih reverzno-faznom hromatografijom uzorka bakteriocina, korišćen je metod iskapavanja. Sve frakcije su bile potpuno uparene, a zatim resuspendovane u 10 µl NaPi pufera. Tako rastvoreni uzorci su onda umesto u bunariće, iskapavani direktno na Petrijeve šolje sa soft agarom koji je inokulisan sa oko  $10^3$ - $10^4$  ćelija indikatorskog soja/ml medijuma. Zona inhibicije rasta usled aktivnosti bakteriocina na senzitivne ćelije se vidi kao prosvetljenje u soft agaru na mestu ukapavanja frakcije sa rastvorenim bakteriocinom.

### **3.14.2. Ispitivanje uticaja proteinaznog ekstrakta na aktivnost LcnB *in vitro***

U cilju ispitivanja uticaja proteinaze PrtP na aktivnost LcnB bakteriocina, upotrebljena je sledeća metoda: aktivni proteinazni ekstrakti su mešani sa LcnB ekstraktima u odnosu 1:1 i inkubirani 2 h na 30°C, nakon čega smeši testirana bakteriocinska aktivnost. Proteinazni ekstrakti su izolovani iz BGMN1-501 i radi kontrole iz BGMN1-501/pG<sup>+</sup>host9lcnB. LcnB ekstrakti su izolovani iz BGMN1-501 i BGMN1-501/pG<sup>+</sup>host9prtP. Paralelno sa svim eksperimentima, LcnB ekstrakti su mešani i sa NaPi puferom u istom odnosu i inkubirani pod istim uslovima radi adekvatnog poređenja veličine zona inhibicije rasta.

Kao dodatna kontrola, uticaj PrtP proteinaze na aktivnost LcnB bakteriocina je testiran na isti način korišćenjem aktivnog proteinaznog ekstrakta dobijenog iz *L. lactis* subsp. *cremoris* NCDO712.

### **3.15. MERENJE DIJAMETRA ZONA INHIBICIJE RASTA**

Dijametri zona inhibicije rasta nastalih u bakteriocinskim esejima su mereni pomoću AutoCad12 programa (Autodesk, San Rafael, CA,SAD).

### **3.16. IZOLACIJA I DETEKCIJA BAKTERIOCINA LcnB**

Da bi se potvrdilo da do digestije LcnB bakteriocina od strane PrtP proteinaze dolazi i *in vivo*, analizirana je masa bakteriocina dobijenog nakon gajenja bakterija u uslovima koji indukuju ekspresiju proteinaza.

#### **3.16.1. Taloženje LcnB bakteriocina amonijum sulfatom**

Nakon rasta BGMN1-501 16 h u 500 ml CDM medijuma sa 0,5% kazitona, bakterijske ćelije su oborene centrifugiranjem (5000 g, 30 min 4°C), a supernatant je skupljen. Proteini iz supernatanta su podvrgnut amonijum sulfatnoj precipitaciji, pri zasićenju amonijum sulfata od 40%, uz mešanje 2 h na 4°C. Precipitat je sakupljen centrifugiranjem (10000 g, 30 min 4°C), odbacivanjem supernatanta i resuspendovanjem taloga u 5 ml bidestilovane vode, koja je sadržala 0,1% TFA (trifluorsirćetne kiseline).

#### **3.16.2. Određivanje mase bakteriocina LcnB**

Nakon koncentrovanja amonijum sulfatnom precipitacijom, razdvajanje uzorka je vršeno na dve kolone. Prvo je korišćena Discovery Bio Wild Pore C5 10 cm x 4,6 mm, 5 µm kolona prilikom razdvajanja reverzno-faznom tečnom hromatografijom visokih performansi (RF HPLC). Elucija je vršena linearnim gradijentom acetonitrila koji sadrži 0,1% TFA (0-90% za 10 zapremina kolone). Nakon uparavanja, aktivna frakcija je momentalno ubrizgana na reverzno-faznu C18 kolonu (RRHT 1,8 µm 4,6 x 50 mm) spregnutu sa Zorbax Eclipse XDB-C18 instaliranom na HPLC sistem 1200 serije.

Uzorak je razdvojen korišćenjem diskontinualnog gradijenta acetonitrila koji sadrži 0,2% mravlju kiselinu (5-95% 10 minuta; 95% 5 minuta).

Maseni spektrometar (620 time of flight) LC/MS sistem (G1969 Agilent Technologies) je jonizovao uzorak u pozitivnom elektron sprej jonizacionom modu sa kapilarnom voltažom od 4000 V, voltažom fragmentoraod 200 V i opsegom snimanja 100-3200 m/z. U obradi podataka korišćeni su programski paketi Agilent MassHunter Workstation Software i Analyst QS.

## 4. REZULTATI

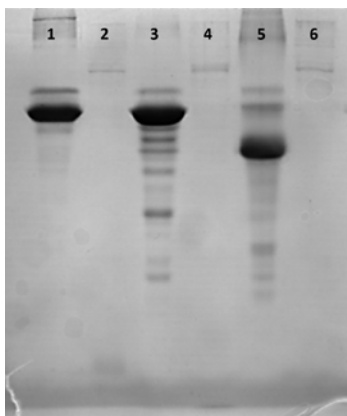
### DIVERZITET PROTEINAZA U MEZOFILNIM VRSTAMA LAKTOBACILA

#### 4.1. ANALIZA PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI

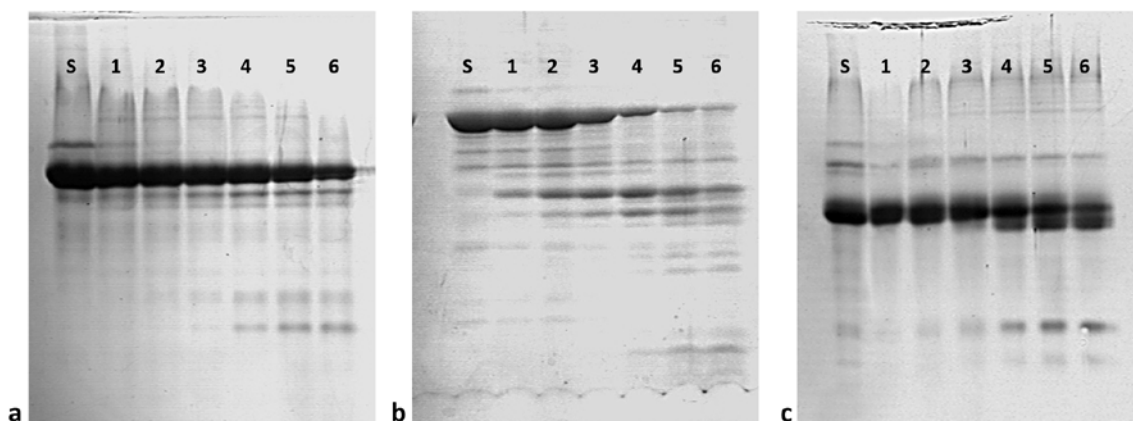
Proteolitički potencijal odabranih sojeva je testiran hidrolizom  $\alpha_s$ 1-,  $\beta$ - i  $\kappa$ - kazeinskih frakcija, kao i hidrolizom proteina surutke. Kao izvor enzima korišćene su i cele ćelije i proteinazni ekstrakti, čime je utvrđivano da li se katalitički aktivne proteinaze odvajaju sa bakterijskog zida u medijum. Svi analizirani sojevi produkuju serinske proteinaze, jer je njihova proteolitička aktivnost bila inhibirana dodavanjem PMSF-a u reakciju.

##### 4.1.1. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti *Lb. zae* LMG17315

Od svih analiziranih sojeva, *Lb. zae* LMG17315 je pokazao najefikasniju proteolitičku aktivnost, uzimajući u obzir da su i cele ćelije i besćelijski proteinazni ekstrakti ovog soja uspešno hidrolizovali sve tri kazeinske frakcije. Cele ćelije su potpuno hidrolizovale  $\alpha_s$ 1-,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazein nakon tri sata inkubacije (Slika 4), dok se hidroliza proteinaznim ekstraktima odvijala sporije, ali uz jasno vidljive produkte degradacije (Slika 5).



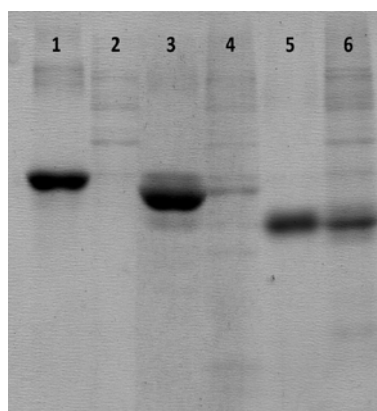
Slika 4. Hidroliza  $\alpha_s$ 1-,  $\beta$ - i  $\kappa$ - kazeina (1, 3 i 5) od strane celih ćelija *Lb. zae* LMG17315 (2, 4 i 6) nakon 3 h reakcije.



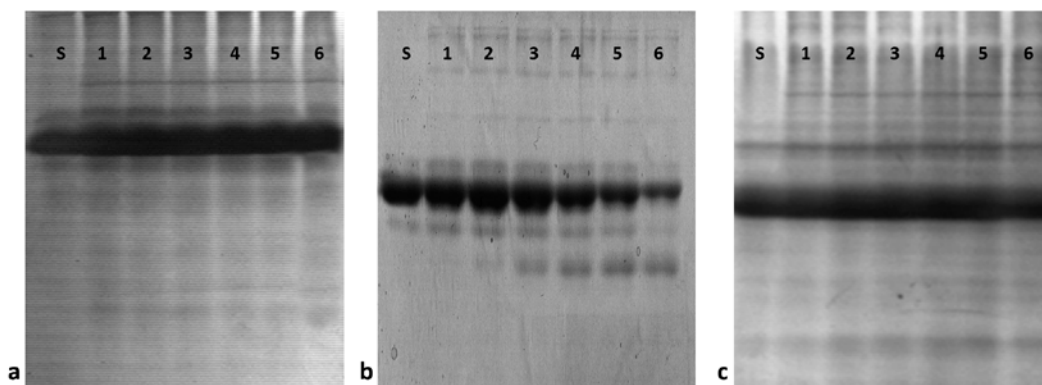
Slika 5. Kinetika hidrolize  $\alpha_1$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ - kazeina, besćelijskim proteinaznim ekstraktom iz *Lb. zeae* LMG17315. Uzorci su uzimani iz reakcionih smeša nakon (a-c): (1) – 15 min, (2) – 30 min, (3) – 1 h, (4) – 2 h, (5) – 3 h i (6) – 4 h. (S) – početni supstrat.

#### 4.1.2. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti *Lb. casei* ATCC393

*Lb. casei* ATCC393 je takođe pokazao proteolitičku aktivnost, s obzirom da su sve tri kazeinske frakcije hidrolizovane od strane celih ćelija ovog soja, mada  $\alpha$ -kazein ne potpuno (Slika 6), dok su proteinazni ekstrakti hidrolizovali samo  $\beta$ -kazein (Slika 7).



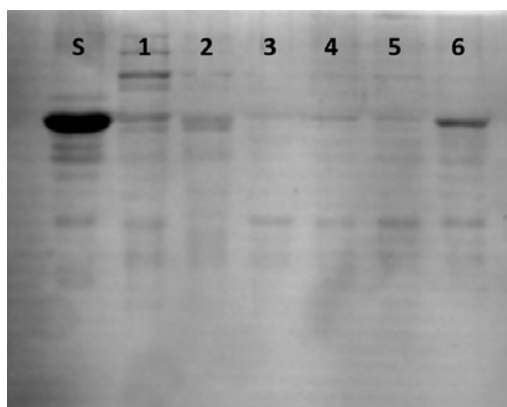
Slika 6. Hidroliza  $\alpha_1$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ - kazeina (1, 3 i 5) od strane celih ćelija *Lb. casei* ATCC393 (2, 4 i 6) nakon 3 h reakcije.



Slika 7. Kinetika hidrolize  $\alpha_1$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ - kazeina, besćelijskim proteinaznim ekstraktom iz *Lb. casei* ATCC393. Uzorci su uzimani iz reakcionih smeša nakon (a-c): (1) – 15 min, (2) – 30 min, (3) – 1 h, (4) – 2 h, (5) – 3 h i (6) – 4 h. (S) – početni supstrat.

#### 4.1.3. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti različitih sojeva *Lb. plantarum*

Na isti način je ispitan proteolitički potencijal odabranih sojeva iz vrste *Lb. plantarum*. Cele ćelije svih šest odabranih sojeva su gotovo u potpunosti hidrolizovale  $\beta$ - kazein (Slika 8), kao i ostale kazeinske frakcije (podaci nisu prikazani) dok njihovi besćelijski ekstrakti nisu ispoljili proteolitičku aktivnost (podaci nisu prikazani).

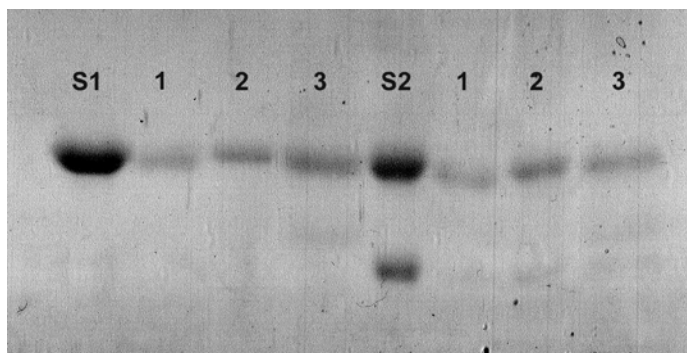


Slika 8. Hidroliza  $\beta$ - kazeina od strane celih ćelija različitih sojeva *Lb. plantarum* nakon 3 h reakcije. S – početni supstrat, (1) LMG18024, (2) LMG9208, (3) BGPV2-45a, (4) BGBUK 2-5, (5) BGGA-8, (6) BGHO10.



#### 4.1.4. Hidroliza ostalih proteina mleka

Nakon utvrđivanja prisustva proteolitičkih enzima u ispitivanim sojevima, analizirana je aktivnost *Lb. zeae* LMG17315, *Lb. casei* ATCC393 i jednog predstavnika grupe *Lb. plantarum* – soja LMG9208, prema proteinima surutke. Svi analizirani sojevi su značajno hidrolizovali smešu proteina surutke, kao i sam  $\beta$ -laktoglobulin (Slika 9). Zanimljivo, nijedan soj nije reagovao sa čistim rastvorom  $\alpha$ -laktalbumina (podaci nisu prikazani).



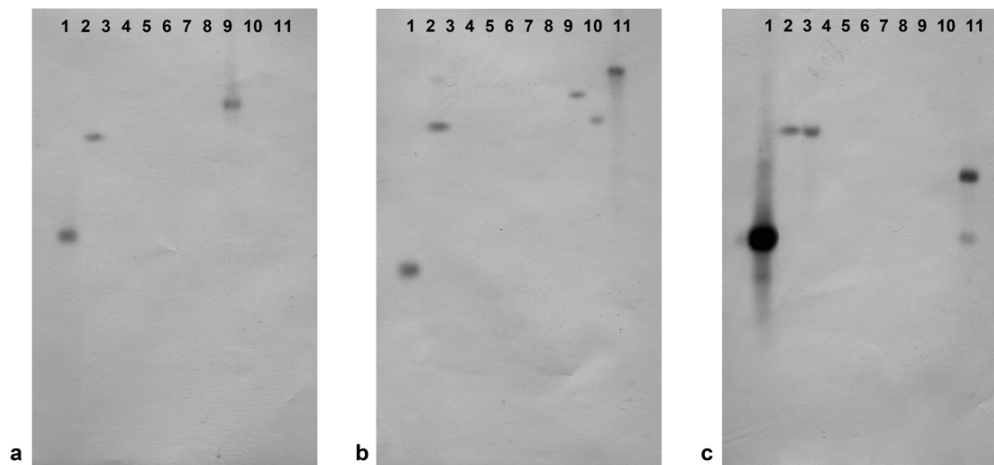
Slika 9. Hidroliza  $\beta$ -laktoglobulina (S1) i proteina surutke (S2) od strane celih ćelija odabranih laktobacila, nakon 3 h reakcije. (1) *Lb. zeae* LMG17315, (2) *Lb. casei* ATCC393, (3) *Lb. plantarum* LMG9208.

## 4.2. UTVRĐIVANJE PRISUSTVA RAZLIČITIH PROTEINAZNIH GENA U ODABRANIM SOJEVIMA

### 4.2.1. DNK/DNK hibridizacija

S obzirom da ni kod jednog od analiziranih sojeva proteinaza odgovorna za prikazanu proteolitičku aktivnost do sad nije okarakterisana, urađena je DNK/DNK (Southern blot) hibridizacija u cilju analize prisustva različitih proteinaznih gena u genomima analiziranih vrsta. Testirano je prisustvo tri različita gena, prethodno asociirana sa vrstama iz *Lb. casei* grupe: *prtP* gen poreklom iz *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14, *prtR* gen poreklom iz *Lb. rhamnosus* BGT10, i *prtP*-like gen – drugi proteinazni gen prisutan u genomu *Lb. rhamnosus* BGT10. DNK regioni koji kodiraju za katalitički domen ovih gena su umnoženi PCR reakcijama pomoću odgovarajućih prajmera (Tabela 4) i klonirani u pGEM-T Easy vektor radi umnožavanja i

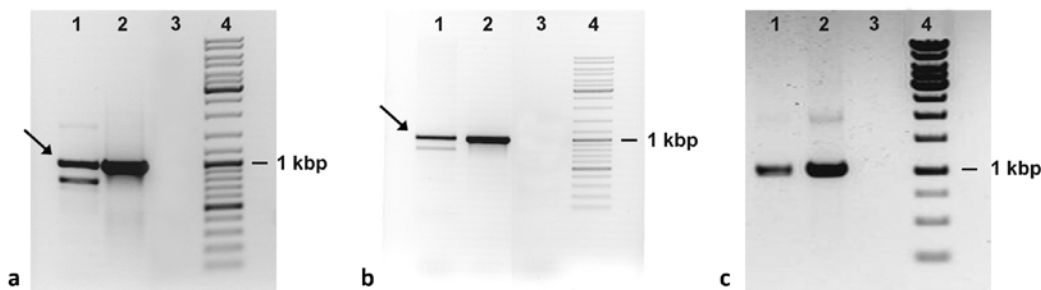
provjere sekvenciranjem. Nakon toga su isečeni iz istih pomoću *EcoRI* enzima, obeleženi i korišćeni kao probe (u daljem tekstu P, P1 i R probe) u DNK/DNK hibridizaciji (Slika 10). Totalne DNK iz *Lb. zeae* LMG17315, *Lb. casei* ATCC393, i *Lb. plantarum* sojeva LMG9208, BGBUK2-5, BGPV2-45a, LMG18024, BGGGA8, i BGHO10, kao i iz pozitivnih kontrola *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14 i *Lb. rhamnosus* BGT10 su isečene *HindIII* restrikcionim enzimom i paralelno nanosene na tri nezavisna agarozna gela. Hibridizacija je izvršena na 62°C sa svakom od tri *prt* probe. P proba je hibridizovala sa DNK izolovanom iz *Lb. zeae* LMG17315, kao i sa DNK iz *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14 (pozitivna kontrola), ali ne i sa DNK iz *Lb. casei* ATCC393, niti sa DNK iz *Lb. rhamnosus* BGT10 (Slika 10, a). P1 proba je hibridizovala sa DNK izolovanom iz *Lb. zeae* LMG17315, *Lb. casei* ATCC393 i *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14, kao i sa DNK iz *Lb. rhamnosus* BGT10 (pozitivna kontrola) (Slika 10, b). R proba je hibridizovala sa DNK izolovanom iz *Lb. zeae* LMG17315, *Lb. rhamnosus* BGT10 (pozitivna kontrola), ali i sa DNK iz *Lb. plantarum* LMG9208 (Slika 10, c). DNK izolovane iz ostalih sojeva *Lb. plantarum* nisu dale hibridizacioni signal ni sa jednom od korišćenih proba.



Slika 10. Hibridizacija P, P1 i R probi sa totalnim DNK izolovanim iz analiziranih laktobacila. Na panelu (a) prikazana je hibridizacija sa P probom (katalitički domen *prtP* gena iz *Lb. paracasei* BGHN14), na panelu (b) sa P1 probom (katalitički domen *prtP*-like gena prisutnog u *Lb. rhamnosus* BGT10), a na panelu (c) sa R probom (katalitički domen *prtR* gena iz *Lb. rhamnosus* BGT10). (1) proba, (2) *Lb. zeae* LMG17315, (3) *Lb. plantarum* LMG9208, (4) *Lb. plantarum* BGBUK 2-5, (5) *Lb. plantarum* BGPV2-45a, (6) *Lb. plantarum* LMG18024, (7) *Lb. plantarum* BGGGA8, (8) *Lb. plantarum* BGHO10, (9) *Lb. paracasei* BGHN14, (10) *Lb. casei* ATCC393, (11) *Lb. rhamnosus* BGT10.

## 4.2.2. Potvrda rezultata hibridizacije PCR reakcijama

Nakon detekcije prisustva pojedinih gena u nekim ispitivanim sojevima laktobacila hibridizacijom, PCR metoda je korišćena za proveru dobijenih rezultata kao i u cilju umnožavanja odgovarajućih sekvenci gena koje su hibridizovale sa korišćenim probama. Tako je prisustvo DNK regiona koji kodira za katalitički domen *prtP*-sličnog gena potvrđeno u *Lb. zeae* LMG17315 i u *Lb. casei* ATCC393 sekvenciranjem produkata PCR reakcije koji su dobijeni korišćenjem njihovih DNK kao matrice i PR1/PR2 prajmerskog para (Slika 11, a i b). Međutim, dobijene sekvence su pokazale 79% i 78% identičnosti poređenjem sa istim regionom *prtP*-like gena iz *Lb. rhamnosus* GG, ali 99% međusobne identičnosti, što ukazuje da je reč o istom genu u sojevima *Lb. zeae* LMG17315 i *Lb. casei* ATCC393. S obzirom na ovako visok nivo razlika u sekvenci katalitičkog domena između proteinaznog gena detektovanog u LMG17315 i ATCC393, i gena prisutnog u soju *Lb. rhamnosus* GG, u pitanju je najverovatnije novi gen, u daljem tekstu označen kao *prtP1*. Prisustvo sekvence katalitičkog domena *prtR* gena u *Lb. plantarum* LMG9208 je potvrđeno PCR-om pomoću Prti i IP6RXba prajmera (Slika 11, c). Dobijeni produkt je sekvenciran i pokazao je 78% identičnosti sa *prtR* genom iz *Lb. rhamnosus* BGT10. Sekvence katalitičkih domena *prtP1* iz *Lb. zeae* LMG17315 i *Lb. casei* ATCC393 su deponovane u Uniprot bazu podataka pod pristupnim brojevima HG421744 i HG421745, redom, dok je sekvenca katalitičkog domena *prtR* iz *Lb. plantarum* LMG9208 deponovana pod pristupnim brojem HG421743.

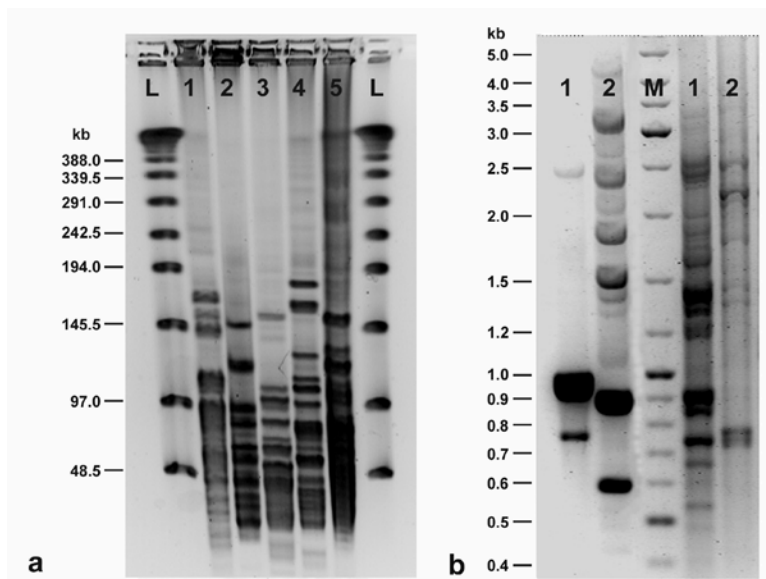


Slika 11. (a) i (b) Detekcija *prtP1* gena u *Lb. zeae* LMG17315 odnosno *Lb. casei* ATCC393. (1) PCR produkti dobijeni korišćenjem PR1 i PR2 prajmera i odgovarajuće DNK, (2) Pozitivna kontrola – PCR produkt dobijeni korišćenjem istih prajmera i DNK iz *Lb. rhamnosus* BGT10, (3) Negativna kontrola – PCR smeša bez DNK, (4) Ready-Load 500 bp DNA Ladder. Strelice ukazuju na fragmente koju su sekvencirani. (c) Detekcija *prtR* gena u *Lb. plantarum* LMG9208. (1) PCR produkt dobijen korišćenjem Prti2 i IP6RXba i totalne DNK iz *Lb. plantarum* LMG9208, (2) Pozitivna kontrola – PCR produkt dobijeni korišćenjem istih prajmera i DNK iz *Lb. rhamnosus* BGT10, (3) Negativna kontrola – PCR smeša bez DNK, (4) Ready-Load 1 kbp DNA Ladder.

Iznenadujuće, PCR reakcija sa P15C/P06C prajmerskim parom, specifičnim za sekvencu katalitičkog domena *prtP* gena, nije dala umnoženi produkt kada je totalna DNK iz *Lb. casei* ATCC393 korišćena kao matrica.

### 4.3. METODE MOLEKULARNE DETERMINACIJE

S obzirom na problematičan taksonomski status unutar *Lb. casei* grupe, analizirani sojevi su okarakterisani metodama molekularne determinacije (Slika 12), odnosno pomoću PFGE i rep-PCR-a. PFGE analiza se smatra zlatnim standardom kada se radi o molekularnoj karakterizaciji sojeva. Zbog toga su ispitivani sojevi *Lb. casei* grupe analizirani ovom metodom, a paralelno sa njima i jedan soj predstavnik *Lb. plantarum* – LMG9208, kod koga je otkriveno prisustvo katalitičkog domena *prtR* gena. Utvrđeno je da nijedan od analiziranih sojeva ne deli većinu fragmenta dobijenih *NotI* genomskom digestijom, što implicira da se radi o pripadnicima različitih vrsta (Slika 12, a). Razlike između sojeva *Lb. zaeae* LMG17315 i *Lb. casei* ATCC393, za koje je predloženo da treba da budu reklasifikovani u istu vrstu, su dodatno utvrđene rep-PCR analizom, iz koje se vidi da se paterni traka koji se dobijaju pomoću BOX i (GTG)<sub>5</sub> prajmera, potpuno razlikuju među ovim sojevima (Slika 12, b).



Slika 12. (a) PFGE *NotI* fragmenata totalne DNK izolovane iz (1) *Lb. paracasei* BGHN14, (2) *Lb. zaeae* LMG17315, (3) *Lb. casei* ATCC393, (4) *Lb. rhamnosus* BGT10, (5) *Lb. plantarum* LMG9208, (L) Konkatemere Lambda faga (b) rep-PCR profili (1) *Lb. zaeae* LMG17315, (2) *Lb. casei* ATCC393 i dobijeni pomoću BOX (levo) i (GTG)<sub>5</sub> (desno) prajmera, (M) Gene Ruler DNA Ladder Mix.

## UTICAJ PROTEINAZE PrtP NA AKTIVNOST BAKTERIOCINA LcnB

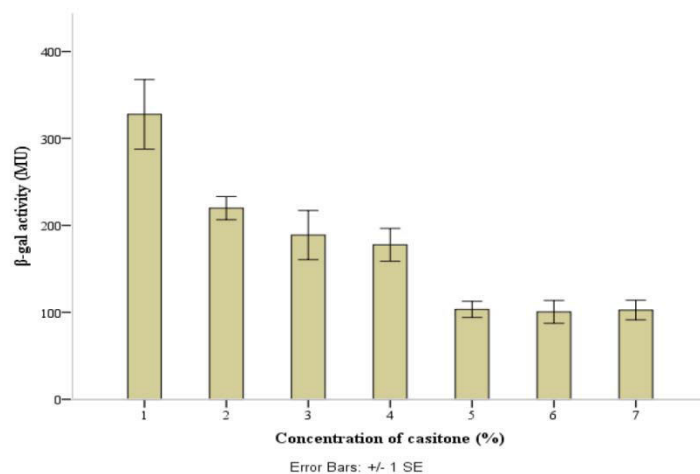
### 4.4. UTICAJ MEDIJUMA NA AKTIVNOST PROMOTORA $P_{lcnB}$

Od ranije je poznato da je aktivnost bakteriocina LcnB veća prilikom rasta bakterija u medijumima bogatijim peptidima. Da bi se ispitalo da li je za ovaj efekat odgovorna regulacija na nivou transkripcije, ispitana je zavisnost aktivnosti promotora  $P_{lcnB}$  od koncentracije peptida u medijumu. Promotor  $P_{lcnB}$  je kloniran u transkripcioni fuzioni vektor pNZ8150lacZ1, prvi takav vektor razvijen za ekspresione analize u laktokokama. Ovaj vektor se pokazao vrlo pouzdanim i lakim za rukovanje, a glavna prednost se ogleda u mogućnosti praćenja rezultata preko uobičajenog reporterskog sistema kakva je  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost. Konstrukt pNZ8150lacZ1 $P_{lcnB}$  je transformisan u *L. lactis* subsp. *cremoris* MG7284, soj koji nema ni bakteriocinsku ni proteinaznu aktivnost. Transformanti su zasejani na GM17 čvrsti medijum u koji su prethodno dodati hloramfenikol (7,5  $\mu$ g/ml) i X-gal u visokoj koncentraciji (50  $\mu$ g/ml), nakon čega su kolonije zadobile karakterističnu plavu boju (Slika 13).



Slika 13. *L. lactis* subsp. *cremoris* MG7284 transformisan sa pNZ8150lacZ1 $P_{lcnB}$ . Usled ekspresije gena *lacZ* sa plazmida, dolazi do razgradnje X-gal prisutnog u medijumu, čime bakterije dobijaju plavu boju.

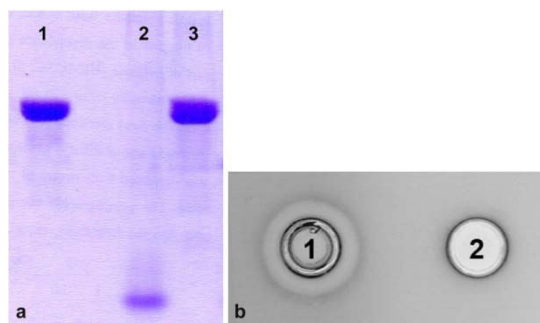
Proizvodnja  $\beta$ -galaktozidaze je analizirana tokom rasta MG7284/pNZ8150lacZ1 $P_{lcnB}$  transformanta u GM17 medijumu sa različitim koncentracijama kazitona (0% - 8%). Na ovaj način je utvrđeno da promotor pokazuje značajan, ali ograničen pad u aktivnosti sa porastom kazitona u medijumu. Nakon zasićenja od 4%, dalji porast koncentracije peptida u medijumu nema efekat na utišavanje promotora  $P_{lcnB}$  (Slika 14).



Slika 14. Aktivnost promotora *lcnB* merena preko  $\beta$ -galaktozidaznog eseja. Kada ćelije rastu u GM17 medijumu sa niskom koncentracijom kazitona,  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost je oko tri puta viša nego u GM17 medijumu sa visokom koncentracijom kazitona.

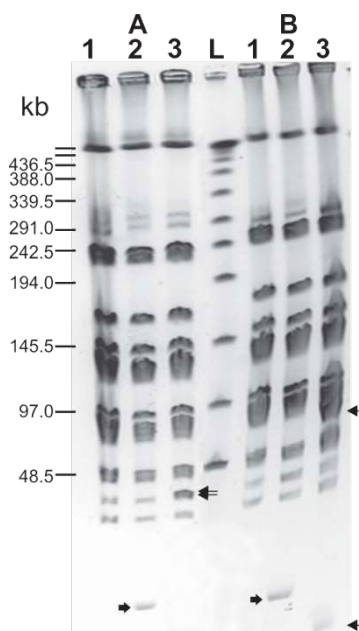
#### 4.5. KONSTRUKCIJA MUTANATA *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501

U cilju proučavanja interakcije proteinaze PrtP i bakteriocina LcnB, konstruisani su mutanti u kojima su geni odgovorni za sintezu ova dva proteina inaktivirani ugradnjom konstrukata  $pG^+$ host9 vektora ( $pG^+$ host9prtP i  $pG^+$ host9lcnB). Integracija konstrukata u odgovarajuće gene na plazmidu pMN80 nakon rasta transformanata 48 h na 37°C, potvrđena je fenotipskim analizama, kao i pomoću PFGE. Mutanti kod kojih se  $pG^+$ host9prtP integrisao u *prtP* gen izgubili su sposobnost hidrolize  $\beta$ -kazeina (Slika 15 a), dok su mutanti kod kojih *lcnB* podlegao inserciji od strane  $pG^+$ host9lcnB konstrukta, pokazali  $LcnB^-$  fenotip (Slika 15 b).



Slika 15. (a) Analiza proteinazne aktivnosti BGMN1-501/ $pG^+$ host9prtP. (1)  $\beta$ -kazein, (2) BGMN1-501 (pozitivna kontrola), (3) *prtP* integrant. (b) Analiza bakteriocinske aktivnosti BGMN1-501/ $pG^+$ host9lcnB. (1) BGMN1-501, (2) *lcnB* integrant

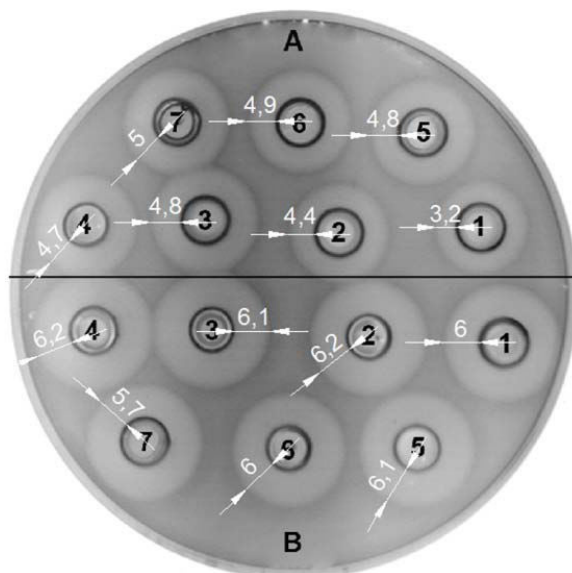
Radi eliminacije eventualne mogućnosti kontaminacije sojem laktokoka koji poseduje isti fenotip, urađena je PFGE analiza kojom je potvrđeno da selektovani mutanti pripadaju polaznom soju BGMN1-501. Dodatno, PFGE analiza polaznog soja, transformanata sa slobodnim konstruktima (gajenim sve vreme na 28°C) i mutanata je potvrdila da su se integracije u pMN80 plazmid u ova dva slučaja desile u različitim regionima, između kojih se nalazi minimalno 35 kb sekvence (Slika 16). LcnB<sup>-</sup> mutant je napravljen da bi se izbegla eventualna mogućnost prisustva LcnB molekula u proteinaznim ekstraktima koji su korišćeni u ispitivanju *in vitro* delovanja PrtP proteinazena LcnB bakteriocin.



Slika 16. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju fragmenata dobijenih *Sma*I digestijom PrtP<sup>-</sup> (A) i LcnB<sup>-</sup> (B) mutanata BGMN1-501. (1) BGMN1-501, (2) BGMN1-501 sa odgovarajućim slobodno replicirajućim pG<sup>+</sup>host9 konstruktom (rast na 28°C), (3) mutanti BGMN1-501, (L) Konkatemere Lambda faga. Široke strelice pokazuju slobodni pG<sup>+</sup>host9 konstrukt, dok oštre strelice ukazuju na pojavu novih *Sma*I fragmenata u mutantima nakon insercije pG<sup>+</sup>host9 konstrukata (pG<sup>+</sup>host9 uvodi dodatno *Sma*I mesto)

#### 4.6. UTICAJ MEDIJUMA NA BAKTERIOCINSKU AKTIVNOST KOD BGMN1-501 I NJEGOVOG PrtP<sup>-</sup> MUTANTA

Konstrukcijom PrtP<sup>-</sup> mutanata, bilo je moguće je pratiti efekat nedostatka proteinaze PrtP na ćelijskom zidu i u međućelijskoj sredini. Bakteriocinska aktivnost BGMN1-501 i njegovog PrtP<sup>-</sup> mutanta je analizirana nakon 16 sati rasta u GM17 medijumu sa različitim koncentracijom kazitona (0% w/v, 0.5% w/v, 1% w/v, 2% w/v, 4% w/v, 6% w/v, i 8% w/v). Kaziton je pankreatični hidrolizat kazeina i sastoji se uglavnom od malih peptida i aminokiselina (u odnosu oko 4:1) (Marugg et al. 1995). Povišavanje koncentracije kazitona u medijumu uslovalo je porast u bakteriocinskoj aktivnosti BGMN1-501. Nasuprot tome, kada je na isti način ispitivan PrtP<sup>-</sup> mutant, nisu uočene nikakva variranja u njegovoj bakteriocinskoj aktivnosti (Slika 17). Međutim, uočeno je da su zone inhibicije rasta koje je mutant proizvodio bile veće od najvećih zona proizvedenih od strane polaznog soja BGMN1-501.



Slika 17. Aktivnost LcnB iz BGMN1-501 (A) i BGMN1-501/pG<sup>+</sup>host9prtP (PrtP<sup>-</sup> mutanta) (B), nakon rasta u GM17 medijumu sa različitim koncentracijama kazitona: (1) 0%, (2) 0,5%, (3) 1%, (4) 2%, (5) 4%, (6) 6%, (7) 8%. Dijametri zona su dati u milimetrima.



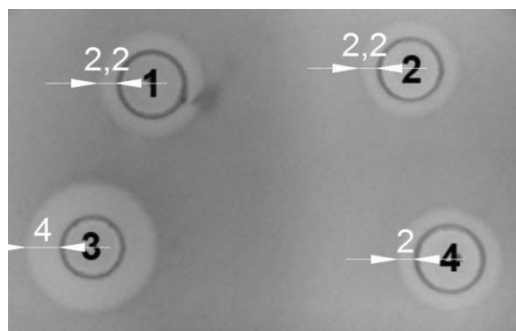
## 4.7.UTICAJ PROTEINAZE PrtP NA AKTIVNOST BAKTERIOCINA LcnB *in vitro*

S obzirom da je konstrukcijom BGMN1-501/pG+host9prtP napravljen monogeniski mutant, promena u bakteriocinskoj aktivnosti ukazuje da je razlog za pomenutu promenu neaktivnost PrtP proteinaze. Postavljena je hipoteza da PrtP proteinaza specifično hidrolizuje LcnB bakteriocin smanjujući mu aktivnost. U cilju potvrde ove hipoteze, kao i da bi se testiralo da li PrtP proteinaza potpuno ili delimično narušava aktivnost LcnB bakteriocina, delovanje proteinaze na bakteriocin je testirano *in vitro*, mešanjem proteinaznih i bakteriocinskih ekstrakata, njihovom inkubacijom 2 h na 30°C i testiranjem aktivnosti tretiranog bakteriocina. Radi otklanjanja bilo kakve kontaminacije, PrtP ekstrakt je dobijan od mutanata kod kojih je inaktiviran gen za LcnB bakteriocin. Ovo je rađeno da bi se izbeglo prisustvo molekula LcnB bakteriocina u proteinaznom preparatu koji bi interferirali sa detektovanom aktivnošću. S druge strane, bakteriocinski ekstrakt je dobijan iz dva izvora – BGMN1-501 i paralelno iz njegovog PrtP<sup>-</sup> mutanata. Oba ova bakteriocinska preparata su tretirana sa PrtP proteinazom, da bi se ispitala razlika u efektu proteinaze na LcnB bakteriocin iz različitih izvora. Prema postavljenoj hipotezi, LcnB bakteriocin iz BGMN1-501 je već obrađen od strane sopstvene proteinaze, dok LcnB bakteriocin iz BGMN1-501/pG+host9prtP mutanta odgovara bakteriocinu koga proteinaza nije obradila jer je *prtP* gen inaktiviran u ovom soju. Na taj način sav bakteriocin dobijen iz ovog mutanta je intaktan i odgovara onoj sekvenci koja je predviđena na osnovu primarne strukture *lcnB* gena.

S obzirom da mešanjem sa proteinaznim ekstraktom dolazi do razblaživanja bakteriocinskog preparata, radi adekvatnog poređenja veličine zona početni bakteriocinski ekstrakt je paralelno mešan i samo sa puferom pomoću kog je pravljen PrtP ekstrakt (NaPi puferpH 7) i tretiran na isti način.

Rezultati su prikazani na slici 18. Kao što je već pokazano (Slika 17), aktivnost LcnB bakteriocina je izrazito veća kod PrtP<sup>-</sup> mutanta u odnosu na izvorni soj (bunar 3 vs bunar 1). Kada se u ta dva bakteriocinska preparata doda PrtP proteinaza dolazi do različitih fenomena: - aktivnost LcnB bakteriocina iz izvornog soja ne trpi nikakvu promenu (bunar 2 vs bunar 1), dok aktivnost LcnB bakteriocina iz mutanta biva značajno smanjena u odnosu na početnu (bunar 4 vs

bunar 3). Ovim tretmanom došlo je do vraćanja bakteriocinske aktivnosti mutanta na isti nivo kao kod originalnog soja, što sugerira da PrtP proteinaza značajno, ali ne i potpuno, smanjuje aktivnost LcnB bakteriocina.



Slika 18. Aktivnost LcnB iz BGMN1-501 i iz njegovog PrtP<sup>-</sup> mutanta, pre i nakon inkubacije sa PrtP proteinaznim ekstraktom iz BGMN1-501/pG+host9lcnB (LcnB<sup>-</sup> mutant). (1) LcnB iz BGMN1-501 sa NaPi puferom, (2) LcnB iz BGMN1-501 sa PrtP iz BGMN1-501/pG+host9lcnB, (3) LcnB iz PrtP<sup>-</sup> mutanta sa NaPi puferom, (4) LcnB iz BGMN1-501/pG+host9prtP sa PrtP iz BGMN1-501/pG+host9lcnB. Aktivnost LcnB iz BGMN1-501/pG+host9prtP biva smanjena inkubiranjem sa PrtP do onog nivoa koji ima LcnB iz BGMN1-501.

Drugim rečima, dodavanje PrtP proteinaze *in vitro*, odnosno njeno nadomešćivanje kod mutanta rezultuje vraćanjem aktivnosti bakteriocina na isti nivo kao kod originalnog soja.

Kao što se vidi iz bunara 2, dodavanje PrtP proteinaze u smešu bakteriocina koji je već obrađen od strane sopstvene proteinaze nema efekta na njegovu aktivnost. Takođe, važno je napomenuti da sa produžavanjem vremena inkubacije PrtP i LcnB ekstrakata iz mutanta, ne dolazi do daljeg smanjivanja zona inhibicije (bunar 4).

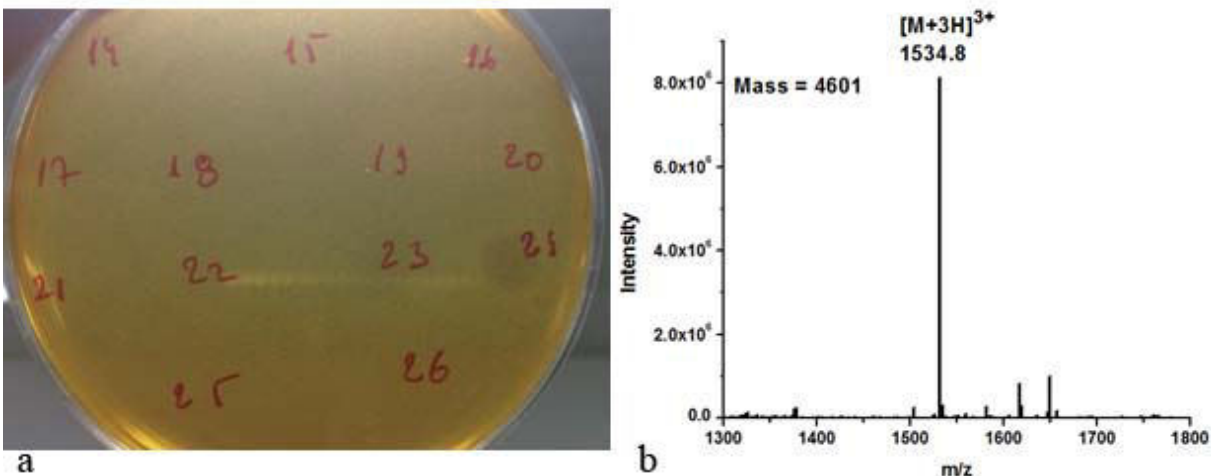
#### 4.8. DETEKCIJA BAKTERIOCINA LcnB *in vivo*

Nakon dobijenih rezultata sledeći cilj bio je da se okarakteriše mesto sečenja proteinaze PrtP u molekulu LcnB bakteriocina. S obzirom da je aminokiselinska sekvenca LcnB bakteriocina poznata, odlučeno je da se pristupi njegovoj izolaciji iz originalnog soja BGMN1-501 i detektovanju mase tako izolovanog bakteriocina. Bakterije su gajene u uslovima u kojima prema hipotezi dolazi do obrade bakteriocina, odnosno u medijumu sa niskom koncentracijom slobodnih peptida što indukuje ekspresiju PrtP. Razlika između detektovane mase molekula i

mase predviđene na osnovu njegove sekvence, omogućila je precizno određivanje mesta gde u molekulu LcnB bakteriocina dolazi do proteolitičke obrade.

S obzirom da je utvrđeno da bakteriocinska aktivnost zavisi od koncentracije peptida u CDM medijumu isto kao i u slučaju kada se bakterije gaje u GM17 medijumu, amonijum sulfatna precipitacija je rađena iz prekonocne kulture BGMN1-501 gajene u CDM medijumu sa 0,5% kazitona. Na taj način smanjeno je prisustvo svih ostalih peptida i molekula koji mogu ometati razdvajanje i detekciju LcnB, a koji se nalaze u bogatom GM17 medijumu.

Proteini iz supernatanta prekonocne kulture soja BGMN1-501 su precipitirani amonijum sulfatom sa 40% zasićenja. Dobijeni peleti su resuspendovani u 100 puta manjoj zapremini od polazne i pripremljeni za reverzno-faznu HPLC analizu. Razdvajanje uzorka je vršeno na dve kolone. Nakon prvobitnog razdvajanja na C5 koloni dobijeno je 26 frakcija koje su testirane na aktivnost (Slika 19, a). Aktivna frakcija je nakon razdvajanja uparena i direktno ubrizgana na C18 kolonu, spregnutu sa masenim spektrometrom, kojim su detektovani maseni joni prikazani na slici 19 (b).



Slika 19. (a) Testiranje bakteriocinske aktivnost frakcija dobijenih nakon reverzno-fazne HPLC na C5 koloni. Prosvetljenje u frakciji br 24 ukazuje da se u njoj nalazi bakteriocin LcnB. (b) Maseni spektar aktivne frakcije.

Kao što se vidi sa Slike 19 (a), LcnB bakteriocin se eluirao u poslednjim frakcijama, što znači da je bio među najhidrofobnijim peptidima prisutnim u rastvoru. Masena spektrometrija je dalje pokazala da se radi o peptidu čija molekulska masa iznosi 4601 Da, što iznosi tačno 721 Da manje od mase predviđene na osnovu sekvence gena (5322 Da). Kada se uzmu u obzir sve

hipotetičke mase peptida sa sekvencijalno uklonjenim aminokiselinama sa N i C terminusa, dolazi se do podatka da je jedini peptid kome odgovara detektovana masa onaj kome je uklonjeno 6 aminokiselina sa N terminusa (Tabela 5).

S obzirom na to da je ovakav bakteriocin detektovan iz supernatanta originalnog soja BGMN1-501, potvrđeno je da se digestija LcnB bakteriocina zaista odigrava i to između šeste i sedme aminokiseline u molekulu.

**Tabela 5. Proteinska sekvenca i predikovana masa LcnB i njegovih potencijalnih formi nakon digestije. Podvučen je detektovan oblik.**

<b>Sekvenca LcnB</b>	<b>Masa (Da)</b>
SLQYVMSAGPYTWYKDTRTGKTICKQTIDTASYTFGVMAEGWGKTFH	5322
LQYVMSAGPYTWYKDTRTGKTICKQTIDTASYTFGVMAEGWGKTFH	5235
QYVMSAGPYTWYKDTRTGKTICKQTIDTASYTFGVMAEGWGKTFH	5122
YVMSAGPYTWYKDTRTGKTICKQTIDTASYTFGVMAEGWGKTFH	4994
VMSAGPYTWYKDTRTGKTICKQTIDTASYTFGVMAEGWGKTFH	4831
MSAGPYTWYKDTRTGKTICKQTIDTASYTFGVMAEGWGKTFH	4732
<u>SAGPYTWYKDTRTGKTICKQTIDTASYTFGVMAEGWGKTFH</u>	<b>4601</b>
AGPYTWYKDTRTGKTICKQTIDTASYTFGVMAEGWGKTFH	4514

## 5. DISKUSIJA

Uprkos višedecenijskom radu na MKB i njihovim enzimima, interesovanje za ove bakterije i njihove proteinaze ne jenjava. Nova otkrića, poput toga da proteinaze *Lb. casei* mogu degradovati medijatore inflamacije, otvorila su nove aspekte proučavanja i primene ovih enzima. Zbog toga se u skorijoj budućnosti može očekivati i njihova upotreba kao farmaceutskih agenasa. Takođe, s obzirom na sve veći značaj funkcionalne hrane i bioaktivnih peptida upotreba proteinaza u industrijskim procesima proizvodnje različitih hidrolizata je u porastu. U poslednje vreme aktuelizovan je i razvoj metoda za njihovo prečišćavanje i imobilizaciju (Agyei et al. 2013; Agyei et al. 2014). Praktično je neograničen broj i količina bioaktivnih peptida koji se mogu dobiti razgradnjom proteina hrane različitog porekla. Ključna uloga proteolitičkih enzima u ovom procesu je odavno poznata, ali nasuprot tradicionalno korišćenim biljnim i animalnim enzimima, proteinaze MKB se sve više primenjuju i proučavaju za ove potrebe. Proteinaze MKB poseduju nekoliko značajnih prednosti u odnosu na proteinaze iz drugih izvora: (1) lako i jeftino se dobijaju, uzimajući u obzir vreme i troškove za efikasan bakterijski rast; (2) prirodno se eksprimiraju na površini bakterijskih ćelija što dodatno olakšava njihovo sakupljanje i smanjuje troškove izolacije, i što je možda i najbitnije, (3) njihov diverzitet je velik, uporediv sa diverzitetom samih bakterija iz kojih potiču (Agyei & Danquah 2011).

Istovremeno, znanje o bakteriocinima se takođe širi i usložnjava. Njihov diverzitet, mehanizmi delovanja i rezistencija u fokusu su brojnih istraživanja, a njihova antimikrobna aktivnost se i dalje smatra najizglednijom alternativom ili dopunom antibioticima čija primena sve češće nailazi na ozbiljna ograničenja.

Iako su zahvaljujući svojim raznovrsnim karakteristikama našli različite primene, laktobacili još uvek nedovoljno proučena grupa MKB. U prvom delu ovog rada okarakterisan je proteolitički kapacitet različitih predstavnika mezofilnih vrsta laktobacila prema pet najvažnijih proteina kravljeg mleka. Testirana je mogućnost dobijanja aktivnih proteinaznih ekstrakata, kao i prisustvo i distribucija različitih proteinaznih gena. Osim pomenutog, primenjene analize su zajedno sa metodama molekularne determinacije omogućile bolji uvid u sličnosti i razlike

između analiziranih vrsta, što može biti od značaja za rešavanje njihove problematične sistematike.

Akcent je stavljen na *Lb. zaeae*, vrstu slabo opisanu u literaturi, za koju postoje oskudni podaci o proteolitičkoj sposobnosti. Ustanovljeno je da analizirani soj *Lb. zaeae* LMG17315 poseduje izuzetnu proteolitičku aktivnost, s obzirom da brzo i potpuno hidrolizuje većinu testiranih proteina. Poredeći sa dostupnim podacima o drugim okarakterisanim sojevima laktobacila, LMG17315 spada u red najpotentnijih proteolita ovog roda. Proteinaza (ili više njih) ovog soja odvajaju se u aktivnoj formi sa ćelijskog zida i u stanju su da efikasno hidrolizuju sve tri kazeinske frakcije. Osim toga, pokazano je da ovaj soj može da hidrolizuje glavne proteine surutke,  $\beta$ -laktoglobulin i  $\alpha$ -laktalbumin. Soj *Lb. casei* ATCC393 za koji je različitim molekularnim metodama utvrđeno da treba da bude reklasifikovan u vrstu *Lb. zaeae*, takođe je pokazao prisustvo potentne proteinaze na svojoj površini, međutim, aktivnost ovog soja je bila niža od one iz LMG17315. Nakon detekcije prisutnih proteinaznih gena, u oba soja je potvrđeno prisustvo sekvence katalitičkog domena *prtP1* – novog proteinaznog gena najbližijeg *prtP*-sličnom genu iz vrste *Lb. rhamnosus* GG. Stepent identičnosti između dela detektovanog gena i pomenutog *prtP*-sličnog iznosi 79% na nukleotidnom i 90% na proteinskom nivou, što ukazuje da se radi o novom genu, jer je domen koji je analiziran evolutivno najočuvaniji među ovim enzimima. Ono što je bitno istaći jeste da je poređenje sekvenci ovog gena iz LMG17315 i ATCC393 pokazalo 99% identičnosti na nukleotidnom nivou, što znači da ova dva soja verovatno imaju istu, do sada neokarakterisanu proteinazu, u ovom radu označenu kao PrtP1. Odsustvo hibridizacionog signala sa probom iz *prtP* gena, kao i PCR produkta sa *prtP* specifičnim prajmerima, ukazuje da ATCC393 ne poseduje *prtP* gen, što ovaj soj odvajaju od svih drugih proteolitički aktivnih sojeva *Lb. casei* i *Lb. paracasei*. Naime, kod svih do sada opisanih Prt<sup>+</sup> sojeva iz ovih vrsta pokazano je prisustvo *prtP* gena. Ovi rezultati podržavaju tezu da ATCC393 nije reprezentativan soj *Lb. casei* vrste i da treba da bude premešten u novi takson, na osnovu dosadašnjih istraživanja u *Lb. zaeae*. Međutim, u ovom radu su uočene i značajne razlike između ova dva soja, kako na fenotipskom tako i na genotipskom nivou. Najveće razlike uočene su u reakciji proteinaznog ekstrakta sa  $\alpha$ - i  $\kappa$ - kazeinskim frakcijama, gde je reakcija potpuno izostala u slučaju ATCC393, dok je ekstrakt LMG17315 demonstrirao jasnu aktivnost prema ovim supstratima. Takođe, ATCC393 je samo delimično u stanju da hidrolizuje  $\kappa$ - kazein, kada se kao izvor enzima koriste cele ćelije ovog soja. Dalje, dok je kod ATCC393 detektovan samo

jedan, pomenuti *prtP1* gen, kod LMG17315 su, pored te, izgleda prisutne još dve proteinaze – jedna PrtP-tipa, i jedna PrtR-tipa. Ove razlike su još izraženije kada se pogledaju rezultati molekularne determinacije ovih sojeva, koji ukazuju da se ipak radi o različitim vrstama, uzimajući u obzir da njihovi BOX, (GTG)<sub>5</sub> i PFGE profili ne dele zajedničke obrasce. S tim u vezi potencijalno rešenje statusa ATCC393 bi bilo ili u formiranju novog taksona ili podvrste u okviru vrste *Lb. zaeae*. Da bi se adekvatno odgovorilo na postavljena pitanja kao što su razlike u aktivnosti celih ćelija, proteinaznih ekstrakata (odnosno koliko proteinaza je prisutno i eksprimirano) kao i filogenetskog statusa neophodno bi bilo uporediti sekvence celokupnih genoma kao i translacione profile ova dva soja.

Tri nezavisna *prt* gena u genomu *Lb. zaeae* LMG17315 čini ovu vrstu jedinstvenom u *Lb. casei* grupi i nameću pitanje njihovog biološkog smisla. *Lb. zaeae* se može naći u mleku i sirevima, ali ne sa velikom zastupljenošću, te se postavlja pitanje da li odlična proteolitička aktivnost pruža značajnu adaptivnu prednost u tom smislu ako oni nisu stanovnici proteinima bogatih sredina. Takođe, postojanje tri proteinazna gena je kontroverzno *per se*, jer je poznato da su gubitak gena i redukcija genoma bili glavni evolutivni trend kod laktobacila i generalno MKB. Pogotovo je problematično to što su u pitanju geni koji spadaju među najveće (> 6 kb) u genomu. Ono što je zanimljivo je da je prvi put primećeno prisustvo *prtR* gena izvan vrste *Lb. rhamnosus* u kojoj je ovaj gen inicijalno opisan.

Kod svih analiziranih sojeva *Lb. plantarum* uočena je jaka proteolitička aktivnost, ali samo sa celim ćelijama. Drugim rečima, proteinaze ovih sojeva ne odvajaju se sa površine ćelija u aktivnom obliku. Iznenadjuće je da je soj LMG9208 pokazao pozitivan signal u DNK/DNK hibridizaciji sa probom iz *prtR* gena. Međutim pokazano je, slično kao u slučaju *prtP1*, da detektovani deo gena ima 78% identičnosti na nivou nukleotidne a 91% na nivou proteinske sekvence sa odgovarajućim delom *prtR* gena, što opet ukazuje da se radi o novom genu, koji može imati potpuno drugačije osobine od ranije okarakterisane PrtR proteinaze. Imajući u vidu situaciju u *Lb. zaeae*, ovo je prvi dokaz o prisustvu *prtR* gena van *Lb. casei* grupe i jedan od prvih opisanih proteinaznih gena u *Lb. plantarum* uopšte. Odsustvo hibridizacionog signala sa bilo kojom od korišćenih proba, implicira da ostali sojevi *Lb. plantarum* imaju proteinazni gen (ili gene), čiji su katalitički domeni previše različiti da bi hibridizovali sa korišćenim probama, čak i pri relativno niskoj temperaturi. *Lb. plantarum* spada u najbolje proučene laktobacile, a dostupna

je i sekvenca celog genoma jednog soja. Ipak, ne postoji nijedan podatak o proteinazama kod ove vrste osim što je, poput ovde opisane situacije sa LMG9208, u jednom soju izolovanom iz sira nađena sekvenca koja kodira za katalitički domen *prtP* gena (Strahinic et al. 2010). Prisustvo PrtP i PrtR tipova proteinaza u *Lb. plantarum* je neobično, s obzirom na filogenetsku udaljenost *Lb. casei* i *Lb. plantarum* grupa. Međutim, ovi rezultati, zajedno uz činjenicu da prisustvo proteinaza varira u različitim sojevima iste vrste, možda upravo svedoče o prilagođavanju na uslove spoljašnje sredine, odnosno o horizontalnom genskom transferu (HGT). S obzirom da proteinazni geni kodiraju primarne enzime za razgradnju proteina i samim tim su esencijalni za efikasan rast u mleku, opravdano je pretpostaviti da su ovi geni, kao faktori adaptacije, prenošeni putem HGT-a. Štaviše, moguće je da je u pitanju bio repetitivan proces koji je vremenom kod nekih sojeva doveo do zadobijanja većeg broja sličnih gena, što bi objasnilo pojavu nekoliko *prt* gena u istom genomu.

Zanimljivo je da su *prtR*-slični geni detektovani u pripadnicima *Lb. zeae* i *Lb. plantarum* koji su biljnog porekla, a soj u kojem je ovaj gen prvobitno opisan je bio humani izolat, dok je *Lb. plantarum* kod koga je detektovan *prtP* gen izolovan iz sira. Moguće je da PrtR proteinaze obezbeđuju bolju prilagođenost životu u biljnom materijalu, dok PrtP tip više odgovara sredinama koje obiluju mlečnim proteinima. Prisustvo oba tipa gena u genomu *Lb. zeae* ili kod nekih *Lb. rhamnosus* može biti posledica naseljavanja nove ekološke niše, odnosno prelaska sa biljaka u mleko i mlečne proizvode ili obrnuto, što je rezultovalo zadobijanjem novih proteinaznih gena. Ovo je u saglasnosti sa već opisanim sličnim fenomenima, koji sugerišu da *Lb. casei* grupa zapravo poseduje supra-genom, iz koga pojedini pripadnici po potrebi mogu preuzimati nove gene (Broadbent et al. 2012). Kasnija evolucija gena nakon prelaska u novog domaćina bi objasnila razlike koje se uočavaju među proteinazama istog tipa.

Drugi cilj ove teze bio je ispitivanje regulacije ekspresije bakteriocina LcnB i moguće interakcije proteinaze PrtP i ovog bakteriocina u *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501. Laktokokalna proteinaza PrtP je najbolje proučena proteinaza svih MKB sa genetičkog i biohemijskog aspekta. Proces sinteze, eksporta, maturacije kao i domenska struktura i supstratna specifičnost su detaljno opisani za ovaj enzim. Takođe, dosta je urađeno na polju regulacije genske ekspresije gde je definisan mehanizam putem kojeg se informacija o potrebnosti ekspresije prenosi iz spoljašnje sredine do *prtP* gena, u kom transkripcioni regulator CodY ima



ključnu ulogu. Postavljen je model prema kojem je ekspresija *prrP* gena obrnuto proporcionalna količini peptida i slobodnih aminokiselina u medijumu u kojem bakterije rastu. Drugim rečima, proteinaza se eksprimira kada je u medijumu niska koncentracija malih peptida, a ukoliko nakon toga pomenuta koncentracija poraste – dolazi do utišavanja njene ekspresije. Pokazano je takođe da su proteinaze mnogo efikasniji enzimi u odnosu na potrebe bakterijskih ćelija koje ih proizvode, odnosno da njihovom aktivnošću nastaje velika količina peptida od koje se procenjuje da bakterije koriste samo mali deo (Kunji et al. 1998).

Bakteriocin LcnB je takođe dobro proučen i definisani su njegov mehanizam i spektar delovanja. Međutim, nema podataka o regulaciji ekspresije ovog gena na bilo kom nivou, niti je LcnB bakteriocin na bilo kakav način dovođen u vezu sa PrtP proteinazom. To je razumljivo, s obzirom da ovi proteini imaju potpuno različite funkcije i za pretpostaviti je da deluju nezavisno. Međutim, poznato je da aktivnost oba ova proteina zavisi od sastava medijuma, samo na suprotan način – dok sa porastom koncentracije peptida u medijumu proteinazna aktivnost opada, aktivnost LcnB bakteriocina raste. Ovaj fenomen je tumačen kao posledica povećanja produkcije LcnB bakteriocina, polazeći od pretpostavke da veće zone inhibicije rasta u bakteriocinskim testovima potiču od većeg broja aktivnih molekula bakteriocina. Međutim, nije bilo jasno na koji način koncentracija peptida u medijumu dovodi do povećane produkcije bakteriocina, niti je sličan fenomen opisan u literaturi iako je primećen kod mnogih bakteriocina (Pérez 2016). Takođe, iako je *lcnB* gen kloniran i okarakterisan, sam protein nikada nije sekvenciran.

Uzimajući u obzir sve navedeno u ovom radu je prvo ispitan uticaj rastuće koncentracije peptida u medijumu na aktivnost promotora *lcnB* gena, u cilju otkrivanja da li date promene utiču na transkripciju *lcnB* gena. Promotor je kloniran i prebačen u posebni fuzioni vektor, razvijen za potrebe ekspresionih analiza u laktokokama (Uzelac 2014). Ovaj vektor, prvi ovakve vrste, sadrži reporter gen *lacZI*, determinantu rezistencije na hloramfenikol i polilinkerski region sa mestima sečenja nekolicine standardnih restrikcioni endonukleaza. Kloniranje promotora tačno ispred *lacZI* gena omogućava promotor-zavisnu sintezu  $\beta$ -galaktozidaze, enzima čija se aktivnost lako meri esejem u kojem nastaje obojeni proizvod. Detekcijom količine dobijenog produkta moguće je kvantifikovati aktivnost ispitivanog promotora.

Kloniranjem promotora ispred *lacZ1* dobijen je konstrukt koji je zatim transformisan u MG7284, laktokokalni soj koji ne poseduje ni bakteriocinske niti proteinazne gene. Ovakav transformant je zatim podvrgnut rastu u medijumima sa različitim koncentracijama kazitona. Rezultati su bili iznenađujući jer se ispostavilo da sa porastom koncentracije peptida u medijumu, ekspresija *lacZ1* opada i to nekoliko puta. Najviši nivo ekspresije detektovan je kada su bakterije gajene u medijumu sa minimalnim procentom (0,5%) kazitona, dok je sa svakim sledećim medijumom u kojem je koncentracija kazitona bila viša, aktivnost promotora bila niža. Ovo opadanje je kontinuirano uočavano sve dok u medijumu sa 5% kazitona aktivnost promotora nije bila oko tri puta manja od početne. Dalji porast koncentracije kazitona u medijumu nije imao uticaja na aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze već je ona ostajala na prethodno detektovanom, minimalnom nivou.

Drugim rečima, ispostavilo se da se ekspresija bakteriocina LcnB snižava u medijumima sa višom koncentracijom peptida. Ovo otkriće je kontradiktorno sa rezultatima u kojima je bakteriocinskim testovima pokazano da dolazi do povećanja zone inhibicije pri rastu bakterija u bogatijim medijumima. Upoređivanjem ovih rezultata konstatovano je da sa porastom koncentracije peptida u medijumu za rast, manje molekula bakteriocina biva sintetisano, ali im je antimikrobna aktivnost veća. Nasuprot raširenom uverenju, pretpostavljeno je da uočena promena u veličini zona inhibicije rasta nije posledica samo promene u broju aktivnih molekula bakteriocina, već i promene u aktivnosti samih molekula. Pošto detektovani porast u bakteriocinskoj aktivnosti nije posledica povišene genske ekspresije *lcnB* gena, (ekspresija se snižava), pretpostavljeno je da dolazi do nekakve obrade samih molekula bakteriocina *in vivo*, koja im menja efikasnost. Ova modifikacija je morala biti povezana sa koncentracijom peptida u medijumu i mora biti izuzetno značajna s obzirom da njen efekat nadoknađuje i čak prevazilazi smanjenje ekspresije LcnB bakteriocina.

Upoređivanjem efekta koje koncentracija peptida ima na aktivnost proteinaze i bakteriocina, uočeno je da snižavanje ekspresije proteinaze koincidira sa povišenom aktivnošću LcnB bakteriocina i obrnuto. Stoga je postavljena hipoteza da proteinaza PrtP, kada je prisutna, hidrolizuje bakteriocin LcnB, a da zapravo odsustvo te hidrolize rezultuje većom efikasnošću bakteriocina.

U prilog ovoj hipotezi idu dve činjenice: (1) LcnB bakteriocin je protein i kao takav podložan je delovanju različitih proteinaza, što je i potvrđeno za proteinazu K, pronazu E, pepsin, tripsin i himotripsin (Miladinov et al. 2001; Gajic et al. 1999) i (2) PrtP proteinaza je enzim široke specifičnosti. Pokazano je da njenim delovanjem na  $\beta$ -kazein nastaje bar 100 različitih peptida (Juillard et al. 1995).

Da bi se ispitala ova hipoteza upotrebljena su tri pristupa: (1) konstrukcija mutanta kojem je inaktivirana proteinaza i ispitivanje njegove bakteriocinske aktivnosti, (2) poređenje efekta eksterno dodate proteinaze u uzorke bakteriocina dobijene iz mutanta i iz originalnog soja i (3) izolacija i detekcija mase bakteriocina LcnB iz originalnog BGMN1-501 soja.

Prvo su napravljeni monogeniski mutanti ishodnog soja BGMN1-501 kojima su inaktivirani geni od interesa (PrtP<sup>-</sup> mutant i LcnB<sup>-</sup> mutant). U te svrhe korišćen je pG<sup>+</sup>host9 vektor, čija je sposobnost replikacije kompromitovana temperaturno senzitivnim replikativnim početkom. Homologom rekombinacijom između gena od interesa u vektoru i gena od interesa u genomu domaćina, došlo je do integracije celog vektora u *prtP* gen odnosno *lcnB* gen čime je izvršena njihova inaktivacija. Potvrda o inaktivaciji pomenutih gena došla je iz fenotipskih testova, ali i iz PFGE analize. Ova analiza nedvosmisleno je pokazala da se radi o derivatima originalnog soja, kao i da su se vektori kod mutanata ugradili na različitim mestima i to sa minimalnom udaljenošću od 35 kb. Na ovaj način isključena je hipotetička mogućnost polarnog efekta prema kojoj bi mutiranje jednog gena uticalo na ekspresiju drugog.

Zatim je simultano testirana bakteriocinska aktivnost BGMN1-501 i njegovog PrtP<sup>-</sup> mutanta nakon gajenja u medijumima sa različitim koncentracijama kazitona. Rezultati su pokazali da aktivnost BGMN1-501 kontinuirano raste sa porastom peptida u medijumu, kao što je i ranije pokazano, što se ogleda uvećanjem dijametra zona inhibicije od 3,2 mm do 5 mm (Slika 17). Međutim, aktivnost mutanta je bila ista u uzorku iz svakog medijuma, i pri tom veća od najveće zone kod originalnog soja (oko 6 mm). Ovi rezultati su pokazali dve važne osobine PrtP<sup>-</sup> mutanta:

(1) Bakteriocinska aktivnost je veća kod mutanta nego kod ishodnog soja, što znači da odsustvo PrtP proteinaze samo po sebi stimuliše aktivnost LcnB bakteriocina;

(2) Bakteriocinska aktivnost mutanta ne zavisi od koncentracije kazitona. Zone su bile istih veličina iako su uzorci poticali iz različitih medijuma, što znači da izostanak PrtP proteinaze dovodi do ukidanja zavisnosti bakteriocinske aktivnosti od ovog faktora.

S obzirom da je jedina razlika između mutanta i ishodnog soja u tome što mutant ne eksprimira PrtP proteinazu, očekivano je da ponašanje mutanta i originalnog soja bude isto kada su uslovi sredine takvi da ni ishodni soj ne eksprimira proteinazu. Ovo i jeste slučaj kada se uporede aktivnosti uzoraka iz oba soja iz medijuma sa 8% kazitona. Međutim, sa opadanjem koncentracije kazitona u medijumu kod ishodnog soja dolazi do ekspresije PrtP, dok je to kod mutanta nemoguće. Istovremeno, kod ishodnog soja dolazi do smanjivanja aktivnosti bakteriocina, dok kod mutanta nema ekspresije proteinaze, što korespondira sa zadržavanjem visokog nivoa aktivnosti LcnB bakteriocina. Dobijeni rezultati ukazuju da veza bakteriocinske aktivnosti i koncentracije kazitona u medijumu za rast nije direktna već posredna i da predstavlja posledicu prisustva ili odsustva proteinaze PrtP, koja je direktno spregnuta sa koncentracijom kazitona.

Ovi rezultati potvrđuju hipotezu da LcnB bakteriocin jeste supstrat za PrtP proteinazu. Varijabilna ekspresija proteinaze uslovljava prisustvo hidrolizovanog ili nehidrolizovanog bakteriocina, što objašnjava zašto je aktivnost LcnB veća kada je ekspresija PrtP proteinaze utišana visokom koncentracijom kazitona kod BGMN1-501 ili onemogućena disrupcijom gena kod PrtP<sup>-</sup> mutanta. S druge strane, smanjivanje koncentracije kazitona u medijumu za rast dovodi do ekspresije proteinaze koja hidrolizom LcnB bakteriocina uzrokuje smanjene zona inhibicije rasta.

Međutim iz ovog eksperimenta nije jasno da li je hidroliza LcnB bakteriocina koju vrši PrtP proteinaza potpuna ili delimična, jer i ekspresija *lcnB* gena, kao što je pokazano, varira u datim uslovima. Uočene su dve mogućnosti – da proteinaza hidrolizom potpuno inaktivira bakteriocin, a da je za aktivnost koja se uočava u tim uslovima odgovorna povišena ekspresija laktokokcinskog gena; – ili da se hidrolizom LcnB bakteriocina njegova aktivnost smanjuje, ali nepotpuno, te da su za uočenu aktivnost, osim povišene ekspresije gena, odgovorni i zaostajući, hidrolizovani molekuli bakteriocina.

Kako bi se ispitalo prethodno navedeno, paralelno je testiran efekat ekstrakta PrtP proteinaze na aktivnosti bakteriocinskih ekstrakata dobijenih iz mutanta i iz ishodnog soja. Mešanje ovih ekstrakata je pokazalo da eksterno dodata proteinaza smanjuje, ali ne potpuno, aktivnost bakteriocina iz mutanta, dok aktivnost bakteriocina iz originalnog soja ostaje nepromenjena (Slika 18), što govori u prilog pretpostavci da PrtP proteinaza delimično inaktivira LcnB bakteriocin. U situaciji kada se kao početni materijal koristi LcnB bakteriocin izolovan iz mutanta, takav bakteriocin je u svojoj ishodnoj formi jer usled nedostatka proteinaze nije proteolitički obrađen. Takav LcnB bakteriocin pre tretmana daje vidljivo veću zonu (4 mm) od bakteriocina izolovanog iz originalnog soja (2,2 mm). Međutim, kada se takvom bakteriocinu naknadno doda proteinazni ekstrakt, dolazi do smanjivanja njegove antimikrobne sposobnosti. To smanjivanje nije potpuno, već aktivnost ovako tretiranog bakteriocina iz mutanta opada na nivo aktivnosti bakteriocina iz originalnog soja (2 mm). Ovim je pokazano da PrtP proteinaza nije u stanju da potpuno inaktivira LcnB bakteriocin, jer nakon digestije u rastvoru ostaju molekuli smanjene, ali vidljive aktivnosti, čak i ako se vreme tretmana produži. Zaključak o delimičnoj inaktivaciji je potvrđen i time što se aktivnost LcnB bakteriocina izolovanog iz originalnog soja ne smanjuje dodavanjem proteinaznog ekstrakta. Ovaj bakteriocin je već obrađen od strane sopstvene proteinaze i njegova dalja digestija nije moguća pa aktivnost ostaje na istom nivou i posle tretiranja ekstraktom proteinaze.

Konačna potvrda hipoteze kao i utvrđivanje mesta sečenja dobijeni su masenom spektrometrijom uzorka prečišćenog bakteriocina. Ovaj pristup je odabran zato što ukazuje na peptidnu vezu koja je meta proteolitičke obrade, ukoliko do iste dolazi. Naime, s obzirom da je sekvenca bakteriocina potpuno poznata, samim tim poznata je i njegova masa – 5322 Da. Hidrolizovan bakteriocin mora imati manju masu, a promena makar i u jednoj aminokiselini je dovoljna da bude uočena masenom spektrometrijom. Bakteriocin je izolovan iz kulture ishodnog soja BGMN1-501 koji je gajen u medijumu sa niskom koncentracijom peptida, kako bi se indukovala ekspresija PrtP proteinaze. Bakteriocin je iz takve kulture izolovan i prečišćen amonijum sulfatnom precipitacijom i reverzno-faznom hromatografijom, a potom analiziran masenim spektrometrom. Molekulska masa bakteriocina iznosila je 4601 Da, odnosno 721 Da manje od mase predviđene aminokiselinskom sekvencom, što je dokaz da LcnB bakteriocin zaista biva proteolitički obrađen *in vivo*. Smanjenje molekulske mase samo po sebi ne može da odgovori na pitanje gde dolazi do hidrolize LcnB bakteriocina. Međutim, s obzirom da svaka

aminokiselina ima svoju specifičnu težinu, kao i da se na krajevima lanca nalaze različite aminokiseline, razlika u masi omogućila je tačno utvrđivanje mesta sečenja. Izračunate su mase svih hipotetičkih formi bakteriocina koje mogu nastati uklanjanjem ostataka sa krajeva lanca i nađena je forma koja potpuno odgovara detektovanoj masi. To je forma u kojoj je iz celokupne sekvence LcnB bakteriocina uklonjeno šest aminokiselina sa N terminusa.

S obzirom da je u pitanju bio bakteriocin iz ishodnog soja, ovaj rezultat potvrđuje polaznu pretpostavku da molekuli LcnB bakteriocina u slučaju rasta kulture u uslovima niske koncentracije peptida u medijumu bivaju obrađeni od strane PrtP proteinaze.

Uzimajući u obzir sve navedeno, postavljen je model regulacije ekspresije *lcnB* gena i interakcije bakteriocina, proteinaze i spoljašnje sredine. Prema ovom modelu, u uslovima kada je PrtP proteinaza odsutna sa površine ćelija dolazi do ekspresije neobrađenog i time potpuno aktivnog bakteriocina LcnB. Ovo se dešava u sredini bogatoj peptidima, u kojoj su uslovi za rast pogodni, ali kako za bakteriocin-produkujuće bakterije tako i za sve druge kompetirajuće vrste. S obzirom da su ovakvi molekuli izuzetno potentni, bakterije vrše njihovu ekspresiju uz minimalnu transkripciju *lcnB* gena. Kada se uslovi promene i dođe do nestašice peptida u spoljašnjoj sredini, dolazi do ekspresije PrtP proteinaze koja se aktivira na površini bakterijskih ćelija i odvaja u spoljašnju sredinu u cilju dobijanja malih peptida iz eventualno prisutnih velikih proteina. Tada dolazi i do digestije u medijumu prisutnih molekula LcnB bakteriocina. Ova digestija smanjuje aktivnost bakteriocina, ali oni i dalje mogu, u smanjenom obimu, vršiti svoju primarnu fiziološku ulogu – inhibiciju rasta kompetirajućih bakterija. S druge strane, ova aktivnost dovodi i do inicijalnog porasta koncentracije malih peptida u medijumu. Konačno, moguće je da uzrok višestrukog povećanja transkripcije *lcnB* gena do koje dolazi u ovakvim uslovima, upravo pad u aktivnosti LcnB bakteriocina.

Iako svi prikazani rezultati pokazuju da bakteriocin LcnB zaista podleže digestiji od strane proteinaze PrtP, ostaje nejasno da li je ova digestija fiziološka pojava ili je u pitanju sporedni efekat. Jedina slična pojava literaturi je opisana kod nekih Gram-pozitivnih bakterija koje koriste ekstraćelijske proteinaze kao zaštitu od aktivnosti bakteriocina. Međutim u opisanim slučajevima je reč o interakciji proteinaza iz jednih i bakteriocina iz drugih bakterija, a i navedeni primeri uključuju cisteinske proteinaze i metalopeptidaze kod patogenih vrsta enterokoka i stafilokoka (Nawrocki et al. 2014). Činjenica da digestija LcnB bakteriocina ne

dovodi do njegove potpune inaktivacije, kao i da je povezana sa transkripcijom *lcnB* gena ukazuje da je u pitanju smislen proces. Ipak, situacija u kojoj bakterije narušavaju sopstveni antimikrobni potencijal ostavlja prostor za debatu po ovom pitanju. S jedne strane poznato je da PrtP proteinaza ima široku specifičnost i da hidrolizuje veliki broj različitih veza unutar molekula kazeina, te je moguće da je hidroliza *LcnB* bakteriocina slučajnost. S druge strane pak treba istaći da je za PrtP proteinazu već pokazano da deluje i na proteine bakterije koja je proizvodi, prvenstveno na druge molekule PrtP proteinaze. Autokataliza PrtP je esencijalan proces u aktivaciji same proteinaze koja se u obliku proenzima sekretuje na površinu bakterijske ćelije. Osim aktivacije, ova autoproteoliza se nastavlja i kasnije, čime zapravo dolazi do odsecanja aktivnih molekula sa površine ćelija i njihovog prelaska u medijum, što se objašnjava olakšavanjem kontakta ovih enzima i proteina iz sredine. Međutim, pokazano je da ta autodigestija može voditi u potpunu degradaciju i gubitak proteolitičke aktivnosti kod nekih PrtP proteinaza (Laan & Konings 1991). Takođe, istaknuto je već da je proteinaza PrtP u stanju da degraduje autolizin *AcmA*, protein odgovoran za ćelijsku lizu. Buist i saradnici (1998) su pokazali da stepen i brzina autolize direktno zavise od specifičnosti, lokalizacije i količine PrtP proteinaze koju ćelije ekspimiraju. Štaviše, u ovom radu autori diskutuju o još potencijalnih ciljnih proteina za delovanje PrtP proteinaze, prisutnih u ćelijskom zidu bakterija, čijom hidrolizom PrtP utiče na stabilnost ćelijskog zida odnosno separaciju ćelija (Buist et al. 1998). Na kraju, pomenuto je i da kazeinolitička aktivnost PrtP proteinaze nadilazi potrebe domaćina, tj. da produkti njenog delovanja uglavnom ostaju neiskorišćeni u nutritivnom smislu. Sve navedeno implicira da fiziološka funkcija proteinaza prevazilazi onu koja se ogleda samo u omogućavanju digestije proteina.

Iz razmatranja ne treba izuzeti ni činjenicu da digestijom molekula *LcnB* bakteriocina nastaju peptidi od 6 aminokiselina i da se to dešava u trenucima kada bakterijske ćelije imaju snažnu potrebu za malim peptidima. Možda ova samo-digestija ima fiziološku ulogu neke vrste "prve pomoći" kada se bakterije nađu u siromašnoj sredini, a koja se uzima na uštrb dela antimikrobne aktivnosti.

S druge strane, na opisanu hidrolizu *LcnB* bakteriocina možda se može gledati i kao na svojevrsnu posttranslacionu obradu i regulaciju aktivnosti. Već je istaknuto da *LcnB* bakteriocin pripada klasi bakteriocina koji mogu služiti kao signalni molekuli u "quorum sensing"

komunikaciji između bakterija. Vrlo je moguće je da ovakva obrada od strane proteinaze utiče na ovu komunikaciju i ima neku funkciju u toj komunikaciji.

Konačno, *prtP* i *lcnB* geni lokalizovani su na istom plazmidu u BGMN1-501. Ova osobina daje osnovu za pretpostavku o njihovoj koevoluciji. Međutim, poznato je da postoje sojevi kod kojih su ovi geni lokalizovani na različitim plazmidima, kao i oni koji poseduju samo jedan od ova dva gena. Stoga su za ovakva razmatranja potrebni podaci o interakciji ovih proteina u drugim sojeva, kao i drugih proteinaza i bakteriocina.

Dobijeni rezultati značajno utiču na sliku o osetljivosti antimikrobnog potencijala bakteriocina. Što se tiče LcnB bakteriocina, njegov mehanizam delovanja je okarakterisan kao sličan onom kod bakteriocina LcnA, jer je pokazano da deluju na iste ciljane molekule u ćelijskoj membrani senzitivnih ćelija (man-PTS sistem). Međutim, LcnB bakteriocin ne deli homologiju sa LcnA na nivou aminokiselinske sekvence (Diep et al. 2007) i zato ovom bakteriocinu nisu definisani ni aktivni ni vezujući domen. Zbog toga ostaje nejasan način na koji se ovi molekuli vezuju za svoje receptore i vrše svoju funkciju, pa samim tim i način na koji terminalnih šest aminokiselina na N terminusu olakšava njihovo antimikrobno delovanje. Nesumnjivo, ovaj podatak će pomoći definisanju mehanizma delovanja ovog bakteriocina.

Opisani rezultati produbljuju naša fundamentalna znanja o analiziranim molekulima, njihovoj međusobnoj interakciji i interakciji sa spoljašnjom sredinom. Stečen je novi uvid u regulaciju ekspresije bakteriocina LcnB, kao i u regulaciju njegove aktivnosti na posttranslacionom nivou. Definisana je uticaj spoljašnje sredine na transkripciju ovog bakteriocina, kao i njegova interakcija sa proteinazom PrtP. Istovremeno, ova saznanja su značajna i sa stanovišta primene. S obzirom da nije neobično da se u procesima proizvodnje hrane koriste i Prt<sup>+</sup> i Bac<sup>+</sup> sojevi, a obe klase molekula su i osobine probiotičkih sojeva, ovo istraživanje ukazuje da njihova interakcija ne sme biti zanemarena kada se planiraju njihove finalne koncentracije i aktivnosti.

Konačno, iako je interakcija proteinaze i bakteriocina ovde opisana za PrtP proteinazu i LcnB bakteriocin soja *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501, sasvim je opravdano pretpostaviti da slični mehanizmi postoje kod drugih bakteriocina i proteinaza. S obzirom da je moderna nauka



izuzetno zainteresovana za navedene klase molekula, dalje produbljivanje znanje o njima i njihovim interakcijama omogućice i njihovu vecu primenu.

## 6. ZAKLJUČCI

### 6.1. DIVERZITET PROTEINAZNIH GENA U MEZOFILNIM VRSTAMA LAKTOBACILA

1. Mezofilne vrste laktobacila poseduju proteolitičku aktivnost za kojusu odgovorne kako već opisane tako i nove, do sada neokarakterisane ekstraćelijske proteinaze;

2. Jaka proteolitička aktivnost *Lb. zae* LMG17315, izražena prema pet najprisutnijih proteina mleka najverovatnije potiče od većeg broja proteinaza, moguće tri, od kojih je katalitički domen nove, u ovom radu označene kao *prtP1* proteinaze, sekvenciran i deponovan. Osim ovog, u genomu LMG17315 su detektovani i *prtP*-sličan i *prtR*-sličan gen, ukazujući da ovi geni nisu svojstveni samo *Lb. casei/paracasei* odnosno *Lb. rhamnosus* vrstama već da su se proširili interspecijiski, najverovatnije posredstvom HGT-a;

3. *Lb. casei* ATCC393 verovatno poseduje samo jednu, PrtP1 proteinazu, što je uzrok razlika u proteolitičkoj aktivnosti između ovog soja i LMG17315. Iako se sve studije na ovim organizmima slažu da ATCC393 treba da bude reklasifikovan u vrstu *Lb. zae*, usled niza u fenotipskih i genotipskih razlika uočenih u ovom radu je zaključeno da ATCC393 treba smestiti u novi takson ili u podvrstuu okviru vrste *Lb. zae*;

4. U *Lb. plantarum*, sa izuzetkom soja LMG9208, nije detektovan nijedan od analiziranih proteinaznih gena, uprkos izraženoj proteolitičkoj aktivnosti sojeva. Iz ovoga se može se zaključiti da ova vrsta poseduje nov tip ekstraćelijske proteinaze koja se razlikuje od u ovom radu analiziranih, što je objašnjivo filogenetskom udaljenošću *Lb. plantarum* i *Lb. casei* grupe. Kod LMG9208 detektovan je *prtR*-sličan gen, čija je sekvenca za katalitički domen utvrđena i deponovana. Na osnovu analize sekvence takođe je zaključeno da se radi o novom genu.

## 6.2. UTICAJ PROTEINAZE PrtP NA AKTIVNOST BAKTERIOCINA LcnB

1. Bakteriocinska aktivnost *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501 raste sa povišavanjem koncentracije peptida u medijumu. Istovremeno, ekspresija bakteriocina višestruko opada. Iz ovoga se zaključuje da je aktivnost molekula bakteriocina LcnB promenljiva nakon njegovog sekretovanja u spoljašnju sredinu;

2. Inaktivacija PrtP proteinaze u BGMN1-501 je dovela do izraženog porasta u bakteriocinskoj aktivnosti ovog soja i do gubitka njene zavisnosti od sastava medijuma. Iz ovoga se može zaključiti da nedostatak PrtP proteinaze pogoduje bakteriocinskoj aktivnosti ovog soja;

3. Komplementiranjem PrtP proteinaze kod mutiranog soja, bakteriocinska aktivnost se snižava do istog nivoa koji ima i polazni soj. S obzirom da nije došlo do potpunog gubitka aktivnosti, zaključeno je da PrtP proteinaza hidrolizuje LcnB bakteriocin na način koji mu delimično narušava aktivnost;

4. Izolovanjem bakteriocina iz originalnog soja i analiziranjem njegove mase, uočena je razlika u odnosu na sekvencom predviđenu molekulsku masu bakteriocina. Analizom razlike u masama utvrđeno je da do hidrolize dolazi između šeste i sedme aminokiseline sa N terminusa što dovodi da smanjene antimikrobne aktivnosti.

## LITERATURA

- Agyei, D. et al., 2013. Bioanalytical evaluation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 313 cell-envelope proteinase extraction. *Chemical Engineering Science*, 95, pp.323–330.
- Agyei, D. et al., 2014. Quick and low cost immobilization of proteinases on polyesters: Comparison of lactobacilli cell-envelope proteinase and trypsin for protein degradation. *Journal of Biotechnology*, 188, pp.53–60.
- Agyei, D. & Danquah, M.K., 2011. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 29(3), pp.272–7.
- Alegría, A. et al., 2010. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1-2), pp.61–6.
- Barrangou, R. et al., 2011. Genus *Lactobacillus*. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition*. CRC Press, pp. 77–92.
- Bravo, J.A. et al., 2011. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), pp.16050–5.
- Breidt, F. et al., 2013. Fermented vegetables. In M. P. Doyle & R. L. Buchanan, eds. *Food Microbiology*. American Society of Microbiology, pp.841–855
- Broadbent, J.R. et al., 2012. Analysis of the *Lactobacillus casei* supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation. *BMC Genomics*, 13(1), p.533.
- Brown, J.D., 1997. A rapid, non-toxic protocol for sequence-ready plasmid DNA. *Technical Tips Online*, 2(1), pp.181–183.
- Bruinenberg, P.G., De Vos, W.M. & Siezen, R.J., 2000. Deletion of various carboxy-terminal domains of *Lactococcus lactis* SK11 proteinase: effects on activity, specificity, and stability of the truncated enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), pp.2859–2865.
- Bu, G. et al., 2013. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Science & Technology*, 93(3), pp.211–223.
- Buist, G., 1997. *AcmA of Lactococcus lactis, a cell-binding major autolysin*. PhD thesis.
- Buist, G., Venema, G. & Kok, J., 1998. Autolysis of *Lactococcus lactis* influenced by proteolysis. *Journal of Bacteriology*, 180(22), pp.5947–5953.

- Canchaya, C. et al., 2006. Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 11), pp.3185–96.
- Collins, B. et al., 2010. Applications of lactic acid bacteria - produced bacteriocins. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo, eds. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. John Wiley & Sons, pp. 89–110.
- Cotter, P.D. et al., 2013. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature reviews. Microbiology*, 11(2), pp.95–105.
- Dellaglio, F. et al., 2002. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 1), pp.285–7.
- Dicks, L.M. et al., 1996. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *International journal of systematic bacteriology*, 46(1), pp.337–40.
- Diep, D.B. et al., 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), pp.2384–9.
- Donia, M.S. et al., 2014. A systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics. *Cell*, 158(6), pp.1402–14.
- Exterkate, F.A. et al., 1993. Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), pp.3640–7.
- Frias, J. et al., 2008. Fermented soyabean products as hypoallergenic food. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(OCE), p.E39.
- Gajic, O. et al., 1999. Characterization of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, a strain producing two bacteriocins, cell wall-associated proteinase and showing clumping phenotype. *Archives of Biological Sciences (Yugoslavia)*.
- Gasson, M.J., 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology*, 154(1), pp.1–9.
- Genay, M. et al., 2009. prtH2, not prtH, is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), pp.3238–49.
- Gerritsen, J. et al., 2011. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & Nutrition*, 6(3), pp.209–40.

- Gilbert, C. et al., 1996. A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 178(11), pp.3059–65.
- Graver, M.A. & Wade, J.J., 2011. The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10, p.8.
- Griffiths, M.W. & Tellez, A.M., 2013. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Frontiers in Microbiology*, 4, p.30.
- Guédon, E. et al., 2001. Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 40(5), pp.1227–39.
- Haandrikman, A.J. et al., 1991. Processing of the lactococcal extracellular serine proteinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(7), pp.1899–904.
- Hammes, C. & Hertel, W., 2009. Genus *Lactobacillus*. In W. de Vos et al., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media, pp. 465–511.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), pp.557–580.
- Hayes, M. et al., 2007. Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. *Biotechnology Journal*, 2(4), pp.435–49.
- Holck, A. & Naes, H., 1992. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. *Journal of General Microbiology*, 138(7), pp.1353–64.
- Holo, H. & Nes, I.F., 1989. High-Frequency Transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(12), pp.3119–23.
- Hopwood, D.A., 1985. *Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual*, The John Innes Foundation, Norwich.
- Hörmannspurger, G. et al., 2013. Lactocepine as a protective microbial structure in the context of IBD. *Gut microbes*, 4(2), pp.152–7.
- Hu, W. et al., 2009. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. *Journal of Dairy Science*, 92(8), pp.3907–14.

- Juillard, V. et al., 1995. The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes beta-casein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal of Bacteriology*, 177(12), pp.3472–8.
- Kankainen, M. et al., 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(40), pp.17193–8.
- Kaur, B. et al., 2013. Biomedical applications of fermenticin HV6b isolated from *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC10770. *BioMed Research International*, 2013(2), p.168438.
- Kleerebezem, M. et al., 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), pp.1990–5.
- Kojic, M. et al., 1991. Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), pp.1753–1757.
- Kojic, M. et al., 2006. Plasmid content and bacteriocin production by five strains of *Lactococcus lactis* isolated from semi-hard homemade cheese. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(11), pp.1110–20.
- Kok, J. et al., 1985. Cloning and expression of a *Streptococcus cremoris* proteinase in *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(1), pp.94–101.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A., 2007. Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), pp.829–43.
- Kunji, E.R.S. et al., 1998. Reconstruction of the proteolytic pathway for use of  $\beta$ -casein by *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 27(6), pp.1107–1118.
- Laan, H. & Konings, W.N., 1991. Autoproteolysis of the extracellular serine proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9), pp.2586–90.
- Law, J. et al., 1995. A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *Journal of Bacteriology*, 177(24), pp.7011–7018.
- Lemieux, L. & Simard, R.E., 1992. Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Le Lait*, 72(4), pp.335–385.

- De Lorenzo, V. et al., 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(11), pp.6568–72.
- Lozo, J. et al., 2004. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *Journal of Food Protection*, 67(12), pp.2727–34.
- Lozo, J., 2008. *Molekularna karakterizacija bakteriocina i agregacionih sposobnosti prirodnog izolata Lactobacillus paracasei subsp. paracasei BGSJ2-8. Doktorska disertacija.*
- Lyte, M., 2011. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 33(8), pp.574–81.
- Maguin, E. et al., 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178(3), pp.931–5.
- Maguin, E. et al., 1992. New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 174(17), pp.5633–8.
- Makarova, K. et al., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), pp.15611–6.
- Marugg, J.D. et al., 1995. Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: control of transcription initiation by specific dipeptides. *Journal of Bacteriology*, 177(11), pp.2982–9.
- Mierau, I. & Kleerebezem, M., 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), pp.705–17.
- Miladinov, M. et al., 2001. Characterisation of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29, a strain producing bacteriocin IS29 and cell wall-associated proteinase. *Archives of Biological Sciences*, 53(1-2).
- Miller, J.H., 1972. *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mills, C.K. & Lessel, E.F., 1973. *Lactobacterium zeae* Kuznetsov, a Later Subjective Synonym of *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen) Hansen and Lessel. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23(4), pp.430–432.
- Morton, J.T. et al., 2015. A large scale prediction of bacteriocin gene blocks suggests a wide functional spectrum for bacteriocins. *BMC Bioinformatics*, 16, p.381.



- Nawrocki, K.L. et al., 2014. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 3(4), pp.461–492.
- Nes, I. et al., 2015. Novel developments in bacteriocins from lactic acid bacteria. In F. Mozzi, R. Raya, & G. Vignolo, eds. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. John Wiley & Sons, pp.80–99.
- Nes, I. et al., 2013. Class II Non-Lantibiotic Bacteriocins. In A.J. Kastin, ed. *Handbook of Biologically Active Peptides*, Elsevier, pp.85-92
- Nunn, K.L. et al., 2015. Enhanced trapping of HIV-1 by human cervicovaginal mucus is associated with *Lactobacillus crispatus* -dominant microbiota. *mBio*, 6(5), pp.e01084–15.
- O’Sullivan, D.J. & Klaenhammer, T.R., 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), pp.2730–2733.
- Pandey, K.R. et al., 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics - a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), pp.7577–7587.
- Pascual, L.M. et al., 2008. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology*, 56(4), pp.397–402.
- Pastar, I. et al., 2003. Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), pp.5802–11.
- Paštar, I., 2003. *Molekularna analiza proteinaznog gena humanog izolata Lactobacillus rhamnosus BGT10*. Doktorska disertacija.
- Pederson, J.A. et al., 1999. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal of Bacteriology*, 181(15), pp.4592–7.
- Pérez, A.R., 2016. A review on some important factors affecting bacteriocin production by lactococci, lactobacilli and pediococci. *Current Biochemical Engineering*, 1(1).
- Pridmore, R.D. et al., 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), pp.2512–7.
- Ravel, J. et al., 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement\_1), pp.4680–4687.
- Rea, M.C. et al., 2011. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. In D. Drider & S. Rebuffat, eds., New York, NY: Springer New York.

- Reid, G., 2012. Microbiology: Categorize probiotics to speed research. *Nature*, 485(7399), p.446.
- Riley, M., 2009. Bacteriocins, Biology, Ecology, and Evolution. In *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, p. 4600.
- Savijoki, K. et al., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), pp.394–406.
- Von Schillde, M.A., et al., 2012. Lactocepin secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines. *Cell Host & Microbe*, 11(4), pp.387–96.
- Siezen, R.J., 1999. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1-4), pp.139–55.
- Siezen, R.J. et al., 2010. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environmental microbiology*, 12(3), pp.758–73.
- Da Silva Sabo, S. et al., 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, pp.527–536.
- Smit, G. et al., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), pp.591–610.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), pp.503–17.
- Statistical Yearbook FAO, 2013. search | FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations. , p.144.
- Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4), pp.331–345.
- Strahinic, I. et al., 2010. The presence of *prtP* proteinase gene in natural isolate *Lactobacillus plantarum* BGSJ3-18. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), pp.43–9.
- Tanous, C. et al., 2002. Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), pp.271–8.
- Teuber, M., 2009. Genus *Lactococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media, pp. 711–722.
- Tindal, B., 2008. The type strain of *Lactobacillus casei* is ATCC 393, ATCC 334 cannot serve as the type because it represents a different taxon, the name *Lactobacillus paracasei* and its

- subspecies names are not rejected and the revival of the name “*Lactobacillus zae*” contravenes Rules 51b (1) and (2) of the International Code of Nomenclature of Bacteria. Opinion 82. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 7), pp.1764–5.
- Toh, H. et al., 2013. Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. *PloS one*, 8(10), p.e75073.
- Uzelac, G., 2014. *Karakterizacija bakteriocina bakterija mlečne kiseline i mehanizmi delovanja na senzitivne ćelije*. Doktorska disertacija.
- Venema, K. et al., 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), pp.1041–8.
- Venema, K. et al., 1997. Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), pp.305–9.
- Versalovic, J.S.M. et al., 1994. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), pp.25–40.
- Villegas, J.M. et al., 2015. Characterization of the mature cell surface proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(10), pp.4277–86.
- Vos, P. et al., 1991. Engineering of the *Lactococcus lactis* serine proteinase by construction of hybrid enzymes. *Protein Engineering*, 4(4), pp.479–84.
- Von Wright, A., 2011. Genus *Lactococcus*. In S. Lahtinen et al., eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition*.
- Wright, V.A. & Axelsson, L., 2012. Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In S. Lahtinen et al., eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition*. CRC Press, pp. 1–16.
- Yang, E.J. & Chang, H.C., 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1-2), pp.56–63.

## BIOGRAFIJA AUTORA

**Goran N. Vukotić** je rođen 24.07.1986. godine u Beogradu, Republika Srbija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija upisao je 2005. godine, a diplomirao 09.07.2010. godine sa prosečnom ocenom 9,36 (devet trideset šest) u toku studija, i ocenom 10 (deset) na diplomskom radu „Obnavljanje funkcije nokautiranih gena u mutantima *Vibrio salmonicida*“.

Doktorske akademske studije na istom fakultetu upisao je školske 2010/11. godine, modul Molekularna biologija, podmodul Molekularna biologija prokariota. U zvanje istraživača saradnika prvi put je izabran 16.07.2012., a reizabran 26.05.2015. godine odlukama Izbornog veća Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

U periodu od 01.01.2011. angažovan je na projektu iz osnovnih istraživanja 173026 "Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu ". Od školske 2010/2011. godine, na Katedri za biohemiju i molekularnu biologiju Biološkog fakulteta, uključen je u praktični deo nastave na predmetima Dinamička biohemija i Osnovi biohemije i molekularne biologije.

Od 2010. godine Goran Vukotić je član Udruženja mikrobiologa Srbije, Srpskog biološkog društva, kao i Federation of European Microbiological Societies (FEMS). Do sada je objavio dva naučna rada kategorije **M21**, tri rada kategorije **M23**, jedno poglavlje u monografiji kategorije **M14** i imao osam saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima. Od maja 2015. godine član je Srpskog društva molekularnih biologa, u čijem je osnivanju učestvovao.

**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisani-a Goran Vukotić

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije M3009/2010

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom: PROTEINAZE MLEČNO-KISELINSKIH BAKTERIJA: DIVERZITET U MEZOFILNIM VRSTAMA LAKTOBACILA I UTICAJ NA AKTIVNOST BAKTERIOCINA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 4.4.2016.

**Potpis doktoranda**



\_\_\_\_\_

Prilog 2.

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE  
VERZIJE DOKTORSKE DISERTACIJE**

Ime i prezime autora Goran Vukotić

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije M3009/2010

Studijski program Molekularna biologija

Naslov doktorske disertacije PROTEINAZE MLEČNO-KISELINSKIH BAKTERIJA:  
DIVERZITET U MEZOFILNIM VRSTAMA LAKTOBACILA I UTICAJ NA AKTIVNOST  
BAKTERIOCINA

Mentori prof. dr Đorđe Fira; dr Milan Kojić

Potpisani/a Goran Vukotić

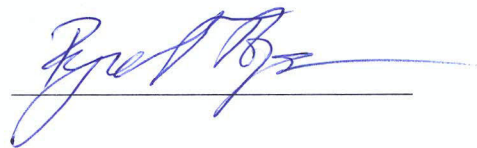
Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 4.4.2016.

**Potpis doktoranda**



### Prilog 3.

#### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

PROTEINAZE MLEČNO-KISELINSKIH BAKTERIJA: DIVERZITET U MEZOFILNIM VRSTAMA LAKTOBACILA I UTICAJ NA AKTIVNOST BAKTERIOCINA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na kraju).

U Beogradu, 4.4.2016

Potpis doktoranda



1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo** - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo** - nekomercijalno - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo** - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo** - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo** - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.



## Survey on Proteolytic Activity and Diversity of Proteinase Genes in Mesophilic Lactobacilli<sup>1</sup>

G. Vukotić<sup>a, b</sup>, I. Strahinić<sup>a</sup>, J. Begović<sup>a</sup>, J. Lukić<sup>a</sup>, M. Kojić<sup>a</sup>, and D. Fira<sup>b, 2</sup>

<sup>a</sup>Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444/a, P.O. Box 23, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>b</sup>University of Belgrade, Faculty of Biology, Studentski trg 16, 11000 Belgrade, Serbia

Received March 4, 2015

**Abstract**—Lactocepins or CEPs are large cell wall bound extracellular proteinases of lactic acid bacteria, involved in protein breakdown and utilization. They are responsible for many health-promoting traits of food products fermented with these organisms, but also essential for probiotic effects of certain strains. Different mesophilic strains selected within the species *Lactobacillus zeae*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, and *Lb. plantarum* were analyzed for their proteolytic activity towards main fractions of milk proteins—caseins and whey proteins. The strains showing excellent proteolytic features were further examined for presence of corresponding proteinase gene(s). It was found that *Lb. zeae* LMG17315 possessed catalytic domains of three distinct proteinase genes, unique feature in *Lb. casei* group, which are similar but not identical to previously characterized *prtP* and *prtR* genes. *Lb. casei* neotype strain ATCC393 was also analysed and based on obtained results its reclassification in taxon *Lb. zeae* is supported. In addition, we report catalytic domain of *prtR*-type gene in *Lb. plantarum* LMG9208, which is first such report in this species, and it is first time that this gene is reported outside *Lb. casei* group.

**Keywords:** *Lactobacillus*, proteinases, casein, *prtP*, *prtR*

**DOI:** 10.1134/S002626171601015X

Lactobacilli are major group of lactic acid bacteria (LAB), essential for industrial production of different fermented milk products. Considering that the most important features for application of LAB in dairy industry are implications of effects of their proteolytic system on milk proteins during fermentation, potential of strains with new characteristics in food industry is undoubted. Besides having crucial role in ripening and flavour formation of cheeses and other milk products, microbial proteolysis of milk proteins can generate bioactive peptides with immunomodulatory, antihypertensive, antithrombotic, antioxidative, antimicrobial, and other health-promoting properties (Hayes et al., 2007; D'Arienzo et al., 2011; Wakai and Yamamoto, 2012). In addition, besides many different health-promoting benefits accompanying the application of mesophilic lactobacilli in dairy industry, new discoveries are addressing these LAB and their proteolytic system in a different manner. Recently it was shown that in experimental model of gastrointestinal inflammation in mice, oral treatment with *Lb. casei* cells led to the reduction of inflammation and amelioration of illness, exclusively due to secretion of PrtP proteinase, which degrades lymphocyte-recruiting

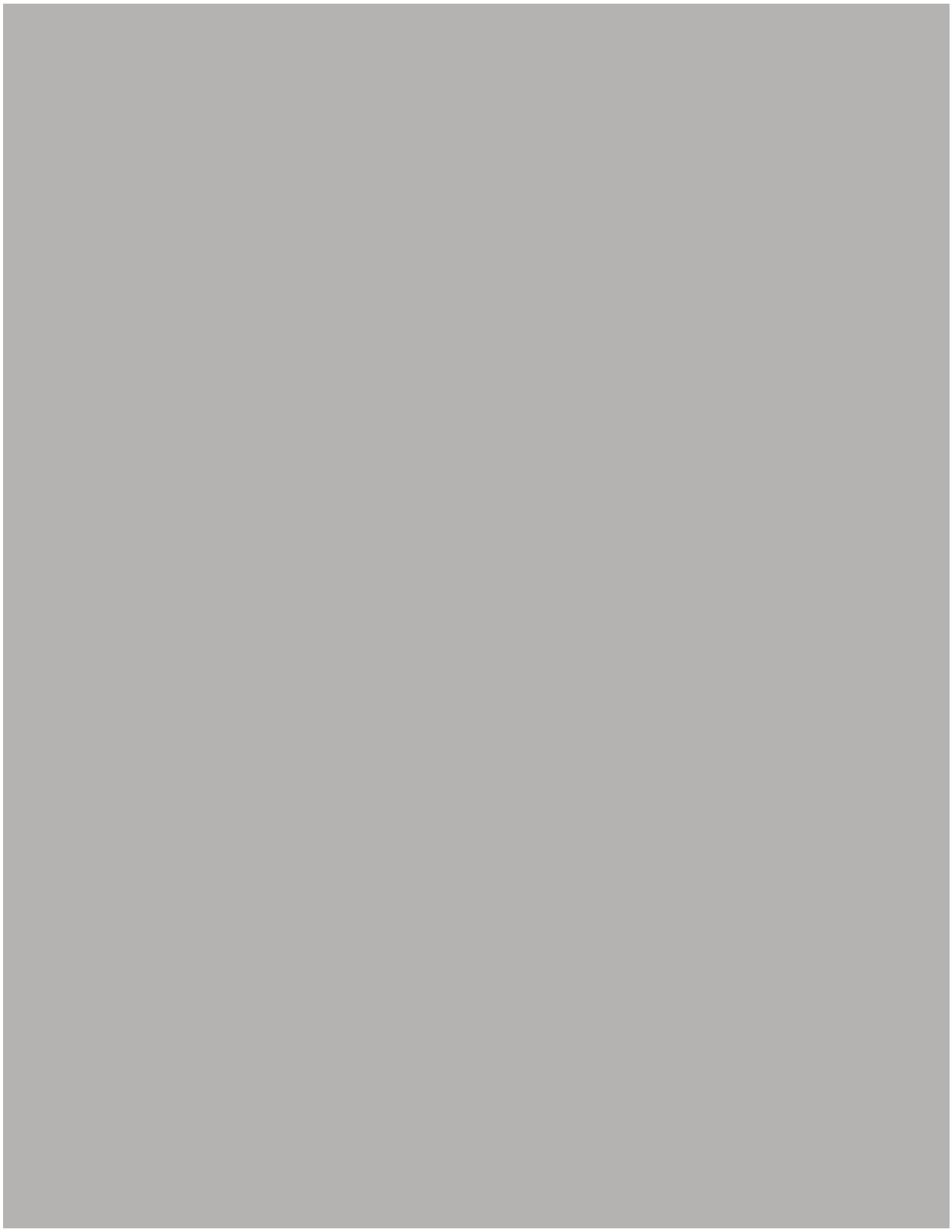
chemokine IP-10 (von Schilde et al., 2012). This finding alone puts proteinases of *Lb. casei* group in the centre of future therapies for number of chemokine-mediated diseases such as inflammatory bowel diseases (IBD). All these properties make proteolytic systems of mesophilic lactobacilli interesting both for fundamental and applied research.

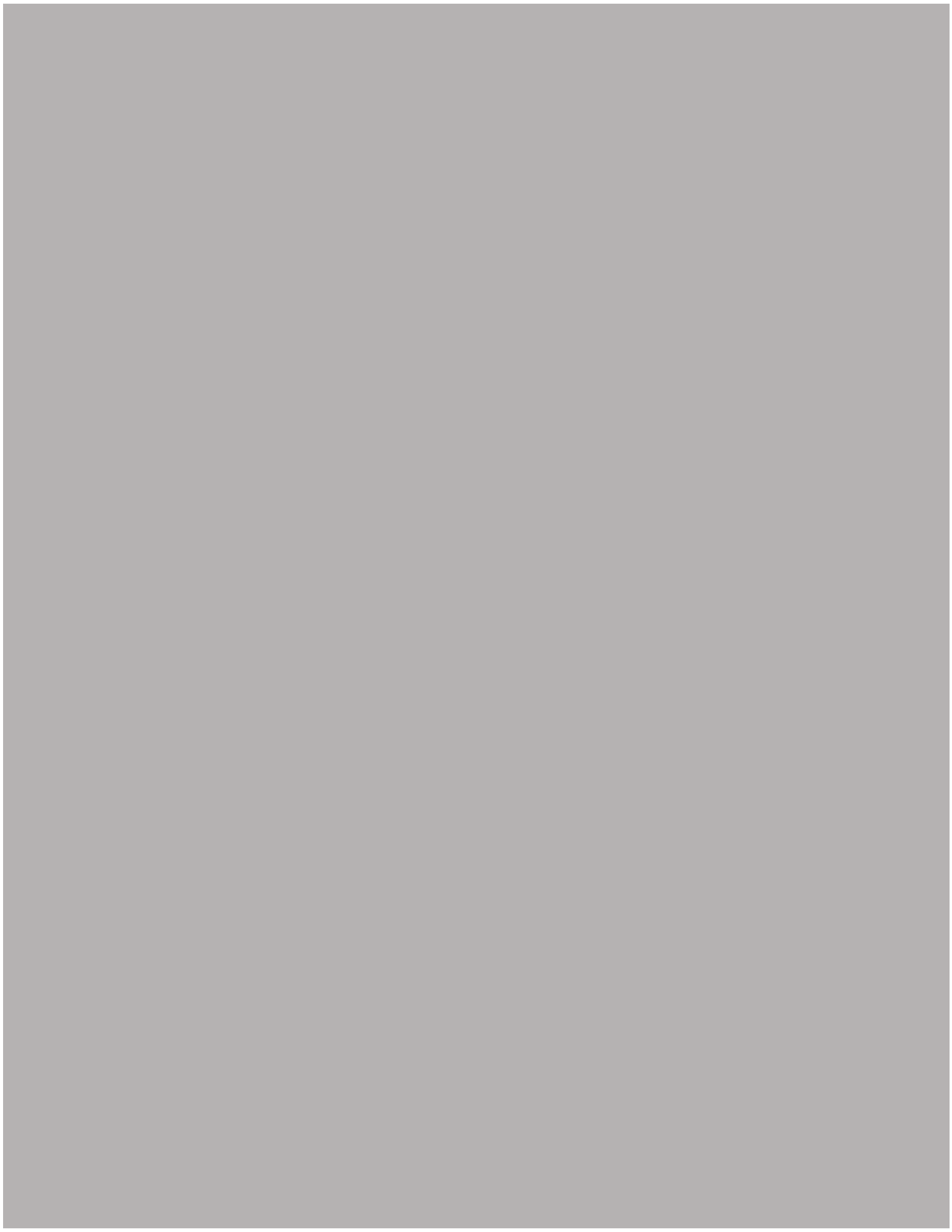
Due to many amino acid auxotrophies, lactobacilli depend on extracellular source of peptides and amino acids. The main way for providing peptides from protein rich medium like milk is existence of complex proteolytic system, composed of different extracellular proteinases, peptide and amino acid transporters, and intracellular peptidases. Primary enzymes in that system, required for first steps in large polypeptide utilization, are subtilisine-like serine proteinases, or lactocepins. Those enzymes are large cell wall-bound proteins (~200 kDa) with multi-domain structure and fine diversity in substrate specificity among different LAB species (Savijoki et al., 2006; Kojic et al., 1995).

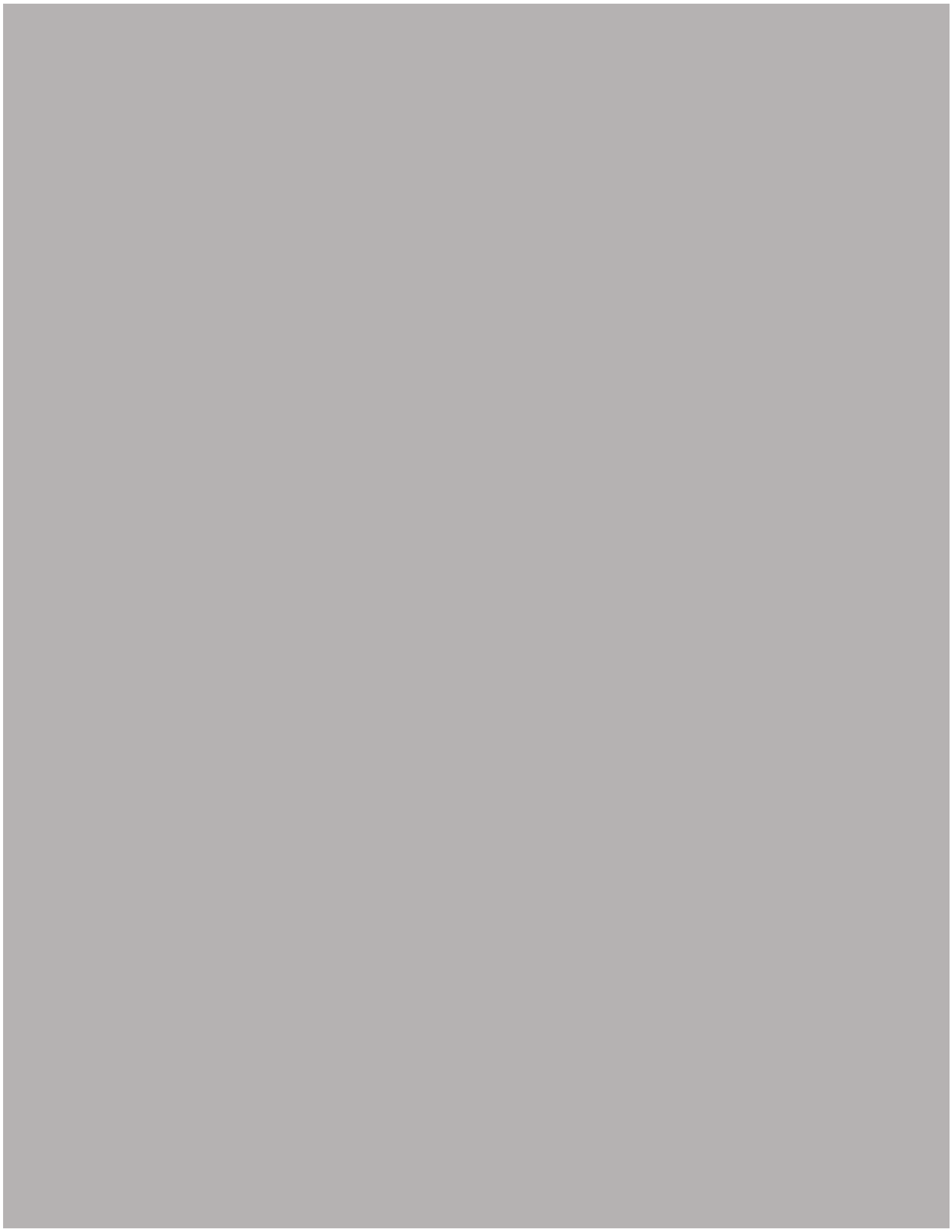
Mechanism of main milk protein—casein breakdown and utilization by LAB had been elucidated mainly by studying proteinase PrtP from *Lactococcus lactis*, which functional *prtP* gene was firstly cloned and described (Kok et al., 1985). Since the discovery that *Lb. paracasei* has almost the same *prtP* gene with more than 98% sequence identity (Kojic et al., 1991;

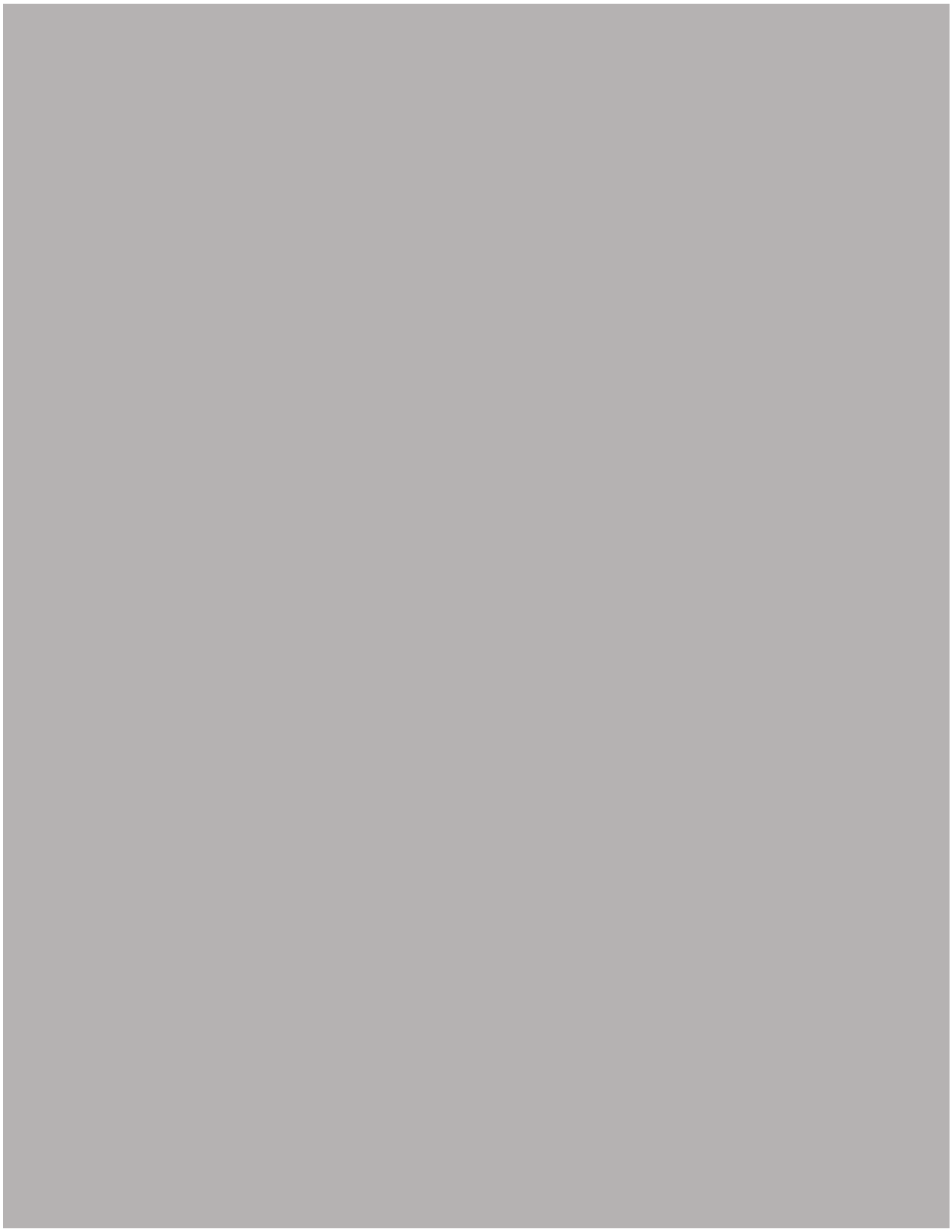
<sup>1</sup> The article is published in the original.

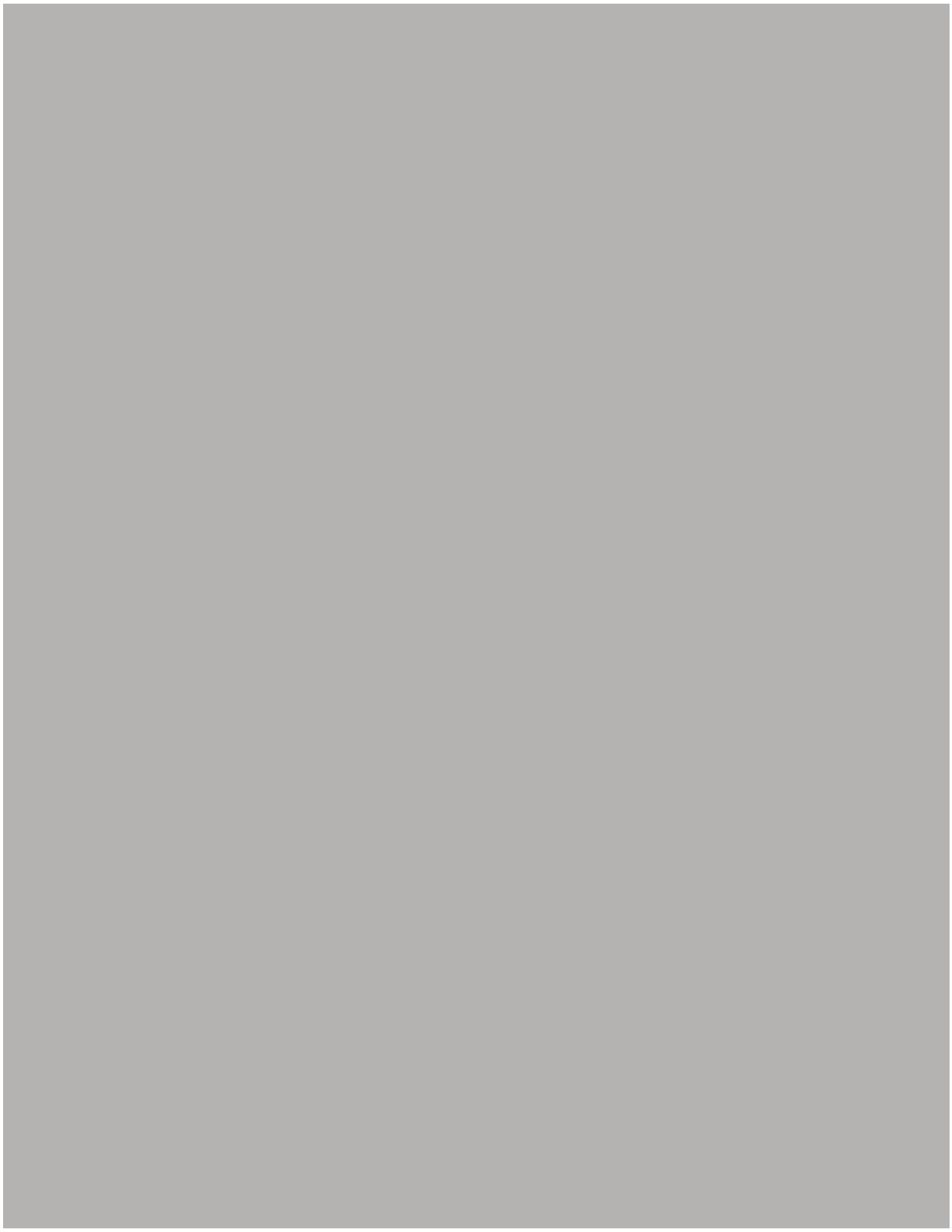
<sup>2</sup> Corresponding author (e-mail: fira@bio.bg.ac.rs).

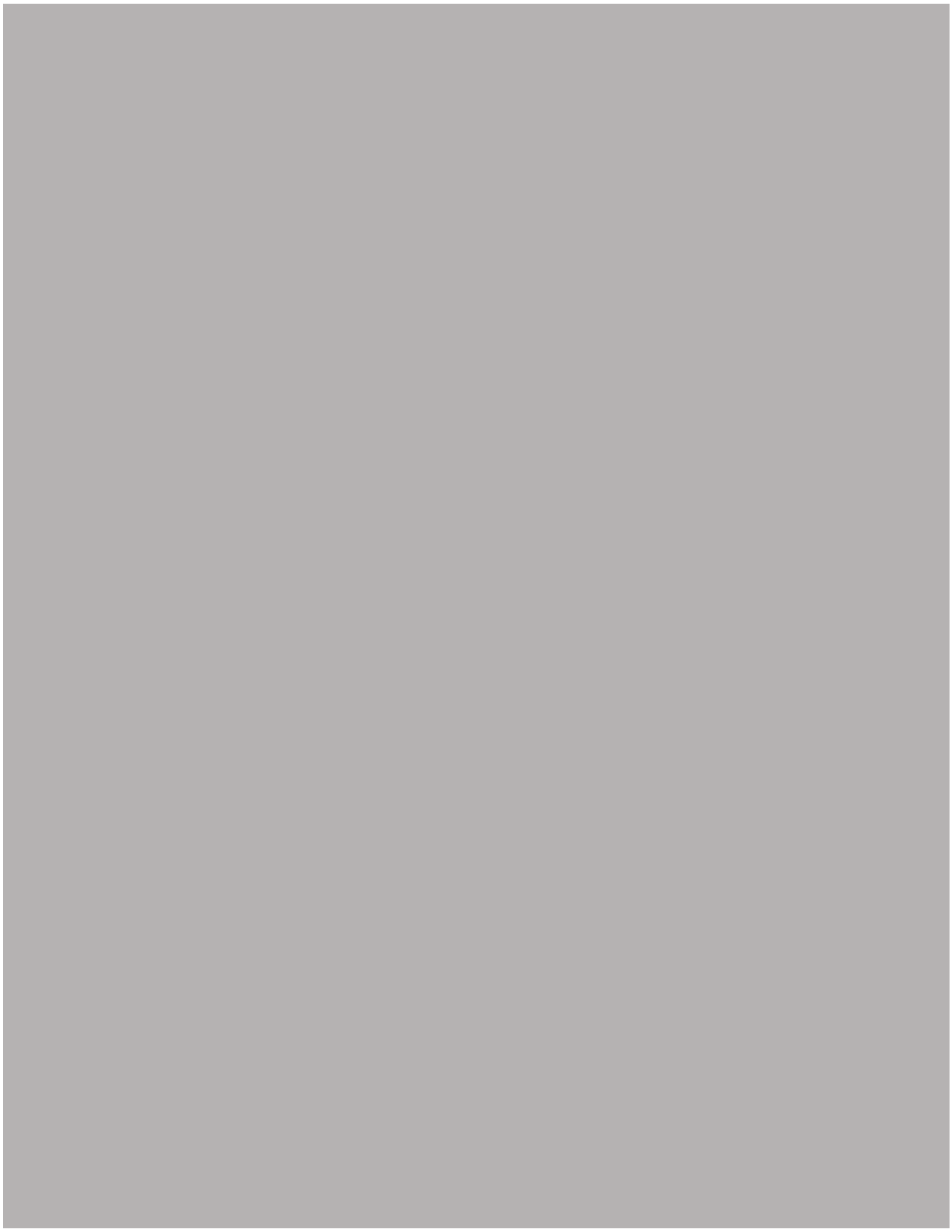


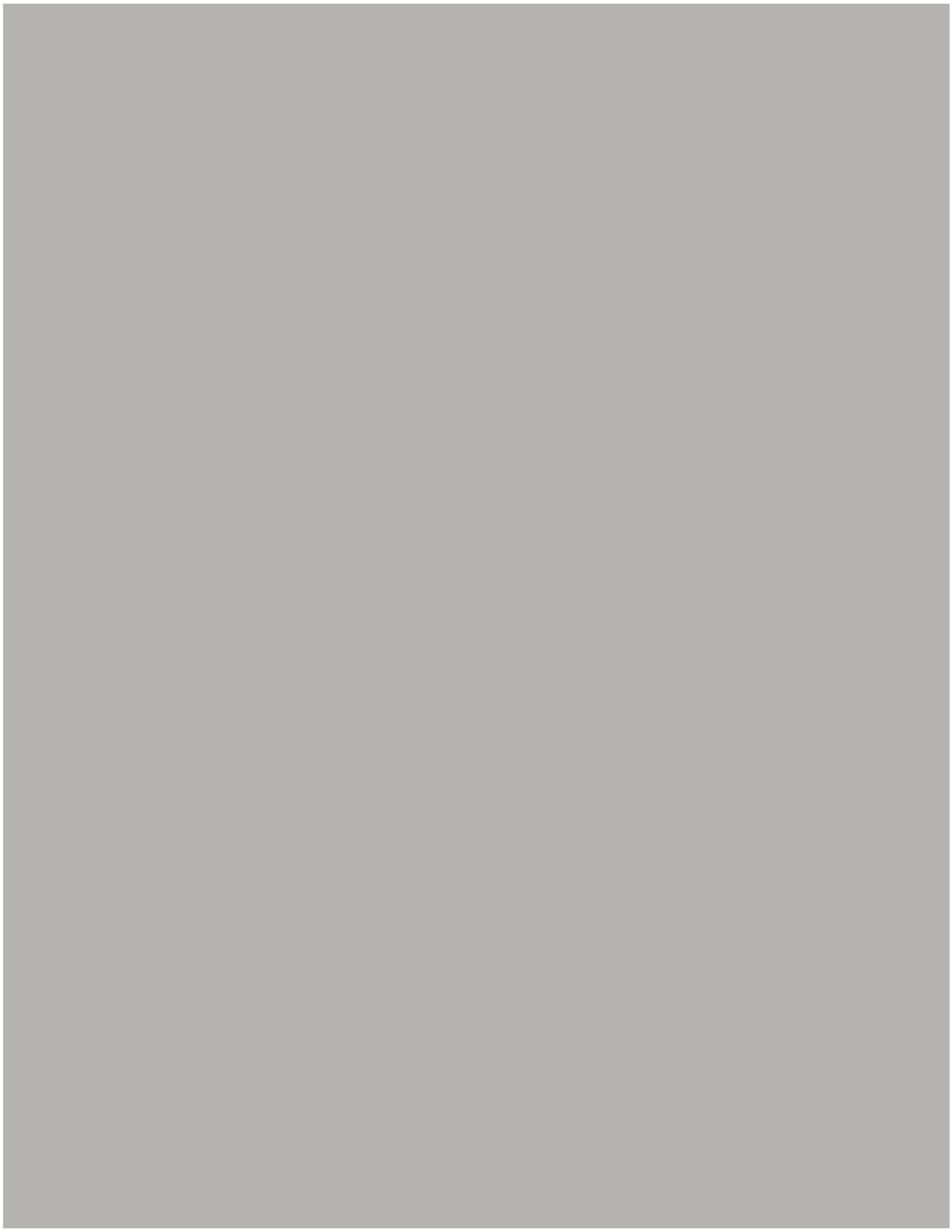




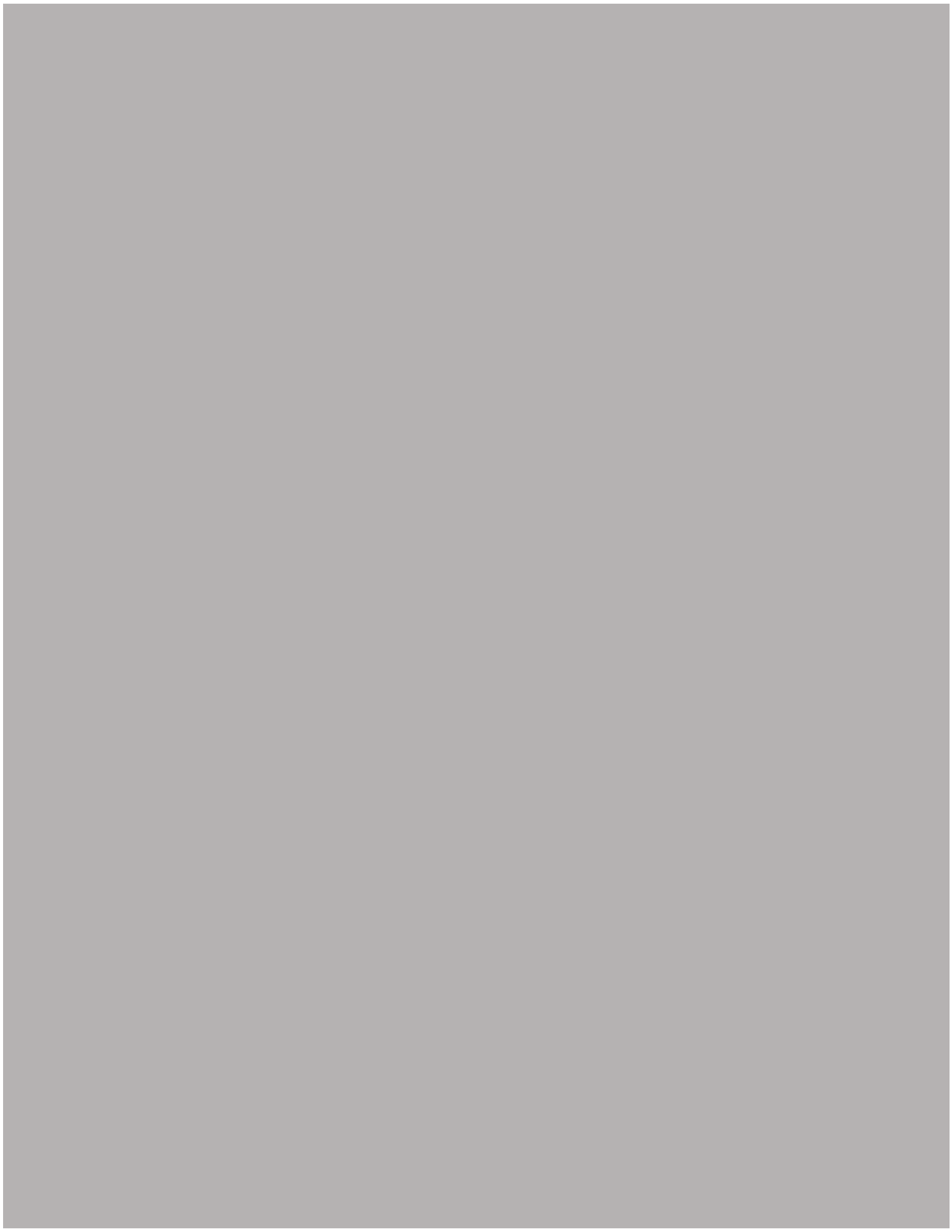














# Proteinase PrtP impairs lactococcin LcnB activity in *Lactococcus lactis* BGMN1-501: new insights into bacteriocin regulation

Goran Vukotic<sup>1,2†</sup>, Nemanja Mirkovic<sup>1,3†</sup>, Branko Jovcic<sup>1,2</sup>, Marija Miljkovic<sup>1</sup>, Ivana Strahinic<sup>1</sup>, Djordje Fira<sup>1,2</sup>, Zorica Radulovic<sup>3</sup> and Milan Kojic<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory for Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Chair of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> Department for Food Microbiology, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

## Edited by:

Javier Carballo, University of Vigo, Spain

## Reviewed by:

Qiaobin Xiao, University of Notre Dame, USA

Learn-Han Lee, Monash University Malaysia, Malaysia

## \*Correspondence:

Milan Kojic, Laboratory for Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, Belgrade 11010, Serbia  
e-mail: mkojic@imgge.bg.ac.rs

<sup>†</sup>These authors have contributed equally to this work.

Proteinases and bacteriocins are of great importance to the dairy industry, but their interactions have not been studied so far. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5 is a natural isolate from homemade semi-hard cheese which produces two bacteriocins (Lactococcin B and LsbB), as well as proteinase PrtP. A medium-dependent increase in the bacteriocin LcnB activity of *L. lactis* BGMN1-501, a derivative of *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, was shown to be accompanied by a decrease in its promoter activity. A similar effect of media components on gene expression was reported for proteinase PrtP, whose gene is co-localized on the same plasmid as the *lcnB* gene. Thus, the PrtP-LcnB interplay was investigated. Single gene knockout mutants were constructed with disrupted *prtP* or *lcnB* genes. PrtP<sup>-</sup> mutants showed higher bacteriocin activity that had lost its growth medium dependence, which was in contrast to the original strain. When LcnB from this mutant was combined with proteinase from the LcnB<sup>-</sup> mutant *in vitro*, its activity was rendered to the original level, suggesting that proteinase reduces bacteriocin activity. We propose a new model of medium dependent expression of these genes with regard to the effects of their interaction *in vivo*.

**Keywords:** lactococci, bacteriocin activity, LcnB, proteinase PrtP, digestion, medium dependent activity

## INTRODUCTION

*Lactococcus lactis* is the best characterized species of lactic acid bacteria (LAB) and one of the most studied and utilized Gram-positive bacteria. It is used as a starter culture for manufacturing a wide variety of fermented milk products, either as a single culture or in a mixture with other LAB. Its most important trait is the production of lactic acid and the acidification of milk, which is used in numerous ways in the production of fermented milk products. It leads to curdling of milk and at the same time prevents the growth of undesirable bacteria. Among other prominent and well-known features of lactococci is the production of proteolytic enzymes and a diverse array of bacteriocins (Lahtinen et al., 2012).

Proteinases, as part of a complex proteolytic system, confer on lactococci the ability to multiply quickly in milk, which is of great importance for the dairy industry. Furthermore, proteinases are involved in the development of organoleptic properties in fermented milk products and their activity may affect consumers' health, especially regarding the activity of peptides, which they release from milk proteins. Diverse bioactive peptides liberated by milk proteolysis have been described as having immunomodulatory, antioxidative, antihypertensive, and antimicrobial properties (Hayes et al., 2007). The occurrence and composition of bioactive peptides depend mainly on the substrate specificity of proteinases applied in food processing.

Numerous lactococci produce bacteriocins, ribosomally synthesized antimicrobial peptides, which can vary widely in structure

and mode of action. This diversity has led to the division of bacteriocins into several classes with multiple subclasses (Cotter, 2014). Bacteriocins are very important for colonization and survival in niches such as milk or cheese. In such highly competitive conditions they provide an advantage over closely related species, which are generally their main targets. Nevertheless, some bacteriocins are active against a wide variety of pathogens, either Gram-positive or Gram-negative, which is why they have been widely applied in food preservation and are very important in the search for new antibiotics. Besides these bactericidal effects, bacteriocins can also serve as signaling molecules, enabling bacterial communication, and coordination through quorum sensing. In addition, this bacteriocin-driven communication can also take place between different bacterial species (Calasso et al., 2013), as well as between host immune cells and colonizing bacteria (Meijerink and Wells, 2010; van Hemert et al., 2010).

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5 is a natural isolate from homemade semi-hard cheese which produces two potent bacteriocins [Lactococcin B (LcnB) and LsbB] and proteinase PrtP (Gajic et al., 1999). Its derivative, *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501, obtained by plasmid curing, retained genes for LcnB and proteinase PrtP, which colocalize on the same plasmid, pMN80 (Kojic et al., 2006). PrtP is a large (~200 kDa) extracellular enzyme that is attached to the cell wall at its C terminus, although autocatalytically truncated active molecules are abundant in the extracellular environment (Laan and Konings, 1989). LcnB is a small (~3 kDa),

hydrophobic, positively charged peptide with an antimicrobial spectrum limited to *Lactococcus* species (Venema et al., 1997). Its mode of action relies on binding to components of the mannose phosphotransferase system (man-PTS) of susceptible cells, causing leakage of cellular components across the membrane (Diep et al., 2007).

It has been observed previously that the activity of LcnB is affected by media peptide concentration. Peptide-rich media were proven to promote activity, while peptide-poor media minimize LcnB activity. This was reported in experiments with both chemically defined media (Gajic et al., 1999; Miladinov et al., 2001), and GM17 media (Venema et al., 1997)

In this research we focus on the interaction between proteinase PrtP and bacteriocin LcnB in BGMN1-501, given that, so far, no information exists on this matter. We explored the promoter activity of *lcnB* during growth in different casitone concentrations, and showed that expression of LcnB is silenced in a peptide rich environment, which is contrary to the prevailing belief. Moreover, we offer evidence of the digestion of LcnB by proteinase PrtP, which drastically, but not completely, reduces its activity. Bringing these facts together, we propose a model of *lcnB* regulation which sheds new light on the complex interaction between these proteins and their environment.

## MATERIALS AND METHODS

### BACTERIAL STRAINS AND PLASMIDS

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in **Tables 1** and **2**. Lactococcal strains were grown in M17 medium (Merck) supplemented with D-glucose (0.5% w/v; GM17) at 30°C, unless otherwise noted. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and EC101, used for cloning and propagation of constructs, were grown in Lauria-Bertani (LB) broth (Miller, 1972) aerobically at 37°C. Agar

plates were made by adding 1.5% (w/v) agar (Torlak Belgrade, Serbia) to the liquid media. Transformants of lactococci were selected on GM17 plates containing 10  $\mu$ g/ml of erythromycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Germany) or 7.5  $\mu$ g/ml of chloramphenicol in the final concentration. *E. coli* transformants were selected on LB plates containing 300  $\mu$ g/ml of erythromycin, 35  $\mu$ g/ml of chloramphenicol, or 100  $\mu$ g/ml of ampicillin, depending on the plasmids used. When necessary, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside (X-gal; Fermentas, Vilnius, Lithuania) was added to LB or GM17 medium plates at a final concentration of 50  $\mu$ g/ml for blue/white screening of colonies carrying vectors with clones.

### BACTERIOICIN ACTIVITY ASSAY

The bacteriocin activity of *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501, recombinant strains and mutants was evaluated by an agar-well diffusion test (Lozo et al., 2004). Tested strains were grown in GM17 medium with different concentrations of casitone (0.5%, 1%, 2%, 4%, 6%, and 8%; Difco Laboratories, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). The cell-free supernatants of tested strains were obtained by centrifugation (13000 rpm for 10 min) of 16-h overnight culture and subsequent filtration through a 0.45  $\mu$ m filter to obtain LcnB extracts. *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-596 was used as an indicator strain. Clear zones of inhibition around the wells were used as positive signals for bacteriocin production.

### PROTEINASE ACTIVITY ASSAY

For proteinase activity analysis of the obtained mutants, the method described by Kojic et al. (1991) was used. Cells were induced by growing on milk-citrate-agar (MCA) plates [containing 4.4% reconstituted milk, 0.8% Na-citrate, 0.1% yeast

**Table 1 | Bacterial strains used in this study.**

Strains	Relevant characteristic(s)	Source or reference
<b><i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i></b>		
BGMN1-501	Derivate of BGMN1-5 with pMN80 plasmid, LcnB <sup>+</sup> , PrtP <sup>+</sup> , LcnB <sup>f</sup>	Kojic et al. (2006)
BGMN1-596	Plasmid free derivate of BGMN1-5, LcnB <sup>-</sup> , PrtP <sup>-</sup> , LcnB <sup>s</sup>	Kojic et al. (2006)
BGMN1-501/pG <sup>+</sup> host9prtP	PrtP <sup>-</sup> , LcnB <sup>+</sup> , LcnB <sup>f</sup>	This work
BGMN1-501/pG <sup>+</sup> host9lcnB	PrtP <sup>+</sup> , LcnB <sup>-</sup> , LcnB <sup>f</sup>	This work
<b><i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i></b>		
NCDO712	PrtP <sup>+</sup> , Lac <sup>+</sup>	Gasson (1983)
MG7284	Plasmid free derivative of NCDO712, PrtP <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup>	Gasson (1983)
MG7284/pNZ8150lacZ1PlcnB		This work
MG7284/pNZ8150lacZ1		This work
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	$\Delta^{-}$ $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk <sup>-</sup> mk <sup>-</sup> ) supE44thi-1gyrA relA1	Hanahan (1983)
EC101	JM101 containing <i>repA</i> gene of pWV01 in chromosome	Law et al. (1995)
DH5 $\alpha$ /pGem-TeasyLcnB		This work
EC101/pG <sup>+</sup> host9prtP		This work
EC101/pG <sup>+</sup> host9lcnB		This work

**Table 2 | Plasmids used in this study.**

Plasmids	Relevant characteristic(s)	Source or reference
pG <sup>+</sup> host9	Em <sup>r</sup> , thermosensitive vector	Maguin et al. (1996)
pG <sup>+</sup> host9prtP	pG <sup>+</sup> host9 carrying fragment of <i>prtP</i> gene	This work
pG <sup>+</sup> host9lcnB	pG <sup>+</sup> host9 carrying whole <i>lcnB</i> gene	This work
Q6	M13mp10 with 1.1 kbp carrying fragment of <i>prtP</i> gene	Kojic et al. (1991)
pUT/Km	Mini-Tn5 <i>lacZ1</i>	de Lorenzo et al. (1990)
pBS <i>lacZ1</i>		This work
pNZ8150	<i>ScaI</i> site used for translational fusions, standard vector; Cm <sup>r</sup>	Mierau and Kleerebezem (2005)
pNZ8150 <i>lacZ1</i>		This work
pNZ8150 <i>lacZ1</i> P <i>lcnB</i>		This work
pGem-T-Easy	3015 bp; Amp <sup>r</sup> ; PCR cloning vector	Promega
pGem-T-easy <i>lcnB</i>	pGEM-T-easy carrying <i>lcnB</i> gene	This work
pGEM-T-easyP <i>lcnB</i>	pGEM-T-easy carrying <i>lcnB</i> promoter	This work
pBlueScript	2961 bp; Amp <sup>r</sup> ; PCR cloning vector	Stratagene

extract, 0.5% glucose, and 1.5% agar (w/v)] for 48 h at 30°C prior to collection. Collected fresh cells were resuspended in 0.1 mol/L sodium phosphate buffer (pH 7).  $\beta$ -casein (Sigma–Aldrich) was dissolved in the same buffer at 5 mg/ml final concentration. The cell suspension containing 10<sup>9</sup> cells per mL was mixed with  $\beta$ -casein solution at a 1:1 (v/v) ratio. After incubation for 4 h at 30°C, the cells were pelleted by centrifugation (13000 × *g*, 10 min), the clear supernatant fluid was taken off and samples were prepared for SDS-PAGE.

For *in vitro* testing of the proteinase's effect on bacteriocin activity, cell-free proteinase extract was prepared. Cells were grown on MCA plates, collected and re-suspended in 0.1 mol/L sodium phosphate buffer (pH 7), incubated at room temperature for 30 min, pelleted by centrifugation and supernatants were collected prior to reaction.

Samples for SDS-PAGE were mixed with sample loading buffer (0.125 mol/L TrisHCl, pH 6.8, 0.01 mmol/L EDTA, 4% SDS, 25% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, and 0.07% bromophenol blue) at a 1:1 ratio by volume. Before loading, samples were heated at 100°C for 5 min.

#### INTEGRATION OF PLASMID pG<sup>+</sup>HOST9 INTO pMN80

The plasmid pG<sup>+</sup>host9, a thermosensitive erythromycin-resistant derivative of the plasmid pWVO1 (Maguin et al., 1992), was used to construct the integrative vector for disrupting *prtP* and *lcnB* genes, located on plasmid pMN80 of *L. lactis* BGMN1-501. A 1.1 kbp fragment containing the DNA region coding for the active site of PrtP proteinase of *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2, necessary for inactivation based on homologous recombination, was obtained from M13-Q6 vector (Kojic et al., 1991) using *EcoRI* and *HindIII* restriction enzymes and then was cloned into pG<sup>+</sup>host9 to yield pG<sup>+</sup>host9prtP. A PCR fragment of 578 bp containing gene *lcnB* was cloned into commercial pGem-T-easy vector (Promega, Madison, WIS, USA) to yield pGem-T-easy*lcnB*, and subsequently cloned into pG<sup>+</sup>host9 vector digested with *EcoRI*, resulting in the construct pG<sup>+</sup>host9*lcnB*. Constructs pG<sup>+</sup>host9prtP and

pG<sup>+</sup>host9*lcnB* were used for transformation of BGMN1-501. Transformants obtained at 28°C were streaked onto fresh GM17 agar plates containing erythromycin (10  $\mu$ g/ml) and incubated at 37°C for 48 h to enable integration.

#### MOLECULAR TECHNIQUES

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used for clonal confirmation, as described by Kojic et al. (2005). Total DNA from lactococci was isolated by the modified methods described by Hopwood et al. (1985). The method used for mini-prep isolation of plasmid DNA from lactococci was described by O'sullivan and Klaenhammer (1993). For isolation of plasmid DNA from *E. coli*, a QIAprep Spin Miniprep Kit was used according to the manufacturer's recommendations (Qiagen, Hilden, Germany). All digestions with restriction enzymes were conducted according to the supplier's instructions (Fermentas, Lithuania). T4 DNA ligase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used for DNA ligation, according to the manufacturer's recommendation. Plasmid constructs were introduced into lactococci by electroporation using an Eporator (Eppendorf, Hamburg, Germany) using the methodology described by Holo and Nes (1989). The sets of specific primers used in this study are listed in Table 3. KapaTaq DNA polymerase (KapaBiosystem, Inc., Boston, MA, USA) was used to amplify DNA fragments by PCR using a GeneAmp PCR system 2700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). DNA fragments were purified from agarose gel using a QIAquick Gel extraction kit as described by the manufacturer (Qiagen). PCR products were purified with a QiaQuick PCR purification kit (Qiagen) according to the protocol of the supplier. Obtained and purified PCR products were sequenced by the MacroGen Sequencing Service (MacroGen, Netherlands) and analyzed by using the BLAST algorithm. Commercial p-Gem-T-Easy (Promega) vector was used for cloning PCR products.

#### PLASMID CONSTRUCTION

A transcription fusion vector for lactococci (named pNZ8150*lacZ1*) was constructed as follows. The *lacZ1* gene without promoter was

**Table 3 | Sequence of specific primers used in this study.**

Primer name	Sequence of primer	Template	Source or reference
LactABM-F	5'-gaagaggcaatcagtagag-3'	pMN80 plasmid DNA	Alegria et al. (2010)
LactB-R	5'-ccaggattttcttgatttacttc-3'	pMN80 plasmid DNA	Alegria et al. (2010)
PlcnB-FW	5'-ctgcagaggttataacattgtaacg-3'	pMN80 plasmid DNA	This work
PlcnB-REV	5'-gagctcgattttcataataatctcc-3'	pMN80 plasmid DNA	This work

removed from pUT/Km vector using *EcoRI-HindIII* restriction enzymes and cloned first into pBlueScript vector digested with the same enzymes, yielding the construct pBSlacZ1. From pBSlacZ1, the *lacZ1* gene was re-cloned into pNZ8150 vector (Mierau and Kleerebezem, 2005) using *PstI-HindIII* restriction enzymes, resulting in construct pNZ8150lacZ1. This vector contained restriction enzyme sites for cloning promoter fragments upstream of the *lacZ1* gene (*ScaI*, *PstI*, *EcoRI*, *SmaI*, and *BamHI*). The orientation and position of the *lacZ1* gene in pNZ8150lacZ1 was confirmed by sequencing in both orientations. The *lcnB* promoter region ( $P_{lcnB}$ ) was amplified using specific primers, PlcnB-FW and PlcnB-REV (Table 3), and cloned into pGEM-T-easy, yielding pGEM-T-easyPlcnB. The promoter region was removed from pGEM-T-easyPlcnB by *PstI* and *EcoRI* restriction enzymes and cloned into pNZ8150lacZ1 vector digested with the same enzymes, to yield construct pNZ8150lacZ1PlcnB. The activity of *lcnB* promoter in pNZ8150lacZ1PlcnB was confirmed by a  $\beta$ -galactosidase activity assay of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG7284 carrying pNZ8150lacZ1PlcnB ( $P_{lcnB}$  transcription fusion) and pNZ8150lacZ1 (negative control).

#### $\beta$ -GALACTOSIDASE ACTIVITY ASSAY

The activity of  $\beta$ -galactosidase was determined by assaying the degradation of ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG; Sigma–Aldrich) at 30°C using a modification of the method described by Miller (1972). Lactococcal cells from the logarithmic phase were harvested by centrifugation and resuspended in 500  $\mu$ l of PP buffer containing 4 mg of lysozyme per milliliter. Degradation of the cell wall was conducted for 30 min at 37°C. After that, cells were harvested by centrifugation (5 min at 5000  $\times$  g). Cell pellets were resuspended in 500  $\mu$ l of Z-buffer and the protocol was continued as described previously (Miller, 1972).

#### IN VITRO TESTING OF EFFECT OF PROTEINASE EXTRACT ON LcnB ACTIVITY

LcnB extracts from both BGMN1-501 and BGMN1-501/pG<sup>+</sup>host9prtP were incubated with proteinase extract from BGMN1-501/pG<sup>+</sup>host9lcnB (LcnB<sup>-</sup>, PrtP<sup>+</sup>). The extracts were mixed at a 1:1 ratio, and incubated at 30°C for 120 min. In parallel, LcnB extracts from both strains were incubated with NaPi buffer (0.1 mol/L, pH 7) at a 1:1 ratio at 37°C for 120 min, as a control. Proteinase PrtP's effect on LcnB activity was tested in the same conditions by using proteinase extract isolated from *L. lactis* subsp. *cremoris* NCDO712.

#### MEASUREMENT OF LACTOCOCCIN B GROWTH INHIBITION ZONES' DIAMETERS

Diameters of growth inhibition zones formed in bacteriocin activity assay from extracts of both BGMN1-501 and BGMN1-501/pG<sup>+</sup>host9prtP were measured using AutoCAD 12 (Autodesk, San Rafael, CA, USA).

## RESULTS

#### CONSTRUCTION OF MUTANT STRAINS

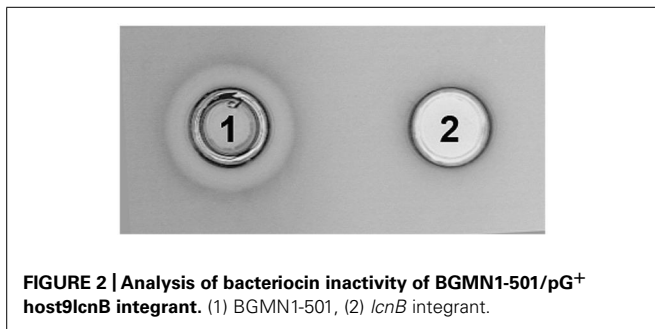
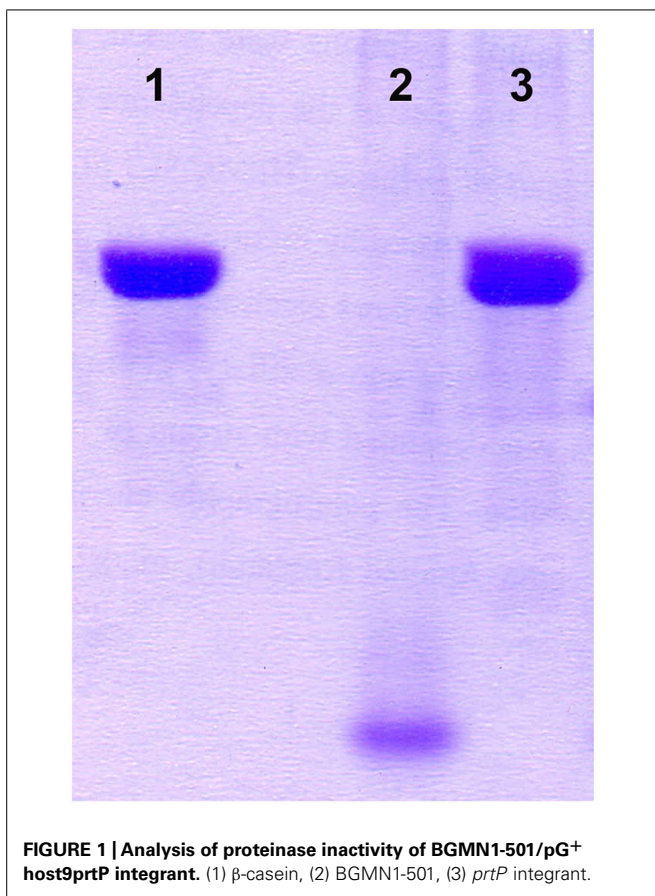
Integration of the appropriate plasmid constructs (pG<sup>+</sup>host9prtP and pG<sup>+</sup>host9lcnB) into corresponding *prtP* and *lcnB* genes on plasmid pMN80, after growing *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-501 transformants at 37°C for 48 h, was confirmed by their PrtP<sup>-</sup> and LcnB<sup>-</sup> phenotype, as well as PFGE analysis. As expected, the mutants with integrated pG<sup>+</sup>host9prtP construct in the *prtP* gene lost the ability to degrade  $\beta$ -casein (PrtP<sup>-</sup> mutant; Figure 1) and mutants with pG<sup>+</sup>host9lcnB construct integrated into *lcnB* showed LcnB<sup>-</sup> phenotype (Figure 2). PFGE (*SmaI* macrorestriction) analysis of BGMN1-501, transformants with free constructs (pG<sup>+</sup>host9prtP and pG<sup>+</sup>host9lcnB) and mutants confirmed the integration of constructs into plasmid pMN80 at different positions (it is possible to conclude that the distance between *prtP* and *lcnB* on plasmid pMN80 is at least 35 kb; Figure 3). Construction of an LcnB<sup>-</sup> mutant was undertaken in order to eliminate the possible presence of LcnB molecules in proteinase extracts used for *in vitro* LcnB activity analyses.

#### BACTERIOCIN ACTIVITY IS MEDIUM DEPENDENT IN BGMN1-501, BUT NOT IN BGMN1-501/pG<sup>+</sup>HOST9prtP (ITS PrtP<sup>-</sup> MUTANT)

The bacteriocin activity of BGMN1-501 and its PrtP<sup>-</sup> mutant was analyzed after 16 h of growth in GM17 with different concentrations of casitone (0% w/v, 0.5% w/v, 1% w/v, 2% w/v, 4% w/v, 6% w/v, and 8% w/v), assayed by the agar well diffusion test on indicator strain BGMN1-596. Casitone is a pancreatic digest of casein mainly consisting of small peptides and amino acids in a ratio of about 4:1 (Marugg et al., 1995). Increasing casitone concentration resulted in higher bacteriocin activity of BGMN1-501 (Figure 4). On the contrary, the bacteriocin activity of PrtP<sup>-</sup> mutant remained unaffected by changes in casitone concentration. It is noteworthy that the zones of inhibition for the mutant were larger than the largest zone BGMN1-501 produced.

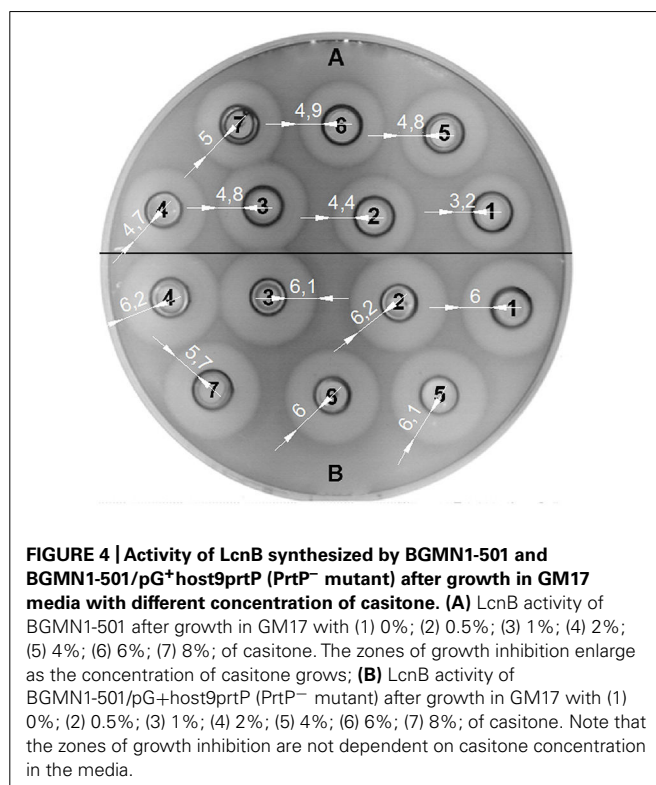
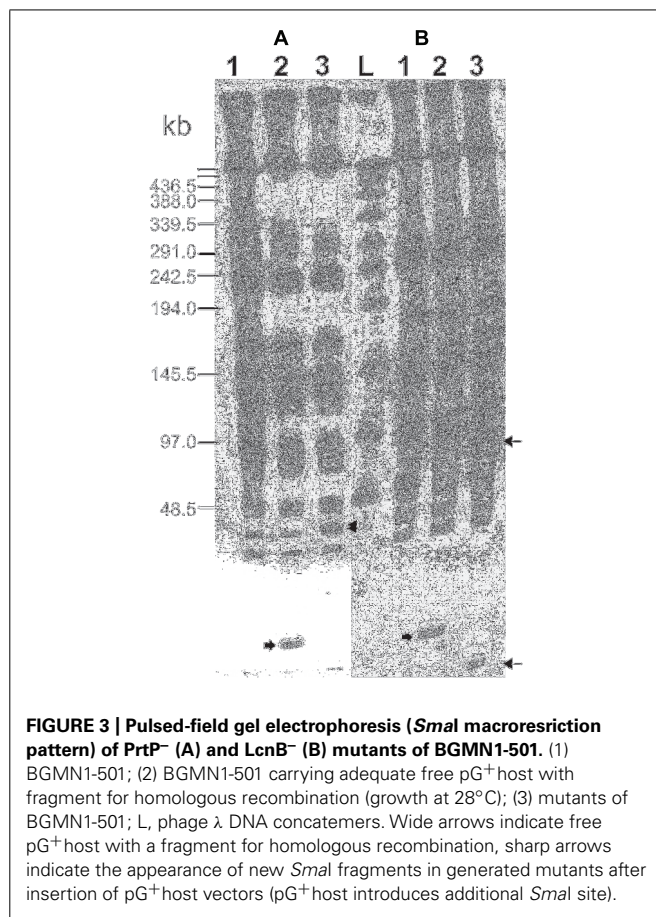
#### LcnB PROMOTER IS UNDER MEDIUM DEPENDENT REGULATION

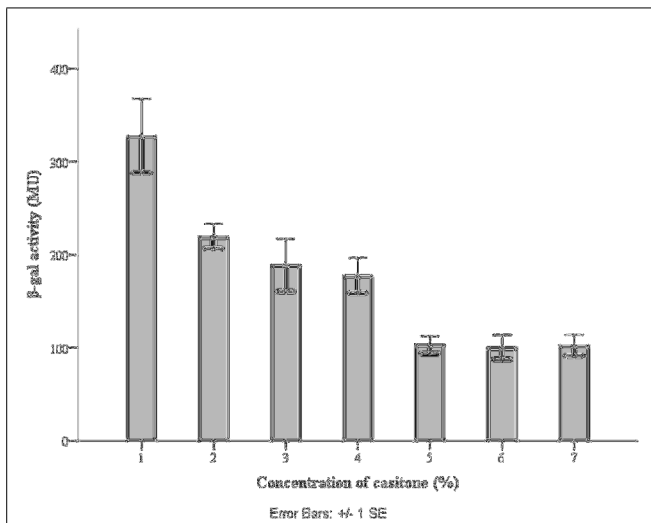
The transcription fusion vector described here, pNZ8150lacZ1, is the first such vector for expression analysis constructed for



lactococci. It has several applicable advantages: favorable selection, multiple restriction enzyme sites, high copy-number, and a common reporter gene. It proved to be reliable, easy to manipulate, and showed highly reproducible results.

The *lcnB* promoter region was cloned upstream of promoter-less *lacZ1* gene in pNZ8150lacZ1 vector, to yield pNZ8150lacZ1PlcnB. The construct was introduced into the proteinase-deficient *L. lactis* subsp. *cremoris* MG7284. The transformant MG7284/pNZ8150lacZ1PlcnB was streaked onto GM17 Petri dishes containing 7.5  $\mu$ g/ml of chloramphenicol and 50  $\mu$ g/ml of X-gal, turning apparently blue (data not shown). The  $\beta$ -galactosidase production of transformant MG7284/pNZ8150lacZ1PlcnB was analyzed during growth in GM17 media with different concentrations of casitone (0%, 0.5%, 1%, 2%, 4%, 6%, and 8%). The promoter showed a significant



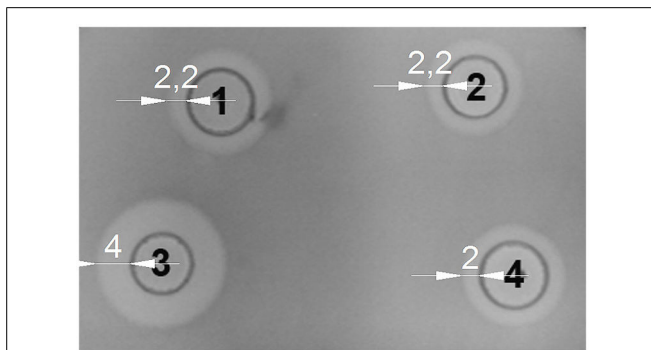


**FIGURE 5 | *lcnB* promoter activity measured by  $\beta$ -galactosidase activity assay.** When the cells grow in GM17 medium with a low concentration of casitone,  $\beta$ -galactosidase activity is approximately three times higher than in GM17 medium with a higher concentration of casitone.

decline in activity in media with higher casitone concentration, but only to a certain point. After 4%, the rise of casitone concentration in the medium had no silencing effect on the *lcnB* promoter (Figure 5).

#### ACTIVITY OF LACTOCOCCIN B IS REDUCED BY PrtP

We examined whether the activity of LcnB can be modified by PrtP proteinase *in vitro*. LcnB extracts, both from BGMN1-501 and its PrtP<sup>-</sup> mutant, were mixed in parallel with NaPi buffer and proteinase extract and incubated for 120 min at 30°C. After incubation with proteinase, the LcnB activity of BGMN1-501 was not altered (Figure 6, wells 1 and 2). In contrast, the bacteriocin activity of the PrtP<sup>-</sup> mutant decreased drastically (Figure 6, wells 3 and 4). The decrease in activity was monitored at several time points



**FIGURE 6 | LcnB activity of BGMN1-501 and its PrtP<sup>-</sup> mutant before and after incubation with PrtP proteinase extract of BGMN1-501/pG<sup>+</sup>host9lcnB (LcnB<sup>-</sup> mutant).** (1) LcnB of BGMN1-501 with NaPi; (2) LcnB of BGMN1-501 with PrtP of BGMN1-501/pG<sup>+</sup>host9lcnB; (3) LcnB of PrtP<sup>-</sup> mutant with NaPi; (4) LcnB of BGMN1-501/pG<sup>+</sup>host9prtP with PrtP proteinase of BGMN1-501/pG<sup>+</sup>host9lcnB. Note that the zone of growth inhibition is rendered to that of the original strain.

and it was continuous until 1 h of incubation (data not shown). After 1 h, zones of growth inhibition were constant regardless of incubation time with proteinase extract, indicating that in 1 h all of the LcnB was processed by proteinase extract. The same result was observed when proteinase extract from *L. lactis* subsp. *cremoris* NCDO712 (a producer of the same type of PrtP proteinase as BGMN1-501) was used (data not shown).

#### DISCUSSION

The production of bacteriocin LcnB, its genetics, spectrum of activity, mode of action, and medium dependent activity have been studied in detail (van Belkum et al., 1991; Venema et al., 1993, 1996; Gajic et al., 1999; Diep et al., 2007). In addition, it was determined that LcnB is sensitive to degradation by several proteases (pepsin, trypsin, chymotrypsin, pronase E, proteinase K) and that high concentrations of peptides in growth media induce its activity. Nevertheless, neither regulation of *lcnB* gene expression, nor the active/binding domain was described.

We analyzed the activity of the *lcnB* gene promoter by cloning it in pNZ8150lacZ1 transcription fusion vector, which we developed for expression analyses in lactococci. For this, we chose pNZ8150 cloning and expression vector with broad range replication and a chloramphenicol resistance marker because it could be cotransformed with other cloning vectors for lactococci, e.g., pAZIL (Kojic et al., 2011). This also enables analysis of the relationship between the promoter region and certain cloned gene(s) in homologous and heterologous hosts. In addition we established and standardized a simple protocol for detection and measurement of  $\beta$ -galactosidase activity in lactococci. Using this system we obtained very reproducible results and high values of  $\beta$ -galactosidase activity in lactococci, in contrast to other authors (Roces et al., 2012). This enabled us to analyze the medium-dependent activity of *lcnB* gene promoter. Through the activity of a common reporter gene (*lacZ*) we were able to quantify promoter activity in different growth media. Surprisingly, it turned out that promoter activity was continuously attenuated, inversely to the increase of casitone concentration. This was completely contrary to the assumptions of previous researchers (i.e., Venema et al., 1997) and from our experiments, which clearly indicated an increase of bacteriocin activity in peptide-rich media (Figure 4). It seems that with higher peptide concentration in the growth medium, less of the bacteriocin gene is transcribed, but somehow its activity becomes higher. We assumed that the observed bacteriocin activity indicated the activity of bacteriocin molecules themselves, rather than their number. This activity is apparently changeable *in vivo*, and we suppose that either some kind of enhanced translation or post-translational modification, which is related to different peptide concentrations in media, occurs to bacteriocin. The effect of this modification is so strong that it not only compensates for the fall in bacteriocin expression, but overcomes this effect, making even larger zones of growth inhibition of indicator strains.

Since it has long been known that PrtP expression is highly dependent on casitone concentration in media, the possible impact of proteinase on bacteriocin activity was investigated. *prtP* was knocked out from *L. lactis* BGMN1-501, and mutants were

screened for bacteriocin activity in media with different casitone concentrations. Two results were of great importance: (i) zones of growth inhibition were greatly enlarged, suggesting that the lack of PrtP stimulates LcnB activity and (ii) interdependence of LcnB activity and casitone concentration was lost. Zones of growth inhibition were approximately the same size, although cultures were grown in different media. We reasoned that LcnB may be a substrate for PrtP proteinase, given its proteinaceous nature. Indeed, *in vitro* mixing of LcnB and PrtP extracts indicated that proteinase impairs the function of LcnB. After treatment with PrtP, the activity of the mutant's LcnB was greatly reduced and corresponded perfectly to the activity of the original strain's LcnB. Moreover, the activity of LcnB extracted from the original strain was not changed with proteinase treatment. We assume that all molecules of LcnB in the original strain had already been digested with intrinsic proteinase, which left no target bonds for additionally added PrtP to cleave.

Lasta et al. (2008) showed that the first six amino acids from the N terminus are crucial for LcnB bacteriocidal activity, which is why we suppose that cleavage occurs at this location. This assumption is corroborated by the findings of Juillard et al. (1995) who showed that PrtP cleaves, among others, the peptide bond between leucine and glutamine in  $\beta$ -casein. These are the second and third amino acids on the N terminus of bacteriocin LcnB.

We propose a model of *lcnB* expression regulation in which the absence of PrtP in the environment leads to the presence of undigested and hence fully active molecules of LcnB in the media. This happens in a peptide rich environment where growth conditions are favorable for producers, but also for numerous competing bacteria. Given that these molecules possess excessively strong activity, bacteria reduce their production by silencing *lcnB* transcription several-fold. On the other hand, when bacteria enter a peptide-poor environment, PrtP is highly expressed on the cell surface, as a tool for obtaining small peptides from proteins. Consequent digestion of present LcnB molecules renders them less active but leads to initial elevation of small peptides or free amino acids in the environment. As a consequence of lower LcnB activity, *lcnB* transcription magnifies.

It should be mentioned that in *L. lactis* BGMN1-501, genes *lcnB* and *prtP* are located on the same genetic element. It is tempting to assume that these genes co-evolved, at least in some lactococci. On the other hand, there are a number of strains harboring only one of these genes, as well as those which harbor them on separate plasmids (Miladinov et al., 2001). Hence, we must not exclude the possibility of a non-functional adverse effect of proteinase on bacteriocin and that there is another explanation of bacteriocin activity enhancement parallel to attenuation of its gene expression, but we consider this not accidental. It should be noted that PrtP proteinase also digests itself in a process of autocatalytic release from cells into the medium (Laan and Konings, 1989; Bruinenberg et al., 1994; Flambard and Juillard, 2000). It is also known that bacteria use proteinases as a defense mechanism against attacks by bacteriocin-producing bacteria (Nawrocki et al., 2014), but it is still debatable why bacteria would impair their own bacteriocin. The fact that it does not destroy it completely implies some regulation-based explanation. It is certain

that as a consequence of this action a pool of small peptides rapidly generates in the close vicinity of nitrogen-depleted bacterial cells. Perhaps this "self-digestion" has a physiological role in some sort of first aid for bacteria which find themselves in a peptide-poor environment, especially if we take into account that antimicrobial activity for inhibiting the growth of neighboring bacteria is retained.

Defining the exact peptide bond or bonds that are cleaved in LcnB by the proteinase will lead to a better understanding of the structure-function relationships in the bacteriocin and help define its receptor binding domain as well as its mode of action.

In conclusion we wish to point out that our results are of both fundamental and applicable significance. They provide new insight into bacteriocin activity, opening a new field of transcriptional and translational regulation of bacteriocin expression. Also, it is reasonable to consider that similar regulation may exist in bacteriocins that are already used in food preservation or in ones that might be used in the future. Since it is not unusual for bacteriocin and proteinase producers to be applied in food production, our work indicates that their interaction should be taken into account when planning the final concentration of desired active molecules.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

GV, NM, and MM contributed to acquisition and analysis of data; BJ, IS, ZR, and DF contributed to design of the work, analysis, and interpretation of the data; GV, NM, and BJ drafted the manuscript; MK contributed to the conception of the work and did final approval of the version to be published.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia (Grants No. 173019 and 173026).

## REFERENCES

- Alegria, A., Delgado, S., Rocas, C., López, B., and Mayo, B. (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 61–66. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.029
- Bruinenberg, P. G., de Vos, W. M., and Siezen, R. J. (1994). Prevention of C-terminal autoproteolysis of *Lactococcus lactis* SK11 cell-envelope proteinase by engineering of an essential surface loop. *Biochem. J.* 302, 957–963.
- Calasso, M., Di Cagno, R., De Angelis, M., Campanella, D., Minervini, F., and Gobetti, M. (2013). Effects of the peptide pheromone plantaricin A and cocultivation with *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA174 on the exoproteome and the adhesion capacity of *Lactobacillus plantarum* DC400. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2657–2669. doi: 10.1128/AEM.03625-12
- Cotter, P. D. (2014). An "Upp"-turn in bacteriocin receptor identification. *Mol. Microbiol.* 92, 1159–1163. doi: 10.1111/mmi.12645
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172, 6568–6572.
- Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, I. E. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2384–2389. doi: 10.1073/pnas.0608775104
- Flambard, B., and Juillard, V. (2000). The autoproteolysis of *Lactococcus lactis* lactocin III affects its specificity towards  $\beta$ -casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5134–5140. doi: 10.1128/AEM.66.12.5134-5140.2000
- Gajic, O., Kojic, M., Banina, A., and Topisirovic, L. (1999). Characterization of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, a strain producing two



- bacteriocins, cell wall-associated proteinase and showing clumping phenotype. *Arch. Biol. Sci.* 59, 69–78.
- Gasson, M. J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154, 1–9.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580. doi: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8
- Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G., and Ross, R. P. (2007). Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. *Biotechnol. J.* 2, 435–449. doi: 10.1002/biot.200700045
- Holo, H., and Nes, I. F. (1989). High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3119–3123.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., et al. (1985). *Genetic Manipulation of Streptomyces — A Laboratory Manual*. Norwich: The John Innes Foundation.
- Juillard, V., Laan, H., Kunji, E. R., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P., and Konings, W. N. (1995). The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes beta-casein into more than one hundred different oligopeptides. *J. Bacteriol.* 177, 3472–3478.
- Kojic, M., Fira, D., Banina, A., and Topisirovic, L. (1991). Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1753–1757.
- Kojic, M., Jovcic, B., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Veljovic, K., et al. (2011). Cloning and expression of a novel lactococcal aggregation factor from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1. *BMC Microbiol.* 11:265. doi: 10.1186/1471-2180-11-265
- Kojic, M., Strahinic, I., Fira, D., Jovcic, B., and Topisirovic, L. (2006). Plasmid content and bacteriocin production by five strains of *Lactococcus lactis* isolated from semi-hard homemade cheese. *Can. J. Microbiol.* 52, 1110–1120. doi: 10.1139/w06-072
- Kojic, M., Strahinic, I., and Topisirovic, L. (2005). Proteinase PI and lactococcal A genes are located on the largest plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis S50. *Can. J. Microbiol.* 51, 305–314. doi: 10.1139/w05-009
- Laan, H., and Konings, W. N. (1989). Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3101–3106.
- Lahtinen, S., Arthur, C. O., Sepo, S., and Atte von, W. (eds). (2012). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. London: CRC Press.
- Lasta, S., Fajloun, Z., Mansuelle, P., Sabatier, J. M., Boudabous, A., and Sampieri, F. (2008). Chemical synthesis of lactococcal B and functional evaluation of the N-terminal domain using a truncated synthetic analogue. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 85, 9–19.
- Law, J., Buist, G., Haandrikman, A., Kok, J., Venema, G., and Leenhouts, K. (1995). A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J. Bacteriol.* 177, 7011–7018.
- Lozo, J., Vukasinovic, M., Strahinic, I., and Topisirovic, L. (2004). Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBK2-16. *J. Food Prot.* 67, 2727–2734.
- Maguin, E., Duwat, P., Hege, T., Ehrlich, D., and Gruss, A. (1992). New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 174, 5633–5638.
- Maguin, E., Prévost, H., Ehrlich, S. D., and Gruss, A. (1996). Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 178, 931–935.
- Marugg, J. D., Meijer, W., van Kranenburg, R., Laverman, P., Bruinenberg, P. G., and de Vos, W. M. (1995). Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: control of transcription initiation by specific dipeptides. *J. Bacteriol.* 177, 2982–2989.
- Meijerink, M., and Wells, J. M. (2010). Probiotic modulation of dendritic cells and T cell responses in the intestine. *Benef. Microbes* 1, 317–326. doi: 10.3920/BM2010.0029
- Mierau, I., and Kleerebezem, M. (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 705–717. doi: 10.1007/s00253-005-0107-6
- Miladinov, N., Kojic, M., Arsenijevic, S., Lozo, J., and Topisirovic, L. (2001). Characterization of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29, a strain producing bacteriocin IS29 and cell wall-associated proteinase. *Arch. Biol. Sci.* 53, 7–16.
- Miller, H. J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Nawrocki, K., Crispell, E., and McBride, S. (2014). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of gram-positive bacteria. *Antibiotics* 3, 461–492. doi: 10.3390/antibiotics3040461
- O'sullivan, D. J., and Klaenhammer, T. R. (1993). Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2730–2733.
- Roces, C., Pérez, V., Campelo, A. B., Blanco, D., Kok, J., Kuipers, O. P., et al. (2012). The putative lactococcal extracytoplasmic function anti-sigma factor Ilmg2447 determines resistance to the cell wall-active bacteriocin lcn972. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5520–5527. doi: 10.1128/AAC.01206-12
- van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N., et al. (1991). The bacteriocin lactococcal A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.* 173, 7934–7941.
- van Hemert, S., Meijerink, M., Molenaar, D., Bron, P. A., de Vos, P., Kleerebezem, M., et al. (2010). Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Microbiol.* 10:293. doi: 10.1186/1471-2180-10-293
- Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A. J., Leenhouts, K. J., Kok, J., Konings, W. N., et al. (1993). Mode of action of lactococcal B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1041–1048.
- Venema, K., Chikindas, M. L., Seegers, J., Haandrikman, A. J., Leenhouts, K. J., Venema, G., et al. (1997). Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcal B and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 305–309.
- Venema, K., Dost, M. H., Venema, G., and Kok, J. (1996). Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcal B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 142, 2825–2830. doi: 10.1099/13500872-142-10-2825

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 18 November 2014; accepted: 25 January 2015; published online: 10 February 2015.

Citation: Vukotic G, Mirkovic N, Jovcic B, Miljkovic M, Strahinic I, Fira D, Radulovic Z and Kojic M (2015) Proteinase PrtP impairs lactococcal LcnB activity in *Lactococcus lactis* BGMN1-501: new insights into bacteriocin regulation. *Front. Microbiol.* 6:92. doi: 10.3389/fmicb.2015.00092

This article was submitted to Food Microbiology, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2015 Vukotic, Mirkovic, Jovcic, Miljkovic, Strahinic, Fira, Radulovic and Kojic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.