

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Maja S. Tolinački

**KORELACIJA PRISUSTVA
BAKTERIOCINSKIH GENA I
PROIZVODNJE BAKTERIOCINA
PRIRODNIH IZOLATA
Lactobacillus casei/paracasei GRUPE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Maja S. Tolinački

CORRELATION BETWEEN THE
PRESENCE OF BACTERIOCIN GENES
AND BACTERIOCIN PRODUCTION IN
NATURAL ISOLATES OF
Lactobacillus casei/paracasei GROUP

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTORI:

Redovni profesor i naučni savetnik dr **Ljubiša Topisirović**,
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo

Vanredni profesor dr **Đorđe Fira**,
Univerzitet u Beogradu,
Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Redovni profesor i naučni savetnik dr **Ljubiša Topisirović**,
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo

Vanredni profesor dr **Đorđe Fira**,
Univerzitet u Beogradu,
Biološki fakultet

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

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je realizovana u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom dr Milana Kojića. Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Prof. dr Ljubiši Topisiroviću, mentoru, koji prati moj naučni rad od samog početka, na ukazanom poverenju i pruženoj šansi da napravim značajne korake u svom naučno-istraživačkom radu. Profesorovi saveti, kao i diskusije koje smo vodili o rezultatima eksperimenata i načinima za prevazilaženje svih teškoća u radu, bili su od neprocenljivog značaja za izradu, a zatim i pisanje ove disertacije. Takođe se zahvaljujem profesoru i za kritičku ocenu ove teze.

Prof. dr Đorđu Firi, menoru, na nesebičnoj pomoći, savetima tokom eksperimentalne izrade ovog rada, za sve što me je naučio, na izuzetno korisnim sugestijama koje su bile neophodne za finalno oblikovanje ove teze, kao i za kritičku ocenu teze.

Dr Milanu Kojiću kome dugujem posebnu zahvalnost jer je svoje ogromno naučno znanje i iskustvo nesebično podelio sa mnom, naučivši me mnogim eksperimentalnim tehnikama koje su bile neophodne za finalno oblikovanje teze. Takođe, sam mu veoma zahvalna i na vremenu i trudu koji je uložio u tumačenju dobijenih rezultata i kritičkoj oceni teze.

Dr Jeleni Lozo, dugujem veliku zahvalnost na uloženom trudu i vremenu kako tokom ekperimentalnog rada, tako i tokom pisanja ove teze. Neizmerno sam joj zahvalna za sugestije tokom pisanja i kritičku ocenu teze.

Jedan deo ove teze je urađen u laboratoriji, Biopolymères Interactions Assemblages, INRA, Fonctions et Interactions des Protéines Laitières, Nant, Francuska. Koristim priliku da se zahvalim prof. dr Thomas Haertlé i dr Michèle Dalgalarondo na stručnoj pomoći koja je omogućila dobijanje dela rezultata predstavljenih u tezi.

Teta Ivki, mojoj Živki, koja me je uvela u istraživački rad uloživši puno vremena, strpljenja i energije u mene, i koja mi je pružila veliku podršku u ključnim trenucima. Teta Nati, za neprocenljive savete i sugestije tokom pisanja ove teze i kritičku ocenu teze. Amarelici uvek spremnoj da pomogne, na svim grickalicama koje su rad učinile slađim, Jeleni što je vreme provedeno u laboratoriji učinila zanimljivijim i opuštenijim, kolegi Branku na dobronamernim šalama koje me uvek oraspolože kao i na brojnim pozajmljenim knjigama, Jovančici na prilici da se i ja na nečiji račun našalim, Brankici i Sanji na zanimljivim razgovorima i razumevanju, našem podmlatku Gocki, Goranu, Manji i Mariji za sve divne trenutke ispunjene smehom kako na poslu tako i prilikom vožnje kući, kao i na podršci koja mi je ponekad bila neophodna.

Zahvaljujem i ostalim saradnicima Instituta na nesebičnom prijateljstvu posebno Mariji, Goci, Đuri, Branki, Branku, i neizmerno mojoj Gruji.

Drage moje nisam vas zaboravila MicaKačo, KaćaMico, samo nema ovde dovoljno mesta da vam se zahvalim na bezgraničnom prijateljstvu i podršci koju ste mi uvek pružale, hvala vam na svemu.

Mojim Jelenama,

A posebno mami i beskrajno mojoj seki, mom Sunder Bobu

Korelacija prisustva bakteriocinskih gena i proizvodnje bakteriocina prirodnih izolata *Lactobacillus casei/paracasei* grupe

REZIME

Veliki broj vrsta roda *Lactobacillus* zauzima ključno mesto u proizvodnji fermentisanih mlečnih i mesnih proizvoda, prisutni su i u fermentisanom povrću i proizvodima od žitarica. Laktobacili se takođe koriste i u medicini usled pozitivnih efekata koje pojedini sojevi imaju na zdravlje domaćina. Pojedini sojevi laktobacila imaju i probiotski potencijal zahvaljujući sposobnosti produkcije različitih antimikrobnih jedinjenja, egzopolisaharida (EPS), proteinaza i dr.

Vrste roda *Lactobacillus* poseduju potencijal da inhibiraju rast konkurentskih mikroorganizama u ekološkim nišama koje naseljavaju, korišćenjem širokog spektra različitih odbrambenih mehanizama uključujući proizvodnju velikog broja metaboličkih nusproizvoda, kao i mnogih biološki aktivnih agenasa proteinske prirode kao što bakteriocini. Sojevi koji proizvode više od jednog bakteriocina sa uskim, ali različitim inhibitornim spektrom, imaju veće šanse za opstanak u okruženju koje dele sa blisko srodnim vrstama sa kojima su u kompeticiji za iste nutrijente.

Veliki broj sojeva proizvođača bakteriocina objašnjava se činjenicom da su bakteriocinske genetičke determinante često locirane na mobilnim genetičkim elementima, kao što su konjugativni plazmidi ili transpozoni, što omogućava njihovu široku distribuciju putem horizontalnog transfera gena.

Cilj ove doktorske teze bio je da se utvrdi antimikrobni potencijal 52 soja *Lactobacillus casei/paracasei* grupe, zatim da se utvrdi rasprostranjenost bakteriocinskih gena neophodnih za produkciju bakteriocina BacSJ i acidocina 8912, a potom i korelacija prisustva bakteriocinskih gena i proizvodnje bakteriocina kod analiziranih sojeva. Ovakav pristup omogućio je identifikaciju potencijalnih bakteriocinskih gena kao i novih bakteriocina nezavisno od toga da li je analizirani bakterijski soj identifikovan kao proizvođač bakteriocina.

Sojevi *Lb. casei/paracasei* grupe analizirani u ovom radu izolovani su iz fermentisanih mlečnih proizvoda (različite vrste sireva i kajmak) proizvedenih u domaćinstvima, determinisani su putem mikrobiološko-biohemijskih testova i korišćenjem metoda molekularne determinacije [PCR reakcije sa (GTG)₅ prajmerom i sekvenciranjem gena za 16S rRNK].

Detekcija antimikrobne aktivnosti sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe urađena je primenom bakteriocinskih testova sa senzitivnim sojevima laktobacila i laktokoka kao indikatorima, kao i testovima unakrsne inhibicije između sojeva proizvođača bakteriocina. Za utvrđivanje distribucije gena koji kodiraju bakteriocin BacSJ, acidocin 8912, ABC-transporter i pomoćni protein (Acc), korišćena je PCR metoda sa specifičnim prajmerima za navedene gene.

Za restauraciju sinteze bakteriocina BacSJ u soju BGNK1-62, kod koga je identifikovano prisustvo potencijalnog *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operona, korišćen je plazmid pA2A. Plazmid pA2A je dobijen kloniranjem PCR fragmenta koji nosi *abcT* i *acc* gene, uključene u transport bakteriocina BacSJ, u pA13 laktobaciusni/laktokokalni/*E. coli* vektor.

Biohemijska karakterizacija dva nova bakteriocina BacUB9 koji sintetiše soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9 i BacGR koji sintetiše soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGGR2-66, rađena je praćenjem uticaja proteolitičkih enzima, različitih pH vrednosti i temperatura na njihovu aktivnost. Izolovanje bakteriocina BacUB9 iz supernatanta prekonocne kulture, je rađeno na dva načina: amonijum sulfatnom precipitacijom i precipitacijom acetonom. Uzorak dobijen amonijum sulfatnom precipitacijom je prečišćen reverzno-faznom hromatografijom sa nelinearnim gradijentom elucije, a zatim je analiziran na Tricin SDS-poliakrilamidnom gelu. Iz uzorka dobijenog acetonskom precipitacijom zatim je određivana molekulska masa bakteriocina korišćenjem masene spektrometrije LC/MS. Izolovanje bakteriocina BacGR, adsorbovanog na površini ćelija, rađeno je hloroformskom ekstrakcijom nakon gajenja soja BGGR2-66 na čvrstom MRS medijumu, 48 sati. Uzorak dobijen hloroformskom ekstrakcijom zatim je analiziran na dva načina. Reverzno-faznom tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC) dobijen je uzorak iz koga je određivana molekulska masa bakteriocina BacGR, kombinovanom tehnikom tečne hromatografije i masene spektrometrije (ESI/MS). Uzorak dobijen hloroformskom ekstrakcijom takođe je analiziran na diskontinuiranom Tricin SDS-poliakrilamidnom gelu, nakon čega je prenesen na PVDF membranu i poslat na N-terminalno sekvenciranje.

Analizom antimikrobne aktivnosti 52 soja *Lb. casei/paracasei* grupe identifikovano je 17 sojeva koji proizvode bakteriocine. Na osnovu sličnosti

inhibitornog spektra definisano je pet grupa sojeva (A-E). U grupi A su sojevi koji imaju sličan antimikrobni spektar kao okarakterisani proizvođač bakteriocina soj BGSJ2-8, a u grupi C sojevi sa sličnim spektrom kao okarakterisani proizvođač bakteriocina soj BGBUK2-16.

Usled toga što upotreba klasičnih metoda za detekciju sojeva proizvođača bakteriocina može da dovede do značajnog potcenjivanja potencijala za proizvodnju bakteriocina testiranih sojeva, sproveden je PCR skrining rasprostranjenosti relevantnih bakteriocinskih gena, koji je obuhvatio sva 52 soja *Lb. casei/paracasei* grupe, a ne samo sojeve koji su pokazali sličan antimikrobni spektar kao soj BGSJ2-8. Pokazano je da su genetičke determinante neophodne za proizvodnju bakteriocina BacSJ (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon) i/ili acidocina 8912 (*acdT* gen) veoma rasprostranjene u okviru *Lb. casei/paracasei* grupe sa učestalošću od čak 96,15%. Na osnovu toga da li proizvode bakteriocine, odnosno da li poseduju ili ne poseduju analizirane bakteriocinske gene sojevi *Lb. casei/paracasei* grupe su podeljeni na dve glavne grupe: sojeve proizvođače bakteriocina (P1-P7) i sojeve kod kojih nije detektovana bakteriocinska aktivnost (N1-N8). Kod svih sojeva proizvođača bakteriocina identifikovano je prisustvo oba ili bar jednog strukturnog bakteriocinskog gena (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon i/ili *acdT* gen). Zajednička karakteristika sojeva P3 grupe, koja ih razlikuje od sojeva P1 grupe, je odsustvo *abcT* gena. Uži spektar delovanja tri od pet sojeva P3 grupe (BGGR2-64, BGGR2-66 i BGBUK2-16), može se objasniti nemogućnošću da se kompenzuje odsustvo *abcT* gena, kao i produkcijom potencijalno novog bakteriocina. Zajednička karakteristika sojeva iz grupa P2 i P4-P7 je odsustvo *acc* gena, čiji se uzak spektar delovanja može objasniti gubitkom *acc* gena što uslovljava njihovu slabu bakteriocinsku aktivnost ili produkcijom novog bakteriocina za čiju aktivnost nije neophodno prisustvo pomoćnog proteina.

Interesantno je da je u genomima 33 soja *Lb. casei/paracasei* grupe koji ne proizvode bakteriocine identifikovano prisustvo jednog ili oba potencijalna strukturna gena za bakteriocin BacSJ i acidocin 8912. Odsustvo proizvodnje bakteriocina, moguće je objasniti prisustvom mutacija u genima ili regulatornim sekvencama gena koji kodiraju komponente uključene u sintezu ili sekreciju bakteriocina. Takođe je moguće da se strukturni bakteriocinski geni eksprimiraju, ali da gubitak *abcT* gena (N3 i N6)

kao i nedostatak *acc* gena (N2, N4, N5 i N7) uslovljavaju izostanak sekrecije sintetisanog bakteriocina.

Restauracijom bakteriocinskog fenotipa soja BGNK1-62 heterolognom ekspresijom *abcT* i *acc* gena ukazano je na važnost identifikacije potencijalnih bakteriocinskih gena prilikom analize antimikrobnog potencijala bakterijskih sojeva.

Sprovedena studija je pokazala da sojevi BGUB9 i BGGR2-66 poseduju genetički potencijal za produkciju tri bakteriocina, ali da je njihova bakteriocinska aktivnost najverovatnije posledica delovanja novog do sada neokarakterisanog bakteriocina BacUB9 odnosno bakteriocina BacGR. Korišćenjem DNK-DNK hibridizacije pokazano je da su kod sojeva BGUB9 i BGGR2-66 potencijalni geni uključeni u proizvodnju bakteriocina BacSJ i acidocina 8912 plazmidno lokalizovani, takođe čišćenjem plazmida iz ovih sojeva dobijeni su Bac⁻ derivati, što je ukazalo da se i genetičke determinante neophodne za proizvodnju bakteriocina BacUB9 i BacGR nalaze na plazmidima.

Bakteriocin BacUB9 je mali (3758 Da) umereno termostabilan molekul, aktivan u širokom opsegu pH vrednosti, sa bakteriostatičkim načinom delovanja, osetljiv na delovanje proteolitičkih enzima, koji pored blisko srodnih vrsta inhibira i rast soja *Listeria innocua* ATCC 33090^T, na osnovu čega je svrstan u klasu IIa bakteriocina.

Bakteriocin BacGR je takođe mali (3218 Da) umereno termostabilan molekul, aktivan u širokom opsegu pH vrednosti, osetljiv na delovanje proteolitičkih enzima, ali uskog spektra delovanja ograničenog na blisko srodne vrste. Na osnovu molekulske mase, biohemijske analize i N-terminalne sekvence bakteriocin BacGR pripada bakteriocinima klase II d.

Ključne reči: *Lactobacillus*, bakteriocini, *abcT* i *acc* geni, plazmid;

Naučna oblast: Biologija;

Uža naučna oblast: Molekularna genetika i genetičko inženjerstvo;

UDK broj: 579.864:579.22:579.254

Correlation between the presence of bacteriocin genes and bacteriocin production in natural isolates of *Lactobacillus casei/paracasei* group

SUMMARY

A large number of *Lactobacillus* species play an important role in the production of fermented dairy products and meat products, and they are also present in fermented vegetables and grain products. Lactobacilli are used in medicine due to the positive effects that some strains have on the health of the host. Some *Lactobacillus* strains have a probiotic potential due to their ability to produce various antimicrobial compounds, exopolysaccharides (EPS), proteinases and other.

Species of the *Lactobacillus* genus have the potential to inhibit the growth of competing microorganisms in the ecological niches they inhabit, using a wide range of various defense mechanisms including the production of a large number of secondary metabolic products, as well as many biologically active proteinaceous agents, such as bacteriocins. Strains that produce more than one bacteriocin with a narrow but different inhibitory spectrum have a better chance to survive in an environment shared with closely related species with which they are in competition for the same nutrients.

A presence of huge number of bacteriocin producing strains could be explained by the fact that the bacteriocin genes were often located on mobile genetic elements such as conjugative plasmids or transposons, allowing their wide distribution via horizontal gene transfer.

The aim of this doctoral dissertation was to determine the antimicrobial potential of 52 strains of *Lactobacillus casei/paracasei* group, followed by a comparative screening of the bacterial genomes in order to determine the distribution of BacSJ and acidocin 8912 encoding genes, and also to determine the correlation of presence of bacteriocin genes and bacteriocin production in the analyzed strains. This approach enabled identification of potentially new bacteriocins and putative bacteriocin genes regardless of whether the analyzed bacterial strains produced bacteriocin.

Strains of *Lb. casei/paracasei* group analyzed in this study, isolates from fermented dairy products (different types of cheese and kajmak) produced in households, were determined through microbiological and biochemical tests and using molecular methods [PCR reactions with (GTG)₅ primer and sequencing of 16S rRNA gene].

Detection of antimicrobial activity of strains from *Lb. casei/paracasei* group was performed by bacteriocin activity assay using sensitive *Lactobacillus* and *Lactococcus* indicator strains and cross-inhibition tests among bacteriocin producer strains. To determine the distribution of genes encoding bacteriocin BacSJ, acidocin 8912, ABC-transporter and accessory protein (Acc), PCR analysis with specific primers for those genes was used.

For the re-establishment of the ability to produce BacSJ in BGNK1-62 strain, in which the presence of a potential operon *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* was identified, plasmid pA2A was used. Plasmid pA2A was obtained by cloning of a PCR fragment carrying *abcT* and *acc* genes, involved in transport of bacteriocin BacSJ, in lactobacilli/lactococci/*E. coli* shuttle cloning vector pA13.

Biochemical characterization of two new bacteriocins BacUB9 produced by strain *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9 and BacGR produced by strain *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGGR2-66, was done by following the effects of proteolytic enzymes, different pH values and temperature on their activity. Isolation of bacteriocin BacUB9 from supernatant of the overnight culture was done in two ways: ammonium sulphate and acetone precipitation. The sample obtained by ammonium sulphate precipitation was purified by reversed-phase chromatography with a "step" gradient elution, and then analyzed on Tricin SDS-polyacrylamide gel. Sample obtained from acetone precipitation was used for determination of bacteriocin molecular mass by using mass spectrometry LC/MS. Isolation of bacteriocin BacGR, adsorbed on the surface of cells, was done with chloroform extraction after cultivation of BGGR2-66 strain on solid MRS medium for 48 hours. The sample obtained by chloroform extraction was then analyzed in two ways. The sample obtained from reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the molecular weight of bacteriocin BacGR, by using mass spectrometry (ESI/MS). Also, a sample obtained from chloroform extraction was analyzed on discontinuous Tricin SDS-polyacrylamide gel, after which the sample was transferred to PVDF membrane and sent to N-terminal amino acid sequencing.

The analysis of antimicrobial activity showed that 17 of 52 tested *Lactobacillus casei/paracasei* strains produced bacteriocins. Based on the similarity of the inhibitory spectrum, five groups of strains we defined (A-E). Group A includes strains that have a

similar antimicrobial spectrum as previously characterized bacteriocin producer strain BGSJ2-8, and group C includes strains that have a similar spectrum as characterized bacteriocin producer strain BGBUK2-16.

Because the use of classical methods for detection of bacteriocin producers may underestimate the bacteriocinogenic potential of tested strains, all 52 strains of *Lb. casei/paracasei* group, not only the strains with a similar antimicrobial spectrum as strain BGSJ2-8, were screened by PCR amplification for presence of relevant bacteriocin genes. It was shown that the genetic determinants required for the production of bacteriocins BacSJ (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon) and/or acidocin 8912 (*acdT* gene) were widespread within the *Lb. casei/paracasei* group with a frequency of 96.15%. On the basis of whether they produce bacteriocins, and whether they have or do not possess the analyzed bacteriocin genes, strains of *Lb. casei/paracasei* group were divided into two main groups: bacteriocin producer strains (P1-P7) and strains in which the bacteriocin activity was not detected (N1-N8). In all bacteriocin producers the presence of both or at least one structural bacteriocin gene (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon and/or *acdT* gene) was identified. A common feature of strains from P3 group, which distinguishes them from strains from P1 group, is the absence of *abcT* gene. The narrow spectrum of activity of three of the five strains of P3 group (BGGR2-64, BGGR2-66 and BGBUK2-16) can be explained by the inability to compensate for the absence of *abcT* gene, as well as with production of potentially new bacteriocin. The common characteristic of strains belonging to groups P2 and P4-P7 is a lack of *acc* gene, which narrow spectrum of activity can be explained by the loss of *acc* gene, which causes their poor bacteriocin activity, or by production of new bacteriocin, which activity does not require the presence of accessory protein.

Interestingly, in the genomes of 33 strains of *Lb. casei/paracasei* group, that do not produce bacteriocins, the presence of one or both putative structural genes for production of bacteriocin BacSJ and acidocin 8912 were identified. Absence of ability to produce bacteriocins can be explained by the presence of mutations in the genes or regulatory sequences of genes encoding components involved in the synthesis and secretion of bacteriocins. It is also possible that the structural bacteriocin genes were expressed, but that the loss *abcT* gene (N3 and N6) and the lack of *acc* gene (N2, N4, N5 and N7) caused the absence of secretion of the synthesized bacteriocin.

Re-establishment of the ability of strain BGNK1-62 to produce bacteriocin by *in trans* expression of heterologous *abcT* and *acc* genes illustrated the importance of identifying putative bacteriocin genes in the analysis of antimicrobial potential of bacterial strains of interest.

This study showed that both strains BGUB9 and BGGR2-66 possess genetic potential to produce three bacteriocins, but that their antimicrobial activities probably were result of production of new, until now not characterized bacteriocins BacUB9 and BacGR. DNA-DNA hybridization showed plasmid localization of putative genes involved in production of bacteriocin BacSJ and acidocin 8912 in genome of the BGUB9 and BGGR2-66 strains, and also Bac⁻derivatives of these strains, obtained after plasmid curing experiments, indicated that the genetic determinants necessary for production of bacteriocins BacUB9 and BacGR were plasmid-encoded.

BacUB9 is a relatively heat-stable, low-molecular-weight peptide (3758 Da), active within a broad pH range, with a bacteriostatic mode of action, sensitive to proteolytic enzymes, which beside closely related species also inhibits the growth of *Listeria innocua* ATCC 33090^T strain. Based on these characteristics it appears that BacUB9 belongs to the class IIa bacteriocins.

Bacteriocin BacGR is also small (3218 Da) and relatively heat-stable peptide, active in a wide range of pH values, inactivated by proteolytic enzymes, but with a narrow spectrum of activity limited to closely related species. Based on the molecular size, biochemical characterization and obtained N-terminal sequence, bacteriocin BacGR probably belongs to the class IIb bacteriocins.

Key words: *Lactobacillus*, bacteriocin, *abcT* and *acc* genes, plasmid;

Scientific field: Biology;

Specific topic: Molecular genetics and genetic engineering;

UDC number: 579.864:579.22:579.254

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Bakterije mlečne kiseline, rod <i>Lactobacillus</i> – opšte karakteristike	1
1.2. Klasifikacija vrsta iz roda <i>Lactobacillus</i>	4
1.3. Komparativna analiza genoma laktobacila	5
1.3.1. Evolucija i transfer genetičkog materijala bakterija roda <i>Lactobacillus</i>	5
1.4. Antimikrobne komponente bakterija mlečne kiseline	8
1.4.1. Organske kiseline	8
1.4.2. Vodoni peroksid (H ₂ O ₂) i ugljen dioksid (CO ₂)	9
1.4.3. Aromatična jedinjenja diacetil i acetaldehid	9
1.4.3.1. Acetaldehid	10
1.4.4. Masne kiseline	10
1.4.5. Piroglutamatska kiselina (PCA)	10
1.4.6. Rojtericiklin	10
1.4.7. Bakteriocini	11
1.4.7.1. Klasifikacija bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija	12
1.4.7.1.1. Klasa I – Posttranslaciono modifikovani bakteriocini	14
1.4.7.1.2. Klasa II – Nemodifikovani bakteriocini	15
1.4.7.1.3. Bakteriolizini	18
1.5. Opšte karakteristike bakteriocina klase II	18
1.5.1. Biosinteza bakteriocina klase II	18
1.5.2. Način delovanja bakteriocina klase II	19
1.5.3. Mehanizmi rezistencije na bakteriocine klase II	20
1.5.4. Imuni proteini bakteriocina klase II	21
1.5.5. Eksport bakteriocina klase II	22
1.5.6. Genetička organizacija bakteriocina klase II	24
1.5.7. Primena bakteriocina	25
2. CILJ RADA	27
3. MATERIJAL I METODE	28
3.1. Bakterijski sojevi	28
3.2. Korišćeni plazmidi	30
3.3. Medijumi za kultivisanje bakterija	31
3.4. Metode rada sa bakterijama	32
3.4.1. Metode izolovanja i determinacije sojeva	32
3.4.2. Određivanje broja kolonija („CFU- Colony Forming Units“)	32
3.4.3. Detekcija proizvodnje vodoni peroksida (H ₂ O ₂) u bakterijama	32
3.4.4. Čišćenje plazmida iz laktobacila	33
3.4.5. Metode izolacije DNK iz bakterija	33
3.4.5.1. Metoda za brzo izolovanje totalne DNK iz laktobacila	33
3.4.5.2. Metoda za izolovanje velikih količina totalne DNK iz laktobacila	34
3.4.5.2.1. Prečišćavanje totalne DNK u gradijentu CsCl	34
3.4.5.3. Metode za izolovanje plazmidne DNK iz laktobacila	35
3.4.5.3.1. Mini metode za izolovanje velikih plazmida iz laktobacila	35
3.4.5.3.2. Mini metode za izolovanje plazmida iz laktobacila i <i>E. coli</i>	36
3.5. Enzimske reakcije sa DNK	36
3.5.1. Sečenje DNK restrikcionim enzimima	36
3.5.2. Ligacija DNK fragmenata	37

3.5.3. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom („Polymerase Chain Reaction“)	37
3.5.4. Sekvenciranje DNK	38
3.6. Elektroforeza i elucija DNK	38
3.6.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu	38
3.6.2. Elucija DNK fragmenata	39
3.7. DNK/DNK hibridizacija („Southern Blot“)	39
3.7.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane	39
3.7.2. Obeležavanje probe sa digoksinin-dUTP-om	40
3.7.3. Neradiokativna DNK/DNK hibridizacija	40
3.8. Transformacija ćelija sa DNK	41
3.8.1. Transformacija <i>E. coli</i>	41
3.8.1.1. Priprema <i>E. coli</i> kompetentnih ćelija	41
3.8.1.2. Transformacija <i>E. coli</i> kompetentnih ćelija toplotnim šokom ("Heat shock")	41
3.8.2. Transformacija laktobacila elektroporacijom	42
3.9. Konstrukcija <i>Lactobacillus/E. coli</i> „shuttle cloning“ vektora pAZILSJ i kozmidnog vektora pAZILSJcos	42
3.10. Konstrukcija plazmida	45
3.10.1. Konstrukcija plazmida pA2A	45
3.10.2. Konstrukcija plazmidne biblioteke soja BGGR2-66	45
3.11. Metode rada sa proteinima	46
3.11.1. Metode rada sa bakteriocinima	46
3.11.1.1. Bakteriocinski test	46
3.11.1.2. Pripremanje bakteriocinskog preparata i određivanje arbitrarnih jedinica (AU)	46
3.11.1.3. Praćenje kinetike biosinteze bakteriocina	47
3.11.1.4. Testiranje termostabilnosti i pH opsega bakteriocina	48
3.11.1.5. Efekat delovanja različitih enzima na bakteriocine	49
3.11.2. Izolovanje bakteriocina	49
3.11.2.1. Frakcionisanje amonijum sulfatnom precipitacijom	49
3.11.2.2. Precipitacija acetonom	49
3.11.2.3. Hloroformska ekstrakcija	50
3.11.2.4. Reverzno-fazna hromatografija sa nelinearnim gradijentom elucije	50
3.11.2.5. Reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)	50
3.11.2.6. Elektroforeza proteina na Tricin SDS-poliakrilamidnom gelu (Tricin SDS-PAGE)	51
3.11.3. Masena spektrometrija	53
3.11.4. Određivanje N-terminalne aminokiselinske sekvence bakteriocina	53
4. REZULTATI	54
4.1. Detekcija antimikrobne aktivnosti sojeva <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> grupe	54
4.2. Distribucija gena koji kodiraju bakteriocin BacSJ, acidocin 8912, ABC-transporter i pomoćni protein	56
4.3. Korelacija prisustva bakteriocinskih gena i proizvodnje bakteriocina	59
4.4. Restauracija sposobnosti sinteze bakteriocina BacSJ	60
4.5. Molekularna determinacija soja BGUB9	61
4.5.1. Detekcija antimikrobne aktivnosti soja BGUB9	61
4.5.2. Biohemijska karakterizacija bakteriocina BacUB9	64

4.5.2.1. Efekat proteolitičkih enzima, različitih pH vrednosti i temperatura na aktivnost bakteriocina BacUB9	64
4.5.2.2. Kinetika sinteze bakteriocina BacUB9	65
4.5.2.3. Efekat soja <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BGUB9 na rast soja <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BGHN14 u mešanoj kulturi	66
4.5.3. Izolovanje bakteriocina BacUB9	66
4.5.3.1. Određivanje molekulske mase bakteriocina BacUB9 iz uzorka dobijenog reverzno faznom hromatografijom na C18 koloni	67
4.5.3.2. Određivanje molekulske mase bakteriocina BacUB9 iz uzorka dobijenog acetonskom precipitacijom	68
4.5.4. Lokalizacija bakteriocinskih gena kod soja BGUB9	70
4.6. Molekularna determinacija i karakterizacija soja BGGR2-66	72
4.6.1. Antimikrobna aktivnosti soja BGGR2-66 i proizvodnja bakteriocina	73
4.6.2. Biohemijska karakterizacija bakteriocina BacGR	74
4.6.2.1. Kinetika proizvodnje bakteriocina BacGR	75
4.6.3. Izolovanje bakteriocina BacGR	75
4.6.4. Molekulska masa i N-terminalna sekvenca bakteriocina BacGR	78
4.6.5. Lokalizacija bakteriocinskih gena kod soja BGGR2-66	81
5. DISKUSIJA	84
6. ZAKLJUČCI	99
7. LITERATURA	101

1. UVOD

1.1. Bakterije mlečne kiseline, rod *Lactobacillus* – opšte karakteristike

Bakterije mlečne kiseline (BMK) su heterogena grupa mikroorganizama sa zajedničkim metaboličkim i fiziološkim karakteristikama. Grupi BMK pripadaju rodovi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc*. Rod *Lactobacillus* je najbrojniji od svih rodova koji pripadaju BMK i obuhvata više od 100 do sada opisanih vrsta (Dellaglio *et al.*, 2005).

Laktobacili su generalno okarakterisani kao Gram-pozitivni, nesporulišući štapići ili kokobacili, koji su često povezani u lance, i koji ne formiraju flagele (Hammes i Vogel, 1995). To su mikroaerofilne ili anaerobne bakterije koje najbolji rast postižu pri koncentraciji CO₂ od 5 do 10%. Laktobacili se razlikuju po sposobnosti fermentacije ugljenih hidrata i produkata fermentacija na osnovu čega se dele na homo- i heterofermentativne. Glavni krajnji proizvod fermentacije glukoze kod homofermentativnih vrsta u anaerobnim uslovima je mlečna kiselina, dok se kod heterofermentativnih predstavnika dobijaju ekvimolarne količine acetata, etanola, CO₂, mravlje kiseline ili sukcinata (Sharpe, 1979).

Laktobacili su visoko specijalizovani mikroorganizmi sa visokim zahtevima za nutritivnim komponentama u medijumima za rast. Pored ugljenih hidrata kao glavnih izvora atoma ugljenika i energije, za rast su im neophodne i različite aminokiseline, peptidi, nukleotidi, soli, masne kiseline kao i estri masnih kiselina. Nutritivni zahtevi su uglavnom karakteristika vrste, ali često su i karakteristika pojedinačnih sojeva (Bergey, 2009). Bakterije roda *Lactobacillus* rastu na temperaturama od 2°C – 53°C, dok je optimalna temperatura za većinu vrsta od 30°C – 40°C. Sojevi nekih vrsta (*Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. fuchuensis*, *Lb. algidus*, *Lb. plantarum*) rastu, iako sporo, čak i na temperaturama blizu tačke smrzavanja, npr. u smrznutom mesu (Kitchell i Shaw, 1975; Kato *et al.*, 2000; Sakala *et al.*, 2002) i ribi (Schröder *et al.*, 1980; Ringo i Gatesoupe, 1998). Optimalna pH vrednost za njihov rast se kreće od 5,5 do 6,2, iako pojedine vrste dobro rastu i kada je pH sredine 5 ili manji.

Laktobacili naseljavaju veoma različite ekološke niše. Oni predstavljaju značajan deo mikroflore gastrointestinalnog (GIT) i urogenitalnog trakta ljudi i životinja. Međutim, prilikom analize mikroflore veoma je teško definisati autohtone vrste laktobacila (Hammes i Hertel, 2003). Ekološke studije pokazuju da je većina

bakterija roda *Lactobacillus* koje se nalaze u GIT-u verovatno tranzijentna, poreklom iz usne duplje (Dal Bello i Hertel, 2006) ili su unete putem fermentisane hrane (Walter *et al.*, 2001; Heilig *et al.*, 2002; Dal Bello *et al.*, 2003). Opsežne studije vaginalnih laktobacila pokazale su da su predominantne vrste mikroflore ženskog urogenitalnog trakta *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri*, *Lb. jensenii* i *Lb. iners* (Antonio *et al.*, 1999; Vasquez *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004; Hyman *et al.*, 2005). Laktobacili se u prirodi u manjem broju javljaju i na površinama biljaka (Keddie, 1959; Mundt i Hammer, 1968), a najčešće izolovane vrste su *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. coryniformis*, *Lb. paracasei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* i *Lb. fermentum* (Sharpe, 1981; Kandler, 1984; Hammes i Hertel, 2003).

Veliki broj vrsta roda *Lactobacillus* zauzima ključno mesto u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda (pojedinačno ili u kombinaciji sa drugim bakterijskim vrstama, plesnima i kvascima), fermentisanih mesnih proizvoda, a prisutni su i kao dominantni organizmi u fermentisanom povrću i proizvodima od žitarica. Uloga laktobacila u formiranju finalnih proizvoda je višestruka. U toku fermentacije šećera dolazi do sinteze mlečne kiseline i drugih produkata koji snižavaju pH proizvoda što dovodi do redukcije ili potpune obustave rasta nepoželjne mikroflore. Kada rastu u hrani laktobacili proizvode i sekundarne metabolite (kao što su diacetil, sirćetna kiselina i acetaldehid, jedinjenja koja potiču iz metabolizma ugljenih hidrata ili jedinjenja nastala katabolizmom aminokiselina kao što su H₂S, amini, karbonilna jedinjenja, krezol, skatol, benzaldehid i metanetiol) koji utiču na senzorne karakteristike finalnog proizvoda (Bergey, 2009). Pored aktivnog učešća u procesima fermentacije laktobacili igraju ulogu i u konzerviranju mesnih prerađevina. Poslednjih decenija planski se kao starteri u proizvodnji dodaju sojevi proizvođači bakteriocina koji deluju protiv *Listeria monocytogenes* i drugih Gram-negativnih bakterija, kontaminenata mesnih proizvoda.

Laktobacili se takođe, sve više koriste i u medicini. Intenzivno se izučavaju pozitivni efekti koje laktobacili imaju na zdravlje domaćina. Ustanovljena je delotvornost nekih laktobacila u stabilizaciji ili kolonizaciji intestinalne mikroflore kod akutnih dijareja i prevenciji dijareje uzrokovane uzimanjem antibiotika, u prevenciji i lečenju bolesti zapaljenja creva, lečenju raka debelog creva (Sazawal *et al.*, 2006; Hedin *et al.*, 2007; Rafter *et al.*, 2007). Međutim, iako se predstavnici roda *Lactobacillus* smatraju nepatogenim bakterijama (Pigeon *et al.*, 2002) postoji i veći broj izveštaja o

infekcijama izazvanim laktobacilima uključujući vrste *Lb. paracasei* i *Lb. rhamnosus* (Cannon *et al.*, 2005). U ogromnoj većini ovih slučajeva pokazano je da se radi o osobama sa oslabljenim imunitetom što predstavlja predispoziciju za razvoj infekcije (Hammes i Hertel, 2003).

Pojedini sojevi laktobacila ispoljavaju i veliki probiotski potencijal zahvaljujući svojim sposobnostima produkcije različitih antimikrobnih jedinjenja, egzopolisaharida (EPS), proteinaza i dr. Produkcija egzopolisaharida predstavlja interesantno svojstvo koje se uzima u obzir prilikom odabira potencijalnog probiotičkog bakterijskog soja (Ventura *et al.*, 2007). Ekstracelularni polisaharidi mogu biti vezani za komponente ćelijske membrane kao lipopolisaharidi (LPS) i lipoteihoična kiselina, mogu da formiraju kapsulu oko ćelije kao kapsularni polisaharidi (CPS), ili mogu da budu oslobođeni u spoljašnju sredinu kao egzopolisaharidi (EPS) (Roberts, 1996). Pored toga što je od velikog značaja za postizanje odgovarajućih tehnoloških svojstava fermentisanih mlečnih proizvoda (van Kranenburg *et al.*, 1999; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002), EPS ima i važne biološke uloge, kao što je imunomodulatorna uloga (Hosono *et al.*, 1997), antitumorski efekat (Kitazawa *et al.*, 1991) ili snižavanje nivoa holesterola (Nakajima *et al.*, 1992).

Postoji nekoliko genetičkih studija o sojevima laktobacila koji produkuju EPS (Jolly *et al.*, 2002; Lamothe *et al.*, 2002). Takođe su definisani i genetički elementi koji su neophodni za proizvodnju EPS-a kao što su geni koji kodiraju proteine uključene u regulaciju sinteze, geni odgovorni za određivanje dužine lanca, sklapanje ponovljenih jedinica, polimerizaciju i proces eksporta (De Vuyst i Degeest, 1999). Ruas-Madiedo i saradnici (2006) su pokazali da frakcija EPS-a izolovanog iz komercijalnog fermentisanog mleka “viili” dovodi do smanjene adhezije komercijalnih probiotičkih sojeva *Lb. rhamnosus* GG i *Bifidobacterium ssp. lactis* Bb12 bez uticaja na vezivanje nekih patogena humanog intestinalnog mukusa. Stoga je veoma važno da se prilikom odabira potencijalnih probiotičkih sojeva detaljnije razmotri efekat EPS-a koji potencijalni probiotici produkuju na njihovu adheziju za ćelije intestinalne mukoze.

1.2. Klasifikacija vrsta iz roda *Lactobacillus*

Vrste roda *Lactobacillus* pripadaju zajedno sa rodovima *Paralactobacillus* i *Pediococcus* familiji *Lactobacillaceae* koja je član reda *Lactobacillales*, jednog od glavnih filogenetskih razdela *Firmicutes*. Klasifikacija roda *Lactobacillus* još uvek nije opšte prihvaćena zbog heterogene prirode njenih predstavnika (Schleifer i Ludwig, 1995). S obzirom da nije moguće napraviti jasnu korelaciju između filogenetske pozicije laktobacila i klasifikacije zasnovane na razlikama u metaboličkim procesima (Canchaya *et al.*, 2006), Hammes i Hertel su (2003) predložili da se rod *Lactobacillus* podeli na sedam filogenetskih grupa (*Lb. buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. sakei* i *Lb. salivarius* grupu). U skladu sa ovom podelom dobijeno je i filogenetsko stablo roda *Lactobacillus* poređenjem 111 dostupnih sekvenci gena za 16S rRNK laktobacila na osnovu kojih se razlikuje 5 glavnih grupa (Canchaya *et al.*, 2006). Canchaya i saradnici (2006) su sugerisali i formiranje filogenetskog superstabla sa četiri glavne grane na osnovu 354 LCG (*Lactobacillus* core genome) sekvenci. Na osnovu filogenije proteina kodiranih od strane LCG, 20 različitih vrsta laktobacila je grupisano u tri glavne grupe, definisane su osnovne grupe gena prisutne u svim genomima jedne grupe, a takođe su definisane i grupe gena zajedničke za sve genome jedne grupe, ali odsutne u svim drugim laktobacilusnim genomima, kao i orfovi prisutni kod jedne grupe, a odsutni u svim drugim kompletnim genomima (Kant *et al.*, 2011).

Lb. casei, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* i *Lb. zae* su blisko povezane taksonomske grupe u okviru fakultativno heterofermentativnih laktobacila. Vrsta *Lb. paracasei* je opisana od strane Collinsa i saradnika (1989). Metodom DNK-DNK hibridizacije pokazali su da je opisana vrsta *Lb. casei* veoma heterogena, pa su definisali novu vrstu *Lb. paracasei* koja oslikava ekološku distribuciju koja je ranije pripisana vrsti *Lb. casei*. Taksonomski status vrste *Lb. casei* se takođe odlikuje određenim nedoslednostima (Dicks *et al.*, 1996; Dellaglio *et al.*, 2002). Dellaglio i saradnici (2002) su na osnovu tih nedoslednosti predložili da naziv vrste *Lb. paracasei* (Collins *et al.*, 1989) treba da bude odbačen. Analizom sekvenci gena za 16S rRNK sojeva pripadnika *Lb. casei/paracasei* grupe i blisko srodnih vrsta *Lb. zae* i *Lb. rhamnosus* pokazano je prisustvo najmanje pet gena za 16S rRNK kod *Lb. casei/paracasei* grupe (Vásquez *et al.*, 2005) dok je u drugim studijama sugerisano prisustvo najmanje dva različita seta

16S rRNK operona kod vrsta srodnih vrsti *Lb. casei*. (Chen *et al.*, 2000; Acedo-Felix i Perez-Martínez, 2003). Takođe je komparativnom analizom sekvenci gena za 16S rRNK sojeva vrste *Lb. casei* i *Lb. zaeae* pokazano da poseduju gene za 16S rRNK sa skoro identičnom sekvencom, ali i kopije koje se međusobno značajno razlikuju (Vásquez *et al.*, 2005). Ovi rezultati ukazuju na moguće objašnjenje problema uspostavljanja jasne granice u okviru *Lb. casei/paracasei* grupe.

1.3. Komparativna analiza genoma laktobacila

1.3.1. Evolucija i transfer genetičkog materijala bakterija roda *Lactobacillus*

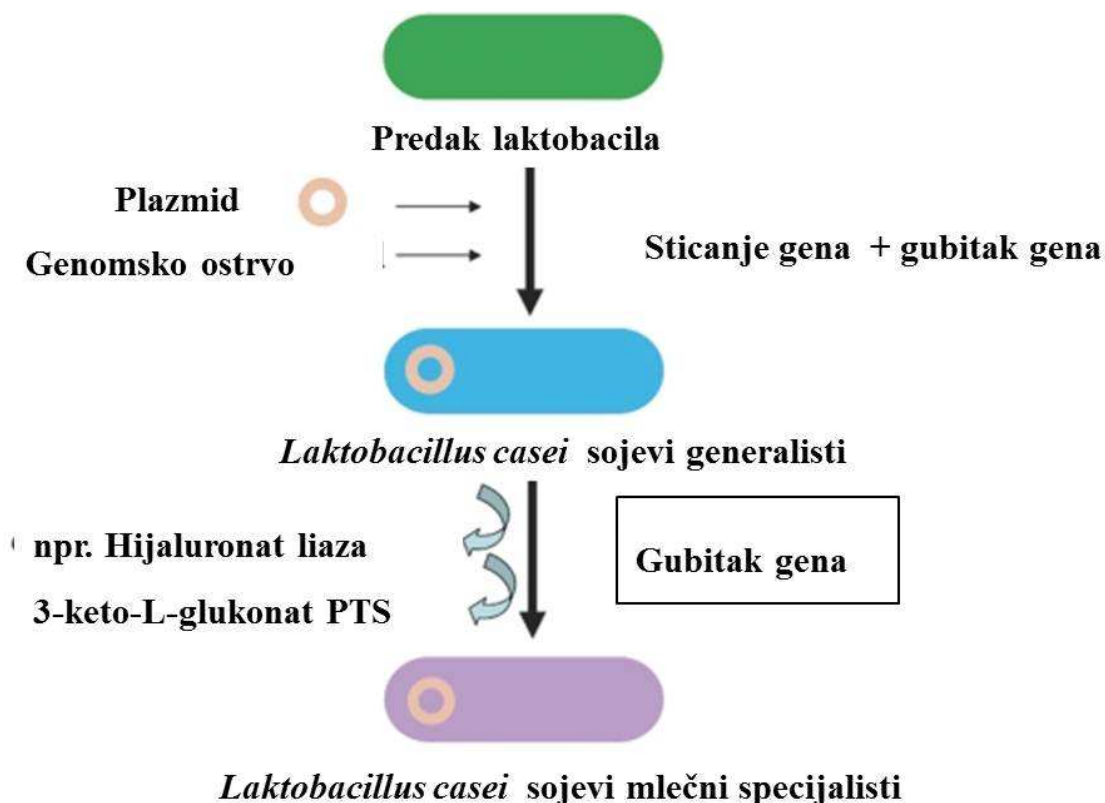
Dostupnost sekvenciranih bakterijskih genoma, tj. mogućnost komparativne genomske analize omogućava značajno bolji uvid i razumevanje evolucije bakterijskih vrsta. Mikroorganizmi mogu da evoluiraju putem tri različita procesa: 1) modifikacijom postojećih gena putem mutacija koje se zatim vertikalno nasleđuju (Sokurenko *et al.*, 1998; Giraud *et al.*, 2001; Tenaillon *et al.*, 2001; Feldgarden *et al.*, 2003); 2) sticanjem novih gena koji kodiraju važne fenotipske karakteristike horizontalnim transferom (Lawrence, 1999; Ochman *et al.*, 2000; Springael i Top, 2004); 3) kroz gubitak gena koji više ne doprinose selektivnoj prednosti i opštoj koristi mikroorganizma (Mirkin *et al.*, 2003). Modifikacija postojećih gena se prvenstveno postiže putem tačkastih mutacija, koje nastaju ili usled grešaka u replikaciji DNK ili pod dejstvom različitih mutagena prisutnih u ekološkim nišama koje bakterije naseljavaju (Elena i Lenski, 2003). Proces modifikacije postojećih gena može biti praćen dupliranjem gena što može omogućiti zadržavanje roditeljske genske funkcije kao i evoluciju novih genskih varijanti (Ohta, 2003; Saito *et al.*, 2003). Modifikacija postojećih gena može takođe biti uzrokovana ubacivanjem insercionih sekvenci (IS), koje mogu dovesti do inaktivacije gena kao i do hromozomskih rearanžmana. Ovo su događaji koji preovladavaju u organizmima čiji su genomi bogati IS sekvencama kao što je slučaj sa vrstama *Lb. helveticus* i *Lb. casei* (Top i Springael, 2003; Schneider i Lenski, 2004; Callanan *et al.*, 2008). Evolucija bakterija takođe se može ostvariti i putem velikih promena u njihovim genomima, što obično podrazumeva sticanje gena putem horizontalnog transfera gena iz genoma drugih bakterija sa kojima dele istu ekološku nišu. Na ovaj način bakterije mogu značajno proširiti svoj adaptivni potencijal (Lawrence, 1999; Ochman, *et al.*, 2000; Springael i Top, 2004). Laktobacili često pored hromozomalne DNK poseduju i

plazmide. U jednoj bakterijskoj ćeliji može da koegzistira i desetak različitih plazmida. U većini slučajeva radi se o kriptičnim plazmidima, ali se u nekim slučajevima na plazmidima mogu naći i geni koji kodiraju veoma važne fenotipske karakteristike: proizvodnju i rezistenciju na bakteriocine, metabolizam prostih ugljenih hidrata, metabolizam proteina, sintezu egzopolisaharida itd. Transmisija putem konjugacije kontrolisana je setom gena u okviru *tra* operona, koji kod Gram-pozitivnih bakterija može biti lociran na plazmidima ili na hromozomu (Clewell, 1994).

Sekvenciranjem velikog broja bakterijskih genoma otkriveno je da je proces razmene genetičkih informacija putem horizontalnog transfera gena i homologne rekombinacije veoma potcenjen i u smislu kvantiteta i u smislu kvaliteta. Uočeno je da struktura bakterijskog genoma u stvari odražava način života odgovarajuće bakterijske vrste. Smanjenje genoma uobičajeno je kod intracelularnih bakterija, kao što su obligatni intracelularni patogeni i endosimbionti, kod kojih je evolutivni trend nastanak bakterijskih varijanti zavisnih od ćelija domaćina u smislu kompenzacije genskih funkcija koje su izgubljene. Horizontalni genski transfer između bakterija različitih vrsta, koji podrazumeva mobilne genetičke elemente, kao što su plazmidi, transpozoni, genomska ostrva i bakteriofazi, povećavaju prilagodljivost bakterije primaoca. Za genomska ostrva je pokazano da ona ne doprinose samo razvoju patogenih mikroorganizama, nego i nepatogenih vrsta i stoga se može smatrati da predstavljaju pre paradigmu nego paradoks u evoluciji bakterija putem horizontalnog genskog transfera. Sticanje gena na ovaj način karakteristično je za ekstracelularne bakterije, kao što su fakultativni patogeni i simbionti. Horizontalni genski transfer ima važnu ulogu u adaptivnoj evoluciji, jer omogućava bakterijama da se prilagode novom okruženju ili promena u sredini koju naseljavaju (Dobrindt *et al.*, 2004).

Komparativna analiza do sada sekvenciranih bakterijskih genoma roda *Lactobacillus*, ukazala je da je glavni evolutivni pravac ovoga roda vodio ka pojednostavljivanju metaboličkih procesa putem gubitka predačkih gena. Pretpostavlja se da je ovakav evolutivni trend posledica adaptacije na uslove novih ekoloških staništa koja su bogata hranljivim materijama, a karakteriše ih i smanjena koncentracija kiseonika. Rod *Lactobacillus*, kao najveći i najraznovrsniji rod u okviru BMK, pored vrsta uglavnom specijalizovanih za određene ekološke niše, obuhvata i vrste (*Lb. plantarum* i *Lb. casei*) sa izuzetno izraženom prilagodljivošću na uslove u najrazličitijim

staništima (Kandler i Weiss, 1986). Kod vrsta *Lb. plantarum* i *Lb. casei* gubitak predačkih gena je nadoknađen sticanjem novih gena uglavnom uključenih u metabolizam šećera i aminokiselina ili genetičkih determinanti koje su odgovorne za sintezu enzima i proteina koji učestvuju u transportu različitih materija. Upoređivanjem genoma sojeva *Lb. casei* ATCC 334 i *Lb. casei* BL23 identifikovano je 25 hipervarijabilnih regiona. Razlike u analiziranim genomima otkrivaju kako gubitak gena i nastajanje sojeva „specijalista“ tako i sticanje novih gena preko genomskih ostrva i nastajanje sojeva „generalista“ koji imaju sposobnost da nasele različita ekološka staništa. Sojevi „specijalisti“ imaju povećani fitness za specifičnu ekološku nišu, ali i smanjen kapacitet da nastane neke druge ekološke niše. U nekom trenutku u budućnosti, ovi sojevi „specijalisti“ mogu da se izdvoje kao posebna vrsta (Cai *et al.*, 2009) (Slika 1).



Slika 1. Model evolucije vrste *Lb. casei* iz jednog laktobacilusnog predka. Evolucija se postiže i sticanjem i gubitkom gena (Cai *et al.*, 2009).

1.4. Antimikrobne komponente bakterija mlečne kiseline

Vrste roda *Lactobacillus* dele sa drugim BMK potencijal da inhibiraju rast konkurentskih mikroorganizama u ekološkim nišama koje naseljavaju. S obzirom da su se tokom svoje evolucije bakterije roda *Lactobacillus* najčešće nalazile u kompleksnim bakterijskim zajednicama to može biti objašnjenje za razvijanje njihovog antibakterijskog potencijala (Makarova *et al.*, 2006; Makarova i Koonin, 2007). Primarno dejstvo uglavnom ostvaruju snižavanjem pH u svojoj okolini što je od velikog značaja za njihov opstanak u sredini koju naseljavaju, ali ovaj efekat je takođe podržan sintezom brojnih jedinjenja čija proizvodnja zavisi i od faktora sredine i od genetičkog potencijala jedne vrste ili soja (Hammes i Tichaczek, 1994; Ouwehand, 1998). Mikroorganizmi su razvili širok spektar odbrambenih mehanizama na toksične supstance koje uključuju klasične antibiotike, veliki broj metaboličkih nusproizvoda kao što je mlečna kiselina, litičke agense kao što je lizozim, mnoge biološki aktivne agense proteinske prirode kao što su bakteriocini (Tagg *et al.*, 1976; James *et al.*, 1991).

1.4.1. Organske kiseline

Proces fermentacije šećera kod BMK se odlikuje akumulacijom organskih kiselina što za direktnu posledicu ima snižavanje pH sredine. Vrste organskih kiselina proizvedene tokom fermentacije zavise kako od vrste mikroorganizama, sastava medijuma, tako i od uslova prilikom njihovog rasta (Lindgren i Dobrogosz, 1990). Antimikrobno dejstvo organskih kiselina leži i u snižavanju pH, kao i u aktivnosti nedisosovane forme organske kiseline (Gould, 1991; Podolak *et al.*, 1996). Nedisosovana forma kiseline smanjuje intracelularni pH, dovodi do promene propustljivosti ćelijske membrane, utiče na održavanje membranskog potencijala ćelije i na taj način inhibira aktivni transport (Earnshaw, 1992; Smulders *et al.*, 1986).

Mlečna kiselina je glavni metabolički proizvod fermentacije kod BMK gde se u ravnoteži nalaze njena disosovana i nedisosovana forma. Stepem disocijacije zavisi od pH sredine. Pri niskim pH, velika količina mlečne kiseline je u nedisosovanoj formi koja ispoljava antimikrobno dejstvo na različite vrste bakterija, plesni i kvasaca. Različiti mikroorganizmi znatno variraju u svojoj osetljivosti na dejstvo mlečne kiseline.

Sirćetna i propionska kiselina proizvedene od strane BMK sojeva kao produkti heterofermentativnog metabolizma mogu da interaguju sa ćelijskom membranom i da

izazovu intracelularno snižavanje pH kao i denaturaciju proteina (Huang *et al.*, 1986). Pokazano je da sirćetna i propionska kiselina imaju jači antimikrobni efekat od mlečne kiseline usled toga što na niskim pH imaju veći procenat nedisosovane forme od mlečne kiseline (Earnshaw, 1992). Sirćetna kiselina takođe može delovati sinergistički sa mlečnom kiselinom, koja snižavanjem pH vrednosti medijuma povećava toksičnost sirćetne kiseline (Adams i Hall, 1988).

1.4.2. Vodonik peroksid (H₂O₂) i ugljen dioksid (CO₂)

Vodonik peroksid proizvode BMK u prisustvu kiseonika kao rezultat delovanja flavinskih oksidaza, (NADH) oksidaza ili superoksid dismutaza. Antimikrobno dejstvo H₂O₂ može da dovede od snažnog oksidujućeg efekta na bakterijske ćelije, izazivajući denaturaciju brojnih ćelijskih enzima, proteina i membranskih lipida čime se povećava permeabilnost ćelijske membrane (Kong i Davison, 1980). H₂O₂ može da bude i prekursor za nastanak slobodnih radikala, kao što su superoksid (O²⁻) i hidroksilni jon (OH⁻) koji mogu oštetiti DNK (Byczkowski i Gessner, 1988). Neki laktobacili sintetišu H₂O₂, a pri tome nemaju enzim katalazu, što dovodi do akumuliranja H₂O₂ u medijumu, čime se postiže antimikrobni efekat (Kandler i Weiss, 1986).

Ugljen dioksid proizvode heterofermentativne BMK. Precizan mehanizam njegovog antimikrobnog delovanja je još uvek nepoznat. Međutim, CO₂, ima ulogu u formiranju anaerobnog okruženja i moguće je da dovodi do inhibicije enzimske dekarboksilacije ili da akumulacijom u dvosloju membrane može da prouzrokuje promenu njene propustljivosti (Eklund, 1984).

1.4.3. Aromatična jedinjenja diacetil i acetaldehid

Diacetil može da nastane kao krajnji proizvod u metabolizmu citrata kod pojedinih sojeva roda *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*. Diacetil inhibira rast Gram-negativnih bakterija tako što interferira sa arginin-vezujućim proteinima i na taj način onemogućava iskorišćenost arginina (Jay, 1986). Diacetil takođe može delovati sinergistički sa drugim antimikrobnim faktorima i na taj način doprineti očuvanju fermentisanih namirnica (Jay, 1982).

1.4.3.1. Acetaldehid

Acetaldehid proizvodi vrsta *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* delovanjem enzima treonin aldolaze. Budući da *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* u jogurtu ne mogu da metabolišu acetaldehid, on se nagomilava u proizvodu i pri koncentracijama od 10-100 ppm sprečava rast *Staphilococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* u mlečnim proizvodima (Piard i Desmazeaud, 1991).

1.4.4. Masne kiseline

Pod određenim uslovima, neki laktobacili i laktokoke pokazuju lipolitičku aktivnost tj. mogu da proizvedu značajne količine masnih kiselina (Rao i Reddy, 1984; Sanz *et al.*, 1988). Nezasićene masne kiseline deluju inhibitorno na Gram-pozitivne bakterije, dok antifungalna aktivnost masnih kiselina zavisi od dužine lanca, koncentracija i pH medijuma (Gould, 1991). Pretpostavlja se da masne kiseline ostvaruju svoje dejstvo preko nedisosovanih formi, jer je uočeno da na nižim pH ispoljavaju veći antimikrobni potencijal (Kabara, 1993).

1.4.5. Piroglutamatska kiselina (PCA)

Piroglutamatsku kiselinu sintetišu *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *Strep. bovis*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (Huttunen *et al.*, 1995; Mucchetti *et al.*, 2002). Pokazano je da ona ispoljava inhibitornu aktivnost prema sojevima *B. subtilis*, *Enterobacter cloacae* i *Pseudomonas putida* (Huttunen *et al.*, 1995).

1.4.6. Rojtericiklin

Rojtericiklin je antibiotik koji sintetiše soj *Lb. reuteri* LTH2584 (Ganzle *et al.*, 2000). Rojtericiklin je antimikrobno jedinjenje male molekulske mase, negativno naelektrisano i hidrofobno, a strukturno predstavlja derivat tetramičke kiseline (Höltzel *et al.*, 2000). Inhibitorni spektar delovanja ovog antibiotika je potvrđen na Gram-pozitivne bakterije uključujući *Lactobacillus* spp., *B. subtilis*, *B. cereus*, *f Ent. faecalis*, *Staph. aureus* i *List. innocua*. Interesantno je da inhibitorno dejstvo na rast *E. coli* i *Salmonella* sp. rojtericiklin ispoljava samo u slučaju kada im je oštećena spoljašnja membrana.

Rojterin je antimikrobno jedinjenje koje proizvode neki predstavnici vrste *Lb. reuteri* tokom metabolizma glicerola (Cleusix *et al.*, 2008). Rojterin inhibira rast

pojedinih Gram–negativnih i Gram–pozitivnih bakterija, kvasaca, plesni i protozoa (Talarico i Dobrogosz, 1989). Rojterin je rastvorljiv u vodi, efikasan je u širokom opsegu pH, otporan je na delovanje proteolitičkih i lipolitičkih enzima, a ispitivana je i njegova primena kao konzervansa ili terapijskog agensa (Axelsson *et al.*, 1989; El-Ziney *et al.*, 1999; Vollenweider i Lacroix, 2004).

1.4.7. Bakteriocini

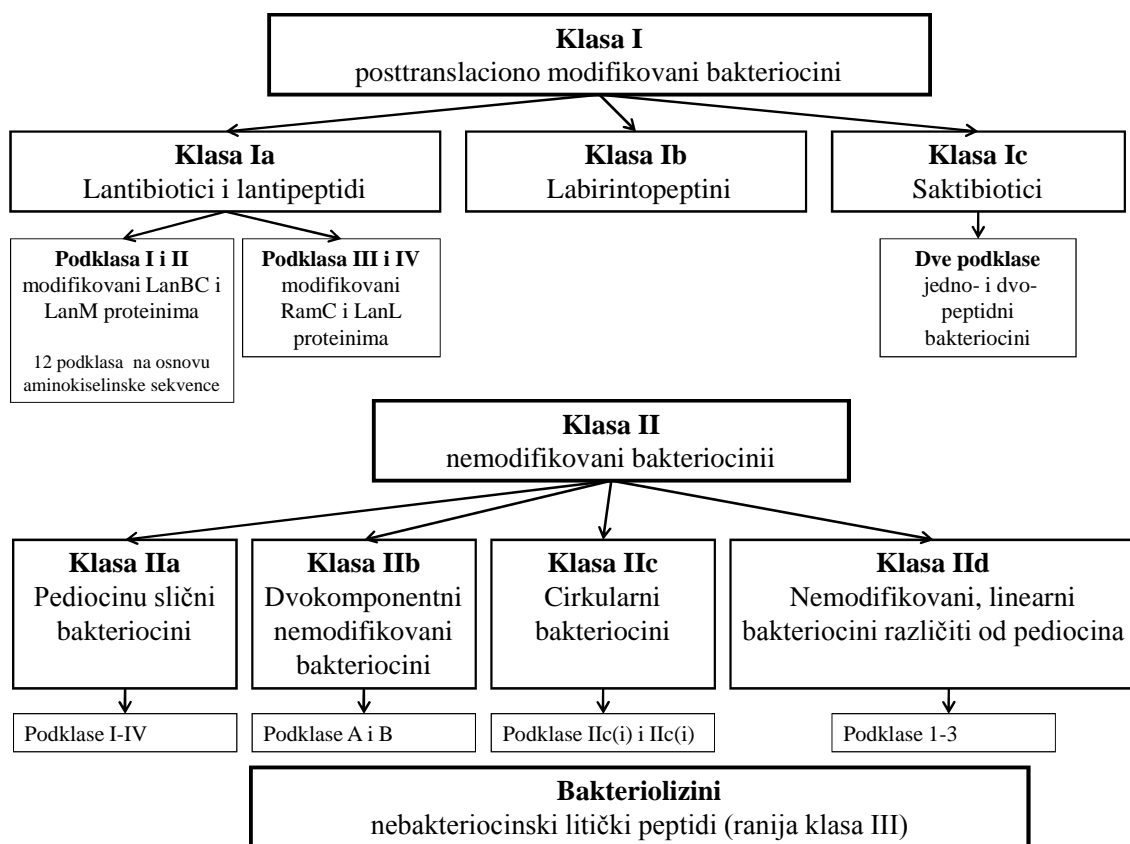
Bakteriocine proizvode skoro sve do sada opisane bakterijske vrste. BMK su poznate po proizvodnji različitih antimikrobnih jedinjenja, uključujući i bakteriocine i bakteriocinima slične antimikrobne supstance (De Vuyst i Vandamme, 1994). Bakteriocini su generalno gledano ribozomalno sintetisani proteini ili proteinski kompleksi koji obično ispoljavaju antagonističko dejstvo na blisko srodne vrste (Klaenhammer, 1988; De Vuyst i Vandamme, 1994; Nes i Johnsborg, 2004). Manji broj do sada okarakterisanih bakteriocina Gram–pozitivnih bakterija inhibira širok spektar nesrodnih bakterija kao što je slučaj sa lantibioticima, nizinom ili mutacinom B-Ny266 koji deluju na *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* i *Staphylococcus*, a ispoljavaju dejstvo i na patogene Gram–negativne bakterije kao što su *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter* i *Neisseria* (Morency *et al.*, 2001; Mota-Meira *et al.*, 2000, 2005). Bakteriocini su uglavnom mali, termostabilni, pozitivno naelektrisani peptidi koji nakon interakcije sa bakterijskom membranom zauzimaju amfifilnu konformaciju. Bakteriocini svoje dejstvo ispoljavaju povećanjem membranske propustljivosti, što za posledicu ima gubitak malih metabolita iz bakterijske ćelije (Eijsink *et al.*, 2002; Drider *et al.*, 2006; Heng *et al.*, 2007). Njihova raznovrsnost u smislu veličine, antimikrobnog spektra, načina delovanja i mehanizama kojima se ostvaruje imunost ili rezistencija na njihovo dejstvo jasno ukazuju na važnu ulogu koju bakteriocini imaju, ali je manje poznato kako je takva raznolikost nastala i koje to sve uloge imaju u okviru bakterijskih zajednica. Preovlađuje mišljenje da je uloga bakteriocina da soju proizvođaču obezbedi ekološku prednost nad kompetitorima u okviru kompleksnih mikrobioloških zajednica (Riley i Wertz, 2002; De Vuyst i Leroy, 2007). Ekološka prednost se ogleda i u sposobnosti pojedinih sojeva BMK da proizvedu više od jednog bakteriocina sa uskim, ali različitim inhibitornim spektrom čime kompenzuju uzan spektar delovanja što im omogućava opstanak u okruženju koje dele

sa blisko srodnim vrstama sa kojima su u kompeticiji za iste nutrijente (Drider *et al.*, 2006). Pokazana je takođe i dodatna uloga bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija kao posrednika u bakterijskoj „quorum sensing” regulaciji ekspresije gena (Miller i Bassler, 2001).

1.4.7.1. Klasifikacija bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija

Sve veći priliv informacija vezanih za kompoziciju, trodimenzionalnu strukturu kao i način delovanja bakteriocina uslovio je opštu reklasifikaciju bakteriocina. Klasifikacija predstavlja zahtevan i složen proces u kome je ključni korak izbor adekvatnih kriterijuma na osnovu kojih je moguće svrstati sve postojeće bakteriocine. Godine 1993, Klaenhammer je pokušao da uvede red u klasifikaciju bakteriocina predlažući četiri glavne klase: klasa I – posttranslaciono modifikovani bakteriocini – lantibiotici; klasa II – mali (< 10 kDa) termostabilni bakteriocini; klasa III: veliki (> 30 kDa) termolabilni bakteriocini i klasa IV - kompleksni bakteriocini koji pored proteinskog dela sadrže i neproteinske komponente, lipide ili ugljene hidrate. Klaenhammer-ova tradicionalna klasifikacija pretrpela je izvesne modifikacije. Klasa I je podeljena na klasu IA – linearne i klasu IB – globularne lantibiotike. Klasa II je podeljena na klasu IIa – anti-listerijalni peptidi sa YGNGV/L aminokiselinskim motivom na N – terminalnom kraju peptida; klasu IIb – dvokomponentni bakteriocini i klasu IIc – tiol-aktivirajući peptidi kojima je za aktivnost potreban redukovani cistein. Klasi II je tokom vremena pridodato još podgrupa. Kemperman i saradnici (2003) su preporučili uvođenje nove klase V – koja bi obuhvatala ribozomalno sintetisane, nemodifikovane i ciklične peptide. Cotter i saradnici su 2005. godine predložili radikalnije izmene Klaenhammer-ove klasifikacione šeme za bakteriocine BMK po kojoj se razlikuju samo dve osnovne kategorije: klasa I – lantibiotici i klasa II - bakteriocini koji ne sadrže lantionin (Cotter *et al.*, 2005). Klasa III je preimenovana u bakteriolizine, a klasa IV je izbačena. Zatim je predloženo da se Klaenhammer-ove podklase IIa i IIb zadrže, a da se Kemperman-ova klasa V preimenuje u klasu IIc. Predložena je klasa IID u koju bi se svrstavali svi ostali linearni bakteriocini koji ne sadrže lantionin. Treba napomenuti da su Cotter i saradnici prilikom definisanja klase III zanemarili podatke o postojanju nelitičkih, velikih, termolabilnih bakteriocina kao što su helveticin J (Joerger i Klaenhammer, 1986) i streptokokcin G-2580 (Tagg i Wong, 1983). Modifikaciju Cotter-ove klasifikacione šeme predložili su Heng i

saradnici (2007) koji su sugerisali da ciklični bakteriocini formiraju novu klasu IV. Klasa II je u novije vreme podeljena na podgrupe na osnovu aminokiselinskih sekvenci bakteriocina (Martin-Visscher *et al.*, 2009; Nissen-Meyer *et al.*, 2009). U ovom radu će biti uzeta u obzir klasifikacija bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija koju su nakon razmatranja svih do sada predloženih modifikacija predložili Rea i saradnici (2011), a koja se delom poziva na već predložene izmene Heng-a i Tagg-a, sa jedne strane, i Cotter-a i saradnika, sa druge strane (Rea *et al.*, 2011) (Slika 2).



Slika 2. Predložena klasifikacija bakteriocina, bakteriocinima sličnih peptida i proteina Gram-pozitivnih bakterija (Rea *et al.*, 2011).

1.4.7.1.1. Klasa I – Posttranslaciono modifikovani bakteriocini

Tradicionalno jedini predstavnici Klase I bili su lantibiotici, međutim kako je identifikovan veći broj novih posttranslaciono modifikovanih bakteriocina to je unelo zabunu u postojeću klasifikaciju pa su Rea i saradnici (2011) predložili da se ova klasa podeli na podklase Ia (lantibiotici), Ib (labirintopeptini) i Ic (saktibiotici).

Klasa Ia – Lantibiotici i lantipeptidi su generalno mali peptidi (< 5 kDa; 19-28 aminokiselina) koji prolaze obimnu posttranslacionu modifikaciju i sadrže neuobičajene aminokiseline lantionin, β -metil-lantionin, dehidroalanin i dehidrobutirin. Lantibiotici su tradicionalno na osnovu strukture klasifikovani na linearne (Tip A) i globularne (Tip B) lantibiotike (Jung, 1991), na osnovu aminokiselinske sekvence nemodifikovanog prepeptida (Cotter *et al.*, 2005), na osnovu enzima uključenih u modifikaciju i sekreciju aktivnog peptida (Pag i Sahl, 2002; Willey i van der Donk, 2007) i na osnovu toga da li zahtevaju jedan ili dva peptida za optimalnu aktivnost (Heng *et al.*, 2007). Međutim, na primeru načina delovanja nizina ukazano je na nepostojanje jasne razlike između Tipa A i Tipa B lantibiotika. Pored toga što formira pore i na osnovu toga pripada Tipu A lantibiotika, pokazano je da nizin inhibira sintezu peptidoglikana kod Gram-pozitivnih bakterija vezujući se za prekursor peptidoglikana lipid II što ga klasifikuje kao Tip B (Breukink *et al.*, 1999). Willey i van der Donk (2007) predložili su zato podelu na tri podklase na osnovu puta kojim dolazi do maturacije peptida kao i na osnovu prisustva odnosno odsustva antimikrobne aktivnosti (Willey i van der Donk, 2007).

Podklasa I obuhvata linearne peptide čiji je najbolje okarakterisan predstavnik nizin, čiji su pre-peptidi modifikovani delovanjem dva različita enzima LanB i LanC koji vrše dehidrataciju Thr i Ser ostataka i posreduju u ciklizaciji.

Podklasa II obuhvata predstavnike sa više globularnom strukturom nego lantibiotici podklase I. Ovi peptidi su modifikovani od strane velikih LanM proteina (900-1000 aminokiselina) koji obavljaju i dehidrataznu i ciklaznu aktivnost. U ovu podklasu su svrstani laktocin S i dvokomponentni lantibiotici kao što je lakticin 3147.

Podklasa III obuhvata peptide slične lantibioticima grupisane na osnovu srodnosti modifikacionih enzima, za koje nije pokazano da imaju antimikrobno delovanje. Do sada su okarakterisana tri predstavnika ove podklase lantibiotika SapB, AmfS i SapT uključenih u formiranje vazdušnog micelijuma kod *Streptomyces* (Ueda *et al.*, 2002; Kodani *et al.*, 2004; Kodani *et al.*, 2005).

Podklasa IV Goto i saradnici (2010) su oformili ovu podklasu na osnovu još jedne nove klase lantionin sintetaza, označenih kao LanL. Kao i u slučaju podklase III ni za predstavnike ove podklase nije pokazano da poseduju antimikrobnu aktivnost što je dovelo do uspostavljanja novog termina „lantipeptidi“ koji opisuje jedinjenja koja po strukturi i biosintetskoj strategiji pokazuju jasnu povezanost sa lantibioticima (Goto *et al.*, 2010).

Moguća je i dalja podela lantibiotika koji pokazuju antimikrobnu aktivnost na 12 podklasa na osnovu sekvence nemodifikovanih formi pratećih proteina.

Klasa Ib – Labirintopeptini predstavljaju novu klasu posttranslaciono modifikovanih peptida koji su dobili naziv zbog svoje strukture, razlikuju se po prisustvu labionina, prethodno neidentifikovane karbociklične, posttranslaciono modifikovane aminokiseline (Meindl *et al.*, 2010). Labirintopeptini su veoma interesantni za dalje izučavanje jer je pokazana njihova aktivnost protiv herpes simpleks virusa, a ispoljili su i efekat kao agensi u lečenju neuropatskog bola.

Klasa Ic – Saktibiotici u koje spada Subtilozin A koga produkuje *B. subtilus* je ciklični peptid, ali se znatno razlikuje od svih ostalih cikličnih bakteriocina (podklase IId), manje je veličine i neobično je posttranslaciono modifikovan, sa formiranim vezama između sumpora iz tri cisteinska ostataka i α -ugljenika iz dva fenilalanina i jednog treonina (Marx *et al.*, 2001; Kawulka *et al.*, 2003). Nedavna identifikacija još jednog dvokomponentnog bakteriocina turicina CD, koji takođe sadrži vezu između cisteina i α – ugljenika sugerisala je da ova rastuća grupa bakteriocina ne može više biti izostavljena iz klasifikacione šeme (Rea *et al.*, 2010). Turicin CD (Trn α i Trn β) produkuje soj *B. thuringiensis* 6431, a inhibitorno deluje na *Clostridium difficile*. Kao posledica prirode veza koji se nalaze i kod subtilozina A i turicina CD, predloženo da bakteriocini koji sadrže ove strukture budu označeni kao saktibiotici (Rea *et al.*, 2011).

1.4.7.1.2. Klasa II – Nemodifikovani bakteriocini

Klasa II bakteriocina obuhvata raznovrsnu grupu malih peptida (<10 kDa) koji se sastoje od standardnih aminokiselina (koje mogu biti povezane disulfidnim mostovima ili zatvoreni preko N- i C- terminusa).

Klasa IIa - Pediocinu slični bakteriocini koje produkuje širok spektar Gram-pozitivnih bakterija. Ovi bakteriocini poseduju izuzetan potencijal kao prirodni konzervansi hrane, a usled toga što inhibitorno deluju na patogene bakterije kao što su

List. monocytogenes i *Staph. aureus*, kao i na sporulišuće bakterije *B. cereus* i *Cl. perfringens* imaju potencijal da se koriste i u biomedicini (Drider *et al.*, 2006). Do sada je okarakterisano 28 različitih bakteriocina ove klase (Nissen-Meyer *et al.*, 2009). Jedna od karakteristika ovih bakteriocina je uzak antimikrobni spektar i značajan inhibitorski potencijal protiv *List. monocytogenes*. Razlika u veličini varira od 55 aminokiselina kod acidocina A (Tahara *et al.*, 1992) do 37 aminokiselina kod sakacina G (Simon *et al.*, 2002). Bakteriocini ove klase dele zajednički N-terminalni region Y-G-N-G-V-X1-C-X2-K/N-X3-X4-C (gde je X bilo koja aminokiselina), ponekad označenu kao „pediocin box“. To su nemodifikovani proteini (izuzev isecanja lider peptida iz prekursora bakteriocina). Isecanje se najčešće dešava između Gly-Gly i u direktnoj je vezi sa transportom bakteriocina iz ćelije od strane ABC transportera i njegovog pomoćnog proteina (Ennahar *et al.*, 2000). Osnova za dalju poddelu klase IIa na četiri podklase bila je komparativna analiza sekvenci zrelih proteina bakteriocina klase IIa (Nissen-Meyer *et al.*, 2009). Pretpostavlja se da je konzervisani region unutar „pediocin box-a“ odgovoran za nespecifično vezivanje za ćelijsku površinu, a da je daleko manje konzervisan C-terminalni region odgovoran za targetnu specifičnost (Johnsen *et al.*, 2005a). Korišćenjem nuklearno magnetne rezonance (NMR) dobijene su 3D strukture karnobakteriocina B2 (Sprules *et al.*, 2004), kurvacina A (Haugen *et al.*, 2005), leukocina A (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997) i sakacina P (uključujući i varijante sakacina Pa) (Uteng *et al.*, 2003). Pokazano je da se pediocinu slični bakteriocini zaista sastoje od dva domena koja su razdvojena fleksibilnim strukturama, a predloženo je da uočene varijacije u 3D strukturi verovatno predstavljaju osnovu za razlike u specifičnosti između ovih bakteriocina. Tri bakteriocina ove klase sa dva disulfidna mosta (pediocin PA-1, enterocin A i sakacin G) pokazuju povećan antimikrobni potencijal na povišenim temperaturama kao i širi inhibitorski spektar nego bakteriocini sa samo jednim disulfidnim mostom (sakacin P i kurvacin A) (Eijsink *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 2000). Pokazano je da na povišenim temperaturama kod peptida sa jednostrukim disulfidnim vezama dolazi do narušavanja spiralne strukture, dok bakteriocini sa dvostrukom disulfidnom vezom zadržavaju svoju terciarnu strukturu (Kaur *et al.*, 2004), što je ukazalo da održavanje α -heliks strukture na C-terminalnom kraju bakteriocina ima kritičnu ulogu za ostvarivanje inhibitorne aktivnosti. Inhibitorska aktivnost se verovatno ostvaruje indukcijom povećane permeabilnosti membrane

formiranjem pora što dovodi do narušavanja membranskog potencijala, a dovodi i do pražnjenja unutrašnjih depoa ATP-a target ćelije (Chikindas *et al.*, 1993; Herranz *et al.* 2001a, b; Drider *et al.*, 2006).

Klasa IIb – Dvokomponentni nemodifikovani bakteriocini. Do sada je opisano 16 dvokomponentnih nemodifikovanih bakteriocina (Nissen-Meyer *et al.*, 2009). Broj aminokiselina kod ovih bakteriocina varira od manje od 40 kod plantaricina S i laktokokcina G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992; Jimenez-Diaz *et al.*, 1995), do velikih peptida kao što su brohocin-C, sakacin T, gasericin T i laktacin F, kod kojih bar jedan od peptida sadrži više od 50 aminokiselina (Muriana i Klaenhammer, 1991; McCormick *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2001). Kod svih do sada okarakterisanih bakteriocina ove klase kodirajući geni su lokalizovani u okviru istog operona, gen koji kodira imuni protein je lokalizovan u neposrednoj blizini ovog operona dok je gen koji kodira ABC-transporter lokalizovan u okviru istog ili susednog operona (Nes *et al.*, 2002; Oppegard *et al.*, 2007). Za formiranje aktivnog bakteriocina neophodna je interakcija oba peptida iz dvokomponentnog kompleksa izuzev u slučaju enterocina 1071, laktokokcina G i laktokokcina Q, kod kojih je usled sličnosti peptidnih sekvenci moguće formiranje aktivnih kompleksa između peptida dva različita bakteriocina. Bakteriocini klase IIb slično kao bakteriocini klase IIa i IIc, ostvaruju svoje inhibitorno dejstvo tako što prilikom kontakta sa target ćelijom preko membranskog receptora, dovode do povećane permeabilnosti ćelijske membrane, što dovodi do efluksa malih molekula i na kraju do ćelijske smrti (Oppegard *et al.*, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Rogne *et al.*, 2009). Utvrđeno je takođe da, iako aminokiselinska sekvenca i struktura peptida koji formiraju dvokomponentni sistem varira, postoji konsenzus sekvenca GxxxG-motiv, u oba peptida, a pokazano je na primeru laktokokcina G da je interakcija preko ovih domena važna za antimikrobno delovanje bakteriocina i da zamena jednog Gly dovodi do narušavanja kompleksa (Senes *et al.*, 2004; Rogne *et al.*, 2009). Strukturna analiza je pokazala da neki od pripadnika klase IIb formiraju β -naborane ploče pre nego α -helikse (Garneau *et al.*, 2003; Oppegard *et al.*, 2007) pa je moguća i dalja podela klase IIb na podklase na osnovu peptidne strukture bakteriocina.

Klasa IIc – Cirkularni bakteriocini su generalno gledano termostabilni, ne podležu proteolitičkoj degradaciji i pokazuju antilisterijalnu aktivnost. Do danas je okarakterisano osam predstavnika ove klase: gasericin A, rojtericin 6, enterocin AS-48,

enterocin 4, karnociklin A i laktociklicin Q kao i dva bakteriocina cirkularin A i butirivibriocin AR10 koje proizvode *Clostridium beijerinckii* i *Butyrivibrio fibrisolvens*. Na osnovu aminokiselinskog sastava ova klasa se dalje deli na podklasu IIc(i) i IIc(ii), pri čemu postoje neslaganja oko svrstavanja postojećih bakteriocina u ove podklase. Analiza aminokiselinske sekvence pokazala je visok stepen homologije bakteriocina gasericina A, rojtericina 6 i butirivibriocin AR10 (Martin-Visscher *et al.*, 2009)

Klasa IId – Nemodifikovani, linearni bakteriocini različiti od pediocina obuhvataju heterogenu grupu bakteriocina koje proizvode sojevi izolovani iz različitih ekoloških niša. Bakteriocini klase IId ne pokazuju značajnu sličnost na nukleotidnom nivou sa drugim bakteriocinima klase II. Najbolje okarakterisan predstavnik ove klase je laktokokcin A. U ovu klasu su pored bakteriocina BMK svrstani i bakteriocini izolovani iz *Staphylococcus* sp., *Weissella* sp. i *Propionibacterium* sp. (Heng *et al.*, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 2009). Među Bakteriocinima klase IId mogu se razlikovati: 1. *sec*-zavisni bakteriocini; 2. bakteriocini bez lider peptida i 3. ostali bakteriocini klase IId

1.4.7.1.3. Bakteriolizini

Bakteriolizini, ranije klasifikovani kao klasa III, obuhvataju velike, termolabilne antimikrobne proteine, koji pokazuju domensku strukturu u kojoj su različiti domeni odgovorni za translokaciju, vezivanje za receptor i ostvarivanje inhibitornog dejstva. U bakteriolizine su svrstani helveticin J iz *Lb. helveticus*, zoocin A iz *Strep. zooepidermicus*, enterolizin A koji proizvode *Ent. faecalis*, milericin B iz *Strep. milleri* i linocin M18 koga proizvode soj *Brevibacterium linens* kao i jedini koga ne proizvode BMK lizostafin iz vrste *Staphylococcus* (Joerger i Klaenhammer, 1986; Valdes-Stauber i Scherer, 1994; Simmonds *et al.*, 1997; Beukes *et al.*, 2000; Hickey *et al.*, 2003).

1.5. Opšte karakteristike bakteriocina klase II

1.5.1. Biosinteza bakteriocina klase II

Bakterijski “quorum-sensing” trokomponentni sistem je odgovoran za regulisanje sinteze bakteriocina klase IIa (Nes i Eijsink, 1999). Ovaj sistem čine indukcioni peptid (peptidni feromon), transmembranska histidin kinaza (receptor feromona) i citosolni “response” regulator. Indukcioni peptid je ribozomalno sintetisani peptid prisutan u ćeliji u niskoj koncentraciji koji se u spoljašnju sredinu izbacuje putem ABC-transportera koji koristi i odgovarajući bakteriocin (Nes i Eijsink, 1999;

Ennahar *et al.*, 2000). Kada koncentracija indukcionog peptida dostigne određeni prag koncentracije u ekstracelularnoj sredini dolazi do aktiviranja transmembranske histidin kinaze, što dovodi do autofosforilacije konzerviranog histidina sa citosolne strane transmembranskog proteina. Aktivirana histidin kinaza interaguje sa “response” regulatorom tako što fosfatna grupa sa histidin kinaze prenosi na Asp “response” regulatora koji funkcioniše kao transkripcioni aktivator vezivanjem za promotor bakteriocinskog gena, a ujedno aktivirajući i gene koji kodiraju trokomponentni sistem inicirajući pozitivnu povratnu spregu (Nes i Eijsink, 1999; Cho *et al.*, 2001). Pokazano je i da skraćena varijanta genskog regulatora može dovesti do gašenja sinteze bakteriocina (Straume *et al.*, 2007).

1.5.2. Način delovanja bakteriocina klase II

Način delovanja bakteriocina zavisi od primarne strukture bakteriocinskih peptida. Kako je klasifikacija bakteriocina ustanovljena na osnovu primarne strukture, bakteriocini koji pripadaju istoj klasi imaju i slične načine delovanja .

Smatra se da bakteriocini ostvaruju svoju aktivnost posredstvom povećanja permeabilnosti ćelijskih membrana najverovatnije formiranjem selektivnih jonskih pora što dovodi do narušavanja membranskog potencijala kao i pražnjenja intracelularnih depoa ATP-a (Chikindas *et al.*, 1993; Herranz *et al.*, 2001a; Herranz *et al.*, 2001b). Vezivanje bakteriocina klase IIa za površinu target ćelije ostvaruje se elektrostatičkim interakcijama posredstvom N-terminalnih β -naboranih ploča (Chen *et al.*, 1997a, b; Kazazic *et al.*, 2002). Hidrofobni C-terminalni kraj bakteriocina se vezuje za liposome, a pokazano je i da modifikacije u „pediocin box-u“ pored toga što modifikuju bakteriocinsku aktivnost utiču i na interakciju sa lipozomima (Fimland *et al.*, 2006). Ni jedna od dosadašnjih studija ne predlaže strukturu pora koje se formiraju prilikom delovanja bakteriocina, takođe nije poznato ni da li bakteriocini ove klase deluju kao monomeri ili oligomeri. Pokazano je da petnaestomer poreklom sa C-terminalnog kraja pediocina PA-1/AcH inhibira njegovu aktivnost tako što je verovatno u kompeticiji sa pediocinom PA-1/AcH za vezujući receptor na membrani ćelije (Fimland *et al.*, 1998). Predloženo je da bi ulogu receptora mogla da ima manozna permeaza (Hécharde *et al.*, 2001), specifična ekstracelularna petlja membranskog proteina MptC koji je odgovoran za specifično prepoznavanje od strane klase IIa bakteriocina (Kjos *et al.*, 2010).

1.5.3. Mehanizmi rezistencije na bakteriocine klase II

Robichon i saradnici (1997) su pokazali da mutantni soj *List. monocytogenes* koji nosi inaktiviran *rpoN* gen (koji kodira alternativni sigma faktor-sigma54- δ^{54}) pokazuje rezistenciju na delovanje mezentericina Y105, a kasnije je pokazano da i u slučaju vrste *Ent. faecalis* inaktivacija *rpoN* gena dovodi do pojave rezistentnih varijanti (Dalet *et al.*, 2000). Stoga je predloženo da je, bilo direktno ili indirektno, *rpoN* gen uključen u generalni mehanizam senzitivnosti na bakteriocine klase IIa. Takođe je pokazano da direktna mutageneza *mpt* operona, koji je pod kontrolom faktora δ^{54} , i kod vrste *List. monocytogenes* i kod vrste *Ent. faecalis* dovodi do pojave rezistentnih mutanata na dejstvo bakteriocina klase IIa (Dalet *et al.*, 2001; Héchard *et al.*, 2001). Pokazano je da *mpt* operon kodira manoznu permeazu EII^{Man} koja je deo fosfotransferaznog sistema (PTS) uključenog u transport i fosforilaciju šećera i kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Postma *et al.*, 1993). Familija manozna PTS permeaza (man-PTS) sačinjena je od četiri domena IIA, IIB, IIC i IID organizovanih u dve do četiri subjedinice. Citoplazmatični domen koji je uključen u fosforilaciju čine IIA i IIB domeni, dok su IIC i IID domeni uključeni u transport. Ekspresija *mpt* operona indukovana je prisustvom glukoze i manoze, a pokazano je da je nivo ekspresije ovog operona u korelaciji sa senzitivnošću na dejstvo bakteriocina što sugeriše da je EII^{Man} permeaza verovatno target molekul za delovanje bakteriocina klase IIa (Dalet *et al.*, 2001; Héchard *et al.*, 2001). Heterologom ekspresijom *mptACD* operona kao i samog *mptC* gena, poreklom iz *List. monocytogenes*, u rezistentnom soju *Lactococcus lactis*, nakon indukcije *mpt* operona rekombinantni soj *L. lactis* je postao osetljiv na dejstvo različitih bakteriocina klase IIa. Na osnovu ovih rezultata je pretpostavljeno da je subjedinica IIC target molekul za ovu klasu bakteriocina (Ramnath *et al.*, 2004). Za subjedinice IIC i IID man-PTS sistema je pokazano da predstavljaju receptore za nekoliko bakteriocina (Kjos *et al.*, 2009). Ekstracelularna petlja subjedinice IIC man-PTS sistema je odgovorna za specifično prepoznavanje bakteriocina klase IIa, dok je za laktokokcin A, koji pripada klasi IID bakteriocina, pokazano da interaguje i sa subjedinicom IIC (PtnC) i IID (PtnD) (Kjos *et al.*, 2010; Kjos *et al.*, 2011). Uočeno je takođe da postoji korelacija između rezistencije na bakteriocine i modifikacija ćelijske membrane kao što su lipidna kompozicija membrane, količina alanina kao i površinski napon (Vadyvaloo *et al.*, 2002; 2004). Nivo rezistencije na dejstvo bakteriocina varira u

zavisnosti od mehanizama koji je obezbeđuju, tako da je kod listerija uočeno da je nizak stepen rezistencije posledica lipidne kompozicije membrane, dok se visok nivo rezistencije ostvaruje inaktivacijom *mpt* operona. Calvez i saradnici (2007) su identifikovali tri gena uključena u rezistenciju soja *Ent. faecalis* JH2-2 na dejstvo divericina V41 bakteriocina klase IIa, koga produkuje *Carnobacterium divergens* V41, a to su *rpoN* gen, *glpQ* gen koji kodira glicerofosforil diestar fosfodiesterazu (GlpQ) i *pde* gen koji kodira protein sa potencijalnom fosfodiesteraznom funkcijom (PDE).

1.5.4. Imuni proteini bakteriocina klase II

Poznato je od ranije da pediocinu slični bakteriocini produkuju imune proteine koji im pružaju zaštitu od delovanja sopstvenih bakteriocina. Analizom sekvenci poznatih bakterijskih genoma identifikovano je dvadesetak imunih proteina (Fimland *et al.*, 2005). Oni pokazuju visok nivo specifičnosti obezbeđujući imunost samo na delovanje određenog bakteriocina ili eventualno na blisko srodne bakteriocine klase IIa (Fimland *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2005b). Analizom aminokiselinske sekvence mundticina L, uočeno je da se on razlikuje od mundticina KS i enterocina CRL35 samo u četiri aminokiseline lokalizovane na pozicijama 30 (Ile), 31 (Glu), 46 (Lys), i 89 (Ile). (Feng *et al.*, 2009).

Pokazano je korišćenjem hibridnih pediocinu sličnih bakteriocina i hibridnih imunih proteina da C-terminalni region bakteriocina specifično interaguje sa strukturno donekle fleksibilnim C-terminalnim krajem imunog proteina (Johnsen *et al.*, 2005b). Proces samog vezivanja je veoma kompleksan i podrazumeva vezivanje imunog proteina za kompleks bakteriocin-permeaza, blokirajući na taj način povećanu permeabilnost membrane izazvanu delovanjem bakteriocina. Ovakav mehanizam delovanja podrazumeva postojanje varijanti man-PTS receptora, specifičnih za određene sojeve, dovoljno varijabilnih da obezbede vezivanje kako različitih bakteriocina klase IIa tako i velikog broja različitih imunih proteina (Diep *et al.*, 2007). Imuni proteini kategorisani su u tri grupe: A (EntA-im i PedB), B (PisI) i C (ImB2), na osnovu homologije njihovih sekvenci. Pokazano je, nakon analize NMR-om, da imuni protein PisI ima globularnu strukturu u vodenim rastvorima uspostavljenu pomoću četiri antiparalena heliksa (Martin-Visscher *et al.*, 2008). Ovaj način zauzimanja native konformacije smatra se konzerviranim unutar klase IIa imunih proteina. Imuni protein PisI je specifičan po tome što ima duži i fleksibilniji N-terminalni kraj kao i kraći C-

terminalni domen u poređenju sa ImB2 i EntA, a takođe je pokazano i da ne ostvaruje direktnu interakciju sa bakteriocinom piscikokcinom na koji obezbeđuje imunost.

1.5.5. Eksport bakteriocina klase II

Transport bakteriocina kroz citoplazmatičnu membranu obično se ostvaruje pomoću ABC-transportera, transmembranskih translokatora koji predstavljaju deo ATP-vezujućih kaseti, i pomoćnog proteina. ABC-transporteri poseduju N-terminalni proteolitički domen, koji pripada familiji cisteinskih proteinaza, hidrofobni transmembranski domen i ATP-vezujući domen na C-terminalnom kraju (Havarstein *et al.*, 1995). Uloga ABC-transportera u eksportu bakteriocina je dvostruka: a) uklanjanje lider peptida sa N-terminalnog kraja prekursora bakteriocina na poziciji dvostrukog glicina (Gly-Gly) i b) transport obrađenog bakteriocina kroz ćelijsku membranu. Proteolitički domen je odgovoran za vezivanje bakteriocinskih peptida, što uzrokuje hidrolizu ATP-a, što zatim dovodi do konformacione promene transportera koja omogućava proteinaznom domenu isecanje lider peptida bakteriocina koji se eksportuje. Pretpostavlja se da se prepoznavanje između prebakteriocina i N-terminalnog proteolitičkog domena ABC-transportera ostvaruje interakcijom između hidrofobnog ostatka amfifilične alfa-helikalnog lider peptida i hidrofobnog ostatka blizu katalitičkog domena u N-terminalnom proteolitičkom domenu ABC-transportera. Takođe je pokazano da nivo sekrecije i proteolitička efikasnost ABC-transportera zavise u određenoj meri od aminokiselinske sekvence lider peptida (Aucher *et al.*, 2005). Prisustvo tačkastih mutacija u lider peptidu, kao i na poziciji dvostrukog glicina, mogu u potpunosti da blokiraju sekreciju bakteriocina, mada se prisustvo nekih mutacija može tolerisati. Interesantno je da se zamenom dvoglicinskog lider peptida, *sec* zavisnom lider sekvencom kod bakteriocina klase IIa, može ostvariti skoro nepromenjena sekrecija bakteriocina (McCormick *et al.*, 1996; Biet *et al.*, 1998). Geni koji kodiraju ABC-transportere najčešće su deo bakteriocinskog operona, mada mogu biti lokalizovani i u okviru zasebnog operona koji se obično nalaze u blizini bakteriocinskih gena. Pokazano je da nekoliko ABC-transportera može istovremeno da bude prisutno u jednoj ćeliji i specifično prepoznavanje signala je neophodno da bi se osigurao efikasan transport kroz odgovarajući transporter (Davidson i Chen, 2004).

Razlikujemo dve velike grupe bakteriocina za čiji transport je neophodno prisustvo ABC-transportera: a) bakteriocini sa lider peptidom dvoglicinskog tipa (klasa

II bakteriocina i neki lantibiotici) (Havarstein *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996) i b) bakteriocini sa drugačijim lider peptidom koji nije *sec*-zavisan (neki lantibiotici). U slučaju ABC-transportera koji vrše eksport lantibiotika sa drugačijim tipom lider peptida, uklanjanje lider peptida se ostvaruje delovanjem serinske proteaze (kao što je NisP proteaza u nizinskom operonu) (van der Meer *et al.*, 1993).

Pored prethodno opisanog mehanizma transporta bakteriocina, okarakterisan je takođe i transport nekoliko bakteriocina klase II, koji ne poseduju N-terminalni lider peptid ili signalne sekvence (Diep i Nes, 2002), kao što su dvokomponentni bakteriocin L50, enterocin Q, (Cintas *et al.*, 1998; 2000), aurocin A70 (Netz *et al.*, 2001) i LsbB (Gajic *et al.*, 2003).

Za transport bakteriocina klase II veoma je važno prisustvo pomoćnog proteina. Pomoćni proteini verovatno imaju ulogu u eksportu bakteriocina kroz ćelijsku membranu i/ili isecanju lider peptida. Geni koji kodiraju pomoćne proteine obično su lokalizovani u nepostrednoj blizini gena za ABC-transportere. To su hidrofilni proteini koji na N-terminalnom kraju imaju hidrofobni transmembranski domen (van Belkum i Stiles, 1995).

Uloga i značaj prisustva pomoćnog proteina još uvek nisu razjašnjeni. Kod pediocina PA-1 u okviru pediocinskog (*ped*) lokusa okarakterisan je i *pedC* gen koji kodira pomoćni protein čija je uloga verovatno da olakša prolazak bakteriocina kroz ABC-transporter (Rodriguez *et al.*, 2002). Postoje i podaci koji donekle umanjuju značaj prisustva pomoćnog proteina prilikom obrade bakteriocina. U radu Vaughana i saradnika (2003) je pokazano da za obradu i transport sakacina T i sakacina X nije neophodno prisustvo pomoćnog proteina.

Možda najbolje okarakterisan pomoćni protein je LcnD protein uključen u transport laktokokcina, koji poseduje N-terminalni transmembranski domen i ekstracelularno lociran C-terminalni domen (Franke *et al.*, 1996). Varcamonti i saradnici (2001) su pokazali da LcnD u ćelijskoj membrani ostvaruje interakciju sa LcnC proteinom (Hly-B familija ATP-vezujućih kaseti), na osnovu čega je oformljena nova grupa transportnih proteina - proteini koji su fuzionisani sa membranom.

Pored prethodno opisanih mehanizama transporta bakteriocina kroz ćelijsku membranu okarakterisan je i mali broj bakteriocina klase II čiji se eksport odvija preko generalnog, *sec*-zavisnog, sekretornog puta u kome učestvuje kompleks Sec proteina.

Sec-zavisan transport identifikovan je kod klase II bakteriocina kao što su acidocin B (Leer *et al.*, 1995), divergicin A (Worobo *et al.*, 1995), bakteriocin 31 (Tomita *et al.*, 1996), enterocin P (Cintas *et al.*, 1997), laktokocin 972 (Martínez *et al.*, 1999), listeriocin 743A (Kalmokoff *et al.*, 2001), propionicin T1 (Faye *et al.*, 2002), bakteriocin T8 (de Kwaadsteniet *et al.*, 2006) i hiracin JM79 (Sánchez *et al.*, 2007). Ključnu ulogu u *sec*-zavisnoj translokaciji ima N-terminalna signalna sekvenca. Lider peptid se sastoji od četiri domena, pozitivno naelektrisanog N-terminusa, hidrofobnog jezgra (7 do 10 nepolarnih aminokiselina), niza polarnih aminokiselina koji obično počinje sa aminokiselinom koja narušava sekundarnu strukturu i sekvence koju prepoznaje signalna peptidaza prilikom translokacije (van Wely *et al.*, 2001; Herranz i Driessen, 2005).

1.5.6. Genetička organizacija bakteriocina klase II

Da bi bakteriocini klase IIa ostvarili svoje dejstvo obično je neophodno prisustvo četiri gena: strukturnog bakteriocinskog gena (koji kodira prekursor bakteriocina), gena koji kodira imuni protein (koji proizvođača štiti od delovanja sopstvenog bakteriocina), kao i gena koji kodiraju ABC-transporter i pomoćni protein (Nes *et al.*, 1996; Skaugen *et al.*, 2003). Većina bakteriocinskih gena je plazmidno lokalizovana izuzev enterocina A, divercina V41, sakacina P i karnobakteriocina B2 i BM1 (Aymerich *et al.*, 1996; Huhne *et al.*, 1996; Métivier *et al.*, 1998; Quadri *et al.*, 1997). Bakteriocinski geni klase IIa bakteriocina su obično organizovani u okviru jednog ili nekoliko operona. U slučaju pediocina PA-1, plantaricina 423 i koagulina svi geni neophodni za sintezu bakteriocina i njegovu sekreciju lokalizovani su u okviru jednog operona. U drugim slučajevima strukturni i imuni geni čine jedan operon, geni za sekreciju bakteriocina lokalizovani su u drugom operonu, dok treći operon čine geni uključeni u regulaciju sinteze bakteriocina (Ennahar *et al.*, 2000). Međutim, postoje i slučajevi kada geni koji su uključeni u sintezu bakteriocina klase IIa ne samo da nisu lokalizovani u okviru istog lokusa već se nalaze na različitim DNK determinantama. Pokazano je da strukturni i imuni geni, sa jedne strane, i geni za sekreciju, s druge strane, mogu da koegzistiraju u okviru iste ćelije, a pri tome su lokalizovani na različitim plazmidima kao što je slučaj kod *Pediococcus parvulus* ATO77, *Ped. pentosaceus* S34 i *Lb. plantarum* WHE92 (Miller *et al.*, 2005). U slučaju soja *Carn. piscicola* LV17B geni koji kodiraju karnobakteriocin BM1 i njegov imuni protein su

hromozomalno lokalizovani, dok su geni uključeni u regulaciju i sekreciju lokalizovani na plazmidu veličine 61 kb (Quadri *et al.*, 1997).

Takođe je pokazano i prisustvo različitih gena uključenih u sintezu bakteriocina kod sojeva koji nisu proizvođači. Ovi sojevi su posedovali ili samo neke od gena neophodnih za sintezu bakteriocina ili su bili nosioci tačkastih mutacija u ovim genima što je rezultiralo u njihovoj neaktivnosti (Huhne *et al.*, 1996; Moschetti *et al.*, 1996; Tettelin *et al.*, 2001; Moretro *et al.*, 2005; Diep *et al.*, 2006). S druge strane, geni odgovorni za obradu i transport laktokokcina A kod soja *L. lactis* 9B4 su identifikovani na hromozomu kod laktokokcin neprodukujućeg soja *L. lactis* IL1403, a takođe je u nekim slučajevima zabeleženo i prisustvo gena za imunost u različitim sojevima BMK koji ne proizvode bakteriocine (Huhne *et al.*, 1996; Venema *et al.*, 1996). Tettelin i saradnici (2001) su identifikovali sedam potencijalnih bakteriocinskih gena analizom genoma soja *Strep. pneumoniae* TIGR 4 (SP0042, SP0109, SP0531, SP0532, SP0533, SP0539 i SP0541), ali do sada nije detektovana bakteriocinska aktivnost kod ovog soja.

Analiza filogenetskog stabla bakterijskih vrsta ukazuje da se geni koji su uključeni u proizvodnju bakteriocina često prenose horizontalnim transferom, a uočeno je i da pokazuju velike razlike u organizaciji odgovarajućih operona koji ih kodiraju čak i kod blisko srodnih vrsta (Makarova *et al.*, 2006). Dakle, prisustvo ovih gena na različitim lokacijama u genomima sojeva proizvođača kao i sojevima koji ne proizvode bakteriocine može se objasniti njihovim prenosom putem horizontalnog transfera plazmidima ili transpozonomima (Neve *et al.*, 1987; Gabin-Gauthier *et al.*, 1991). Izgleda da lokalizacija bakteriocinskih gena na mobilnim genetičkim elementima pomaže njihovo intra- i inter- filogenetsko širenje među vrstama BMK. Možemo zato pretpostaviti da molekularni sistemi odgovorni za razvijanje antibakterijskog potencijala kod ovih bakterija verovatno odražavaju dugoročno postojanje reda *Lactobacillales* u složenim mikrobiološkim zajednicama (Makarova *et al.*, 2006; Makarova i Koonin, 2007).

1.5.7. Primena bakteriocina

Prečišćeni ili parcijalno prečišćeni, bilo modifikovani ili ne, bakteriocini klase II imaju veliki potencijal da zbog karakteristika koje ispoljavaju budu primenjeni kako u proizvodnji prehrambenih proizvoda tako i u terapeutske svrhe u medicini ili veterini. Njihov potencijal leži kako u načinu inhibitornog delovanja koji ispoljavaju, a koji se

drastično razlikuje od mehanizma delovanja antibiotika, tako i u niskim koncentracijama pri kojima su aktivni. Takođe, do sada ne postoji ni jedan zabeležen slučaj toksičnosti bakteriocina bilo za ljude bilo za životinje niti je pokazano da dolazi do akumulacije bakteriocina u istim organizmima (Belguesmia *et al.*, 2010; Rea *et al.*, 2010). Najviše proučeni i komercijalno dostupan bakteriocin je nizin, a njegova upotreba je dozvoljena u preko 50 zemalja (Delves-Broughton, 2005). Drugi bakteriocini, kao što su pediocini i lakticini, takođe su pronašli primenu u proizvodnji prehrambenih proizvoda (Chen i Hoover, 2003). Bakteriocini su se pokazali kao efikasni i kada su korišćeni kao aditivi, ali i kada su proizvedeni od strane sojeva prisutnih u hrani (Deegan *et al.*, 2006).

Produkcija bakteriocina predstavlja važnu odliku prilikom selekcije sojeva za potencijalne probiotike. Pediocin PA-1 već postoji kao komercijalni proizvod, usled toga što smanjuje broj ćelija *List. monocytogenes* u mlečnim proizvodima, a u toku su i ispitivanja njegovog delovanja u sirovom mesu. Za pediocin PA-1, piscikolin 126 i rekombinantni RV41 je pokazano da deluju pozitivno na zdravlje miševa zaraženih listerijom (Dabour *et al.*, 2009; Rihakova *et al.*, 2010). Veoma interesantni podaci su dobijeni kada su korišćeni bakteriocini u kombinaciji sa antibioticima. Pediocin PA-1 u kombinaciji sa polimiksinom E deluje sinergistički, dolazi do proširenja njegovog spektra delovanja, tako da inhibira i RvA, derivat *List. monocytogenes*, koji je rezistentan na nizin A, RvP, derivat *List. monocytogenes*, koji je rezistentan na pediocin PA-1 kao i derivat *E. coli* RR1 rezistentan na polimiksin E (Naghmouchi *et al.*, 2010; 2011). Neophodno je sprovesti još širi spektar ispitivanja da bi se na kraju komercijalizovala primena bakteriocina klase IIa ili bilo kog drugog bakteriocina kao aditiva hrani ili kao alternative antibioticima.

Identifikacija novih antimikrobnih peptida ne znači samo pronalaženje novih potentnih bakteriocina, jer je pokazano da se antimikrobni potencijal bakteriocina može poboljšati korišćenjem metoda genetičkog inženjerstva. Većina dosadašnjih studija odnosila se na poboljšanje inhibitornog potencijala lantibiotika (Field *et al.*, 2008). Međutim takođe je pokazano da se povećana produkcija i specifična antimikrobna aktivnost enterocina P, bakteriocina klase IIa, može postići heterolognom ekspresijom u soju *L. lactis* (Borrero *et al.*, 2011).

2. CILJ RADA

Bakterije mlečne kiseline (BMK) su poznate po proizvodnji brojnih i različitih bakteriocina. Proizvodnja bakteriocina se smatra dodatnom karakteristikom, usled toga što nije od ključnog značaja za normalan rast bakterija. Postojanje velikog broja sojeva proizvođača bakteriocina objašnjava se činjenicom da su bakteriocinske genetičke determinante često locirane na mobilnim genetičkim elementima, kao što su konjugativni plazmidi ili transpozoni, što omogućava njihovu široku distribuciju putem horizontalnog transfera gena. Analiza bakterijskih genoma korišćenjem različitih molekularnih tehnika omogućava utvrđivanje rasprostranjenosti okarakterisanih bakteriocinskih gena kao i identifikaciju potencijalnih bakteriocinskih gena i novih bakteriocina nezavisno od toga da li je analizirani bakterijski soj identifikovan kao proizviđač bakteriocina.

Imajući sve navedeno u vidu ciljevi ovog rada su bili:

1. Utvrđivanje antimikrobnog potencijala sojeva *Lactobacillus casei/paracasei* grupe;
2. Rasprostranjenost genetičkih determinanti neophodnih za sintezu bakteriocina BacSJ i acidocina 8912;
3. Utvrđivanje korelacije prisustva bakteriocinskih gena i proizvodnje bakteriocina;
4. Restauracija sposobnosti sinteze bakteriocina heterolognom ekspresijom gena uključenih u transport bakteriocina;
5. Biohemijska karakterizacija bakteriocina BacUB9 koji sintetiše soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9 i bakteriocina BacGR koji sintetiše soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGGR2-66;
6. Izolovanje bakteriocina, BacUB9 i BacGR;
7. Određivanje lokacije gena odgovornih za sintezu bakteriocina BacUB9 i BacGR.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bakterijski sojevi

Bakterijski sojevi korišćeni u ovom radu navedeni su u Tabeli 1 i Tabeli 2.

Tabela 1. Prirodni izolati i referentni sojevi *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* korišćeni u radu.

Bakterijski soj	Poreklo/fenotip/genotip	Izvor ili referenca
BGSJ2-8	Izolat iz sira, BacSJ ⁺ , BacSJ ^{Im}	Topisirović <i>et al.</i> , 2006
BGUB9	Izolat iz sira, BacUB9 ⁺ , BacUB9 ^{Im}	Tolinački <i>et al.</i> , 2010
BGUB9-96	Bac ⁻ derivat BGUB9, BacUB9 ^S	Tolinački <i>et al.</i> , 2010
BGGR2-66	Izolat iz sira, BasGR ⁺ , BacGR ^{Im} , BacSJ ^S	Lab. kolekcija
BGGR2-66-88	Bac ⁻ , derivat BGGR2-66	Ovaj rad
BGNK1-62	Izolat iz sira	Lab. kolekcija
BGNK1-62-8	BacSJ ⁺ , BacSJ ^{Im} , derivat BGGR2-66, pA2A	Ovaj rad
BGHN14	Izolat iz sira	Kojic <i>et al.</i> , 1991a
BGHN14-297	Bac ⁺ , derivat BGHN14, pAZILSJbac	Ovaj rad
BGKP20	Izolat iz sira	Lab. kolekcija
LMG10774 ^a	Izolat iz cerebrospinalne tečnosti	BCCM/LMG kolekcija
LMG19719 ^a	Izolat iz krvi	BCCM/LMG kolekcija
LMG13552 ^a	Izolat iz ementaler sira	BCCM/LMG kolekcija
LMG11459 ^a	Izolat iz dentalnog karijesa	BCCM/LMG kolekcija
B-4560 ^b	Izolat iz mašine za mleko	NRRL kolekcija
B-4564 ^b	Izolat iz dečije salive	NRRL kolekcija

BacSJ⁺ - soj koji proizvodi bakteriocin BacSJ; Bac⁻ - soj koji ne proizvodi bakteriocin; BacSJ^{Im} - soj imun na dejstvo bacteriocina BacSJ; BacSJ^S - soj senzitiv na dejstvo bacteriocina BacSJ; BacUB9⁺ - soj koji proizvodi bakteriocin BacUB9; BacUB9^{Im} - soj imun na dejstvo bacteriocina BacUB9; BacUB9^S - soj senzitiv na dejstvo bacteriocina BacUB9.

^aBelgian Coordinated Collections of Microorganisms/LMG Bacteria Collection;

^bAgricultural Research Service Culture Collection (NRRL), USA.

Materijal i metode

Pored navedenih sojeva BMK (Tabela 1) u ovom radu su korišćeno je još 40 sojeva predstavnika *Lactobacillus casei/paracasei* grupe izolovanih iz sira ili kajmaka.

Tabela 2. Bakterijski sojevi korišćeni u radu isključivo kao indikatori u bakteriocinskim testovima

Bakterijski soj	Poreklo/fenotip	Izvor ili referenca
<i>Lb. plantarum</i> ATCC14917 ^c A112	Izolat iz kiselog kupusa	ATCC kolekcija Vujčić i Topisirović, 1993
BGAN8 <i>Lb. rahmnosus</i> BGEN1		Lab. kolekcija
<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^{Td}	Starter za pirinčano vino	Lab. kolekcija JCM kolekcija
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGMN1-596	Bac ⁻ derivat BGMN1-5, Bac ^s	Gajic <i>et al.</i> , 1999
MG1363	Bac ^s derivat NCDO712	Gasson, 1983
IL1403	Bac ^{Im} derivat IL594	Chopin <i>et al.</i> , 1984
BGIS29	Izolat iz sira, Bac ⁺	Miladinov <i>et al.</i> , 2001
ATCC19435 ^{Tc}		ATCC kolekcija
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NS1		Kojic <i>et al.</i> , 1991b
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 ^c JCM 5803 ^{Td}	Izolat iz urina	ATCC kolekcija JCM kolekcija
<i>Streptococcus pyogenes</i> A443 A337		Lab. kolekcija Lab. kolekcija Lab. kolekcija
<i>Strep. pneumoniae</i> 25		JCM kolekcija
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885 ^{Td}	Izolat iz "sake"-a	JCM kolekcija
<i>Ped. dextranicus</i> JCM 5887 ^{Td}	Izolat iz silaže	JCM kolekcija
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 ^c	Klinički izolat	ATCC kolekcija
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 ^c		ATCC kolekcija
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC10240 ^c	Izolat iz vazduha	ATCC kolekcija
<i>Proteus vulgaris</i> 246		Lab. kolekcija
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB9111 ^e		NCIMB kolekcija
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090 ^{Tc}	Izolat iz mozga krave	ATCC kolekcija
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 ^c	Izolat iz krvi	ATCC kolekcija
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922 ^c	Klinički izolat	ATCC kolekcija

Bac⁺ - soj koji proizvodi bakteriocin; Bac⁻ - soj koji ne proizvodi bakteriocin; Bac^s- soj senzitiv na dejstvo bacteriocina; Bac^{Im} - soj imun na dejstvo bacteriocina.

^cAmerican Type Culture Collection/ATCC Collection; ^dJapan Collection of Microorganisms, RIKEN BRC which is participating in the National BioResource Project of the MEXT, Japan/JCM kolekcija mikroorganizama; ^eUK's National Collection of Industrial Bacteria/NCIMB.

Materijal i metode

Za propagaciju plazmida i konstrukciju plazmidne biblioteke plazmida soja BGUB9 i BGGR2-66 korišćen je soj *Escherichia coli* DH5 α (*supE44*, Δ *lacU169* (Δ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *andA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) (Hanahan, 1983), a soj *E. coli* JM110 (*rpsL* (Str^r) *thr*, *leu*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*⁻, *dcm*⁻, *supE44* Δ (*lac-proAB*) (F['], *traD36*, *proAB*, *lacIqZ* Δ M15)) kome nedostaju obe metilaze (Dam i Dcm) korišćen je za propagaciju plazmida koji su sećeni restrikcionim enzimima senzitivnim na metilaciju (Palmer i Marinus, 1994).

3.2. Korišćeni plazmidi

Plazmidi korišćeni u ovom radu navedeni su u Tabeli 3.

Tabela 3. Spisak korišćenih i konstruisanih plazmida

Plazmid	Relevantne karakteristike	Izvor ili referenca
pGEM-T Easy Vector	3015 bp, Amp ^r , bakterijski, tranzijentni vektor sa visokim nivom ekspresije	Promega
pG1	6485 bp, derivat pGEM-T Easy vektor-a nosi kloniran <i>PstI-SphI</i> fragment sa <i>abcT</i> i <i>acc</i> genima (3470 bp)	Ovaj rad
pA13	4601 bp, Em ^r , <i>lacZ</i> , derivat plazmida pA1, "shuttle" vektor, replikuje u laktokokama/laktobacilima/ <i>E. coli</i>	Kojic <i>et al.</i> , 2010
pA2A	8071 bp, derivat pA13 plazmida, nosi <i>PstI-SphI</i> fragment iz pG1 vektora	Ovaj rad
pPCR-ScriptAmpSK(+)	3000 bp, Amp ^r , pBluescript II SK(+) vektor za kloniranje PCR produkata	Agilent technologies
pPCR1	4480 bp, derivat pPCR-ScriptAmpSK(+), nosi kloniran PCR fragment sa <i>repB</i> genom iz pSJ2-8 plazmida	Ovaj rad
pAZIL	7109 bp, Em ^r , <i>lacZ</i> , replikuje u laktokokama i <i>E. coli</i>	Kojic <i>et al.</i> , 2011
pAZILSJ	8589 bp, derivat vektora pAZIL, nosi kloniran <i>BclI</i> fragmrnt iz pPCR1 vektora	Ovaj rad
pAZILSJbac	derivat vektora pAZILSJ, nosi <i>BamHI</i> fragmrnt iz plazmida soja BGGR2-66	Ovaj rad
pAZILSJcos	9674 bp, derivat pAZILSJ vektora, sa <i>cos</i> mestom	Ovaj rad

Em^r - rezistencija na eritromicin; Amp^r – rezistencija na ampicillin.

3.3. Medijumi za kultivisanje bakterija

Za kultivisanje laktobacila korišćen je MRS tečni medijum (Merck GmbH Darmstadt, Germany) koji sadrži: bako-proteinazni pepton (10 g/l), mesni ekstrakt (8 g/l), ekstrakt kvasca (4 g/l), Tween 80 (1 g/l), amonijum-citrat (2 g/l), natrijum-acetat (5 g/l), magnezijum-sulfat (0,2 g/l), mangan-sulfat (0,04 g/l), natrijum-fosfat (2 g/l) i glukozu (20 g/l). Bakterije su gajene na 37°C, u mikroaerofilnim ili anaerobnim uslovima.

Za kultivisanje *Lactococcus lactis*, *Streptococcus*, *Pediococcus* i *Enterococcus* sojeva korišćen je GM17 tečni medijum (Merck GmbH Darmstadt, Germany) koji sadrži: polipepton (5 g/l), fitopepton (5 g/l), mesni ekstrakt (5 g/l), ekstrakt kvasca (2,5 g/l), L-askorbinsku kiselinu (0,5 g/l), magnezijum-sulfat (0,25 g/l), Na-β-glicerofosfat (19 g/l) i glukozu (5 g/l), pH6,8. Temperatura kultivacije je bila 30°C.

Za kultivisanje *E. coli* i *P. aeruginosa* sojeva korišćen je LB (Luria-Bertani broth) (Miller, 1972) medijum koji sadrži: tripton (10 g/l), ekstrakt kvasca (5 g/l) i NaCl (5 g/l). Bakterije su gajene na temperaturi od 37°C uz aeraciju. Sojevi *E. coli* transformisani odgovarajućim vektorom su gajeni u LB medijumu sa odgovarajućim antibiotikom (eritromicinom, 300 µg/ml ili ampicilinom 100 µg/ml). Za selekciju kloniranih fragmenata (plavo-belu selekciju) u *E. coli* DH5α i JM110 korišćen je X-Gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil-b-d-galaktopiranozid) koji je dodavan u medijum za rast u standardnoj koncentraciji od 20 µg/ml.

Za kultivisanje sojeva listerija i streptokoka korišćen je tečni BHI (Brain heart infusion) (Rosenow, 1919; Hayden, 1923) koji je sadržao dehidratisanu infuziju svinjskog moždanog i srčanog tkiva. Temperatura za kultivisanje bakterija bila je 37°C.

Za kultivisanje *B. subtilis* korišćen je "Columbia agar" sa dodatkom 5% konjske krvi (Torlak). Temperatura kultivacije je bila 30°C.

Odgovarajuće čvrste podloge su dobijane dodavanjem 1,5% agara u tečni medijum. Svi medijumi sterilisani su u autoklavu u trajanju od 15 min na 121°C. Sojevi BMK su čuvani u odgovarajućem medijumu za rast sa 15% glicerola na - 80°C.

3.4. Metode rada sa bakterijama

3.4.1. Metode izolovanja i determinacije sojeva

Sojevi predstavnici *Lb. casei/paracasei* grupe analizirani u ovom radu izolovani su iz fermentisanih mlečnih proizvoda (različite vrste sireva i kajmak) proizvedenih u domaćinstvima, klasičnom mikrobiološkom izolacijom. Sojevi su zatim determinisani putem mikrobiološko-biohemijskih testova po Collins-u i Lyne-u (1976), i korišćenjem metoda molekularne determinacije (videti Materijal i metode, 3.5.3. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom i 3.5.4. Sekvenciranje DNK).

3.4.2. Određivanje broja kolonija („CFU- Colony Forming Units“)

Ukupan broj živih bakterija određivan je tako što su ćelije gajene u odgovarajućem medijumu, aerobno na temperaturi 30°C u trajanju od 48 sati. Tokom ovog perioda bakterijske ćelije su u prvih 6 sati nakon svakog sata, a zatim nakon 24 i 48 sati obarene centrifugiranjem (13000 rpm, 10 min, + 4°C centrifuga 5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i zatim oprane dva puta u 0.9% NaCl. Broj živih ćelija (CFU/ml) određen je utrljavanjem po 100 µl određenog serijskog razblaženja uzorka (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) na čvrtsti MRS agar. Bakterije su rasle aerobno na adekvatnoj temperaturi tokom 48 sati dajući kolonije na Petri šoljama. Nakon izrastanja kolonije su prebrojavane i CFU je određen na sledeći način:

br. ćelija/ml prekončne kulture = br. izraslih kolonija x $(1/10^{-2})$ x $(1/\text{razblaženje})$

3.4.3. Detekcija proizvodnje vodonik peroksida (H_2O_2) u bakterijama

Merenje proizvodnje H_2O_2 u bakterijama rađeno je po metodi Eschenbach i saradnika (1989). Bakterije su sterilnom čačkalicom zasejavane na MRS Petri šolje koje su sadržale 5 mg 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) hromogenog supstrata peroksidaze, i 0,02 mg peroksidaze rena (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Peroksidaza generiše O_2 od H_2O_2 kod laktobacila koji ga proizvode i zahvaljujući prisustvu TMB boji kolonije u plavo. Nakon 48 sati inkubacije u mikroaerofilnim uslovima (Anaerocult[®] A, Merck, GmbH Dermstadt, Germany) kolonije koje proizvode H_2O_2 na MRS agaru postaju tamno plave dok one koje ne proizvode ostaju bele.

3.4.4. Čišćenje plazmida iz laktobacila

Čišćenje plazmida iz sojeva laktobacila rađeno je istovremenom primenom povišene temperature (42°C) i subletalne koncentracije antibiotika novobiocina (8 i 10 µg/ml). Da bi se izbegao letalni efekat sintetisanog bakteriocina na ćelije koje su izgubile plazmid, ukoliko su geni za sintezu i imunost na bakteriocin plazmidno lokalizovani, prekonocna kultura tretiranog soja je razblažena svežim medijumom za rast koji je sadržavao subletalnu koncentraciju novobiocina (8 i 10 µg/ml) u zapreminskom odnosu tako da se postigne broj od 10^3 ćelija/ml medijuma. Ćelije su inkubirane ukupno 12 sati na 42°C, a na svaka 2 sata im je menjan medijum za rast tako što su centrifugirane (4000 rpm, 15 min, sobna temperatura (RT), klinička centrifuga 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Talog bakterija je resuspendovan u istom volumenu svežeg medijuma koji je sadržavao novobiocin (8 i 10 µg/ml). Nakon poslednjeg tretmana, alikvoti kulture (100 µl) su utrljavani na petri šolje i gajeni na optimalnoj temperaturi za rast soja (30°C). Bakteriocinski test je korišćen da bi se utvrdilo da li su neke kolonije izgubile sposobnost sinteze bakteriocina.

3.4.5. Metode izolacije DNK iz bakterija

3.4.5.1. Metoda za brzo izolovanje totalne DNK iz laktobacila

Totalna DNK iz laktobacila izolovana je po modifikovanoj metodi koju su opisali Hopwood i saradnici (1985). Za pranje taloga bakterijskih ćelija (dobijenog centrifugiranjem bakterija iz 5 ml logaritamske faze kulture ($OD_{600nm}=0,6-0,8$)) korišćeno je 500 µl TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA pH8, 50 mM NaCl). Oprane ćelije su resuspendovane u 500 µl PP pufera (0,5 M saharoze, 40 mM NH_4 -acetata, 10 mM Mg-acetata, pH7) sa lizozimom u finalnoj koncentraciji od 8 mg/ml. Ćelijska suspenzija je zatim inkubirana dok ćelije nisu postale translucetne (prosečno 30 min na 37°C), nakon čega je u suspenziju dodavano 250 µl 2% SDS-a uz intenzivno mešanje na vorteksu dok viskozitet ne bi postao primetno manji (prosečno u trajanju od 1 min). Uklanjanje proteina rađeno je višestrukom fenolskom ekstrakcijom (prosečno 3 puta) do potpunog gubitka međufaze. Svaki put je dodavano 250 µl neutralnog fenol-hloroforma, a rastvor je intenzivno mešan u trajanju od 30 sek i centrifugiran (13000 rpm, 2 min, RT, centrifuga 5415D). U pažljivo sakupljen supernatant dodavana je 1/10 volumena 3 M Na-acetata i 1 volumen izopropanola, a zatim je lagano mešan i inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi. Ukupna DNK je

taložena centrifugiranjem (13000 rpm, 2 min, RT, centrifuga 5415D). Talog totalne DNK je ispitiran od viška soli dodavanjem hladnog etanola (75%, -20°C), centrifugiran (13000 rpm, 2 min, RT, centrifuga 5415D), sušen i resuspendovan u 50 µl bidestilovane vode. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1 µl RNaze (10 mg/ml) na 37°C u trajanju od 30 min. Ovako izolovana DNK je stabilna i pogodna za digestiju restrikcionim enzimima.

3.4.5.2. Metoda za izolovanje velikih količina totalne DNK iz laktobacila

Totalna DNK iz laktobacila izolovana je prema metodi koju su opisali Anderson i McKay (1983). Za pranje taloga bakterijskih ćelija (dobijenog centrifugiranjem bakterija iz 500 ml logaritamske faze kulture ($OD_{600nm}=0,6-0,8$)) korišćeno je 5 ml TEN pufera. Talog je zatim je resuspendovan u 12,5 ml STE pufera (6,7% saharoza, 50 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8) i inkubiran na 37°C. Dodavan je lizozim u finalnoj koncentraciji od 7 mg/ml i suspenzija je inkubirana 10 min na 37°C. Zatim je dodavano 3,15 ml rastvora 0,25 M EDTA i 50 mM Tris-HCl pH8, a potom i 0,9 ml 20% SDS. Nakon toga vršeno je intenzivno mešanje na vorteksu dok viskozitet rastvora nije postao приметно manji (prosečno u trajanju od 1 min). Posle ovog koraka sledila je inkubacija 10 min na 37°C, a nakon toga je dodavan 1 ml 3 M NaOH. Posle blagog mešanja u lizat je dodavan i 1,65 ml 2 M Tris-HCl pH7. Kad je smeša dobro izmešana dodavano je 2,4 ml 5M NaCl, a zatim je centrifugirana (10000 rpm, 30 min, +4°C, centrifuga Sorvall RC-5B, SS34 rotor). Dobijeni supernatant je pažljivo prebačen u čiste falkon epruvete, dodavana je jedna zapremina fenol-hloroforma, intenzivno mešana, a zatim je centrifugirana (5000 rpm, 15 min, +4°C, klinička centrifuga 5804R). Dobijeni supernatant je prebačen u čiste falkon epruvete i precipitiran sa 1 volumenom izopropanola preko noći na +4°C. Nakon centrifugiranja (5000 rpm, 20 min, +4°C, klinička centrifuga 5804R) talog je ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C, 20ml), osušen i resuspendovan u bidestilovanoj vodi. RNK je odstranjivana inkubacijom sa RNK-azom (100 µl, 10 mg/ml) u trajanju od 60 min na 37°C.

3.4.5.2.1. Prečišćavanje totalne DNK u gradijentu CsCl

Na mililitar rastvora DNK, dobijenog u procesu izolacije (Anderson i McKay, 1983), dodavan je 1 g čvrstog CsCl i rastvor etidijum bromida (0,4 ml, koncentracije 10 mg/ml). Ovaj rastvor je prenošen u epruvete za Beckman Ti50 rotor. Izopikničko razdvajanje plazmidne i hromozomalne DNK ostvareno je centrifugiranjem (45000 rpm,

48 sati, + 4°C, Beckman ultracentrifuga. rotor Ti50). Pod UV svetlom su se nakon centrifugiranja mogle videti dve fluorescirajuće trake: gornja, koja sadrži hromozomalnu DNK i donja, u kojoj se nalazi kovalentno zatvorena, cirkularna forma plazmidne DNK. Željene trake hromozomalne i plazmidne DNK su vađene iz epruveta tako što je zid epruvete probušen nešto ispod nivoa trake, sadržaj trake je izvlačen špricom i prebacivan u čiste mikrotube. Iz ovako dobijenog rastvora DNK etidijum bromid je ekstrahovan korišćenjem izoamil alkohola (u odnosu zapremina 1:1), a CsCl dijaliziranjem u 3 puta većoj zapremini bidestilovane vode.

3.4.5.3. Metode za izolovanje plazmidne DNK iz laktobacila

3.4.5.3.1. Mini metode za izolovanje velikih plazmida iz laktobacila

Autohtoni plazmidi iz laktobacila su izolovani po prethodno opisanoj proceduri (O'Sullivan i Klaenhammer, 1993). Za pranje taloga bakterijskih ćelija (dobijenog centrifugiranjem bakterija iz 10 ml logaritamske faze kulture ($OD_{600nm}=0,6-0,8$)) korišćeno je 500 µl TEN pufera. Talog je nakon pranja resuspendovan u 200 µl 25% saharoze sa lizozimom u finalnoj koncentraciji od 30 mg/ml. Tako dobijena ćelijska suspenzija je inkubirana 1 sat na 37°C, zatim je u nju dodavano 400 µl sveže napravljenig alkalnog rastvora SDS-a (3% SDS, 0,2 M NaOH), nakon čega je sledila inkubacija 7 min na sobnoj temperaturi. Posle dodavanja 300 µl 3 M Na-acetata, pH4,8, ohlađenog na ledu, uzorci su ohlađeni 10 min na -20°C, a zatim centrifugirani (13000 rpm, 20 min, RT, Eppendorf centrifuga 5424). Supernatant je prebacivan u nove mikrotube uz dodavanje 650 µl izopropanola, a zatim centrifugiran (13000 rpm, 15 min, RT, Eppendorf centrifuga 5424). Dobijeni talog je nakon sušenja resuspendovan u 320 µl vode i smeši je dodavano 200 µl 7,5 M NH₄-acetata sa 0,5 mg/ml etidijum bromida, a zatim i 350 µl smeše fenol-hloroforma. Ovako dobijena smeša je dobro promešana na vorteksu i centrifugirana (13000 rpm, 10 min, RT, Eppendorf centrifuga 5424). Gornja (vodena) faza je prebacivana u nove mikrotube, a DNK iz rastvora je precipitirana dodavanjem hladnog etanola (96%, -20°C) i centrifugiranjem (13000 rpm, 20 min, RT, Eppendorf centrifuga 5424). Uzorak je zatim ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiran (13000 rpm, 5 min, RT, Eppendorf centrifuga 5424), a talog je nakon odstranjivanja etanola sušen u Speed Vac-u i resuspendovan u 20 µl bidestilovane vode. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1 µl RNaze (10 mg/ml) na 37°C u trajanju od 30 min.

3.4.5.3.2. Mini metode za izolovanje plazmida iz laktobacila i *E. coli*

Za izolaciju plazmida iz transformisanih laktobacila i *E. coli* korišćena je modifikacija "JETstar" protokola. Talog ćelija (10 ml u slučaju laktobacila i 3 ml u slučaju *E. coli*) iz logaritamske kulture bakterija ($OD_{600}=0,6-0,8$) je opran u TEN puferu i resuspendovan u 200 μ l E1 rastvora (50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA pH8) sa RNazom (finalne koncentracije 100 μ g/ml) i lizozimom u finalnoj koncentraciji od 4 mg/ml. Zatim je rađena ćelijska liza (posle inkubacije 30 min na 37°C, u slučaju laktobacila, i odmah nakon dodavanja E1 kod *E. coli*) dodavanjem je 200 μ l rastvora E2 (200 mM NaOH, 1% SDS), uz lagano mešanje do homogenizacije lizata, u trajanju od 2 do 5 min. Nakon homogenizacije rađena je neutralizacija dodavanjem 200 μ l rastvora E3 (3,1 M K-acetat pH5,5) uz intenzivno mešanje. Smeša je zatim centrifugirana (13000 rpm, 10 min, RT, Eppendorf centrifuga 5424). Dobijeni supernatant je prebacivan u nove mikrotube, dodavano je 200 μ l smeše fenol-hloroforma uz intezivno mešanje u trajanju od 1 min. Posle centrifugiranja (13000 rpm, 2 min, RT, Eppendorf centrifuga 5424) gornja (vodena) faza je prebacivana u nove mikrotube, a DNK iz rastvora je precipitirana dodavanjem jednog volumena izopropanola i centrifugiranjem (13000 rpm, 20 min, RT, Eppendorf centrifuga 5424). Uzorak je zatim ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C) i centrifugiran (13000 rpm, 5 min, RT, Eppendorf centrifuga 5424), a talog je nakon odstranjivanja etanola sušen u Speed Vac-u i resuspendovan u 20 μ l bidestilovane H₂O. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1 μ l RNaze (10 mg/ml) na 37°C u trajanju od 30 min.

Izolaciju plazmida iz *E. coli* koji su korišćeni za sekvenciranje rađena je „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) kitom po uputstvu proizvođača.

3.5. Enzimske reakcije sa DNK

3.5.1. Sečenje DNK restrikcionim enzimima

Sečenje restrikcionim enzimima (Maniatis *et al.*, 1982) je rađeno u komercijalno proizvedenom 1 x Tango™ puferu (33 mM Tris-acetat, 10 mM Mg-acetat, 66 mM K-acetat, 0,1 mg/ml BSA). Uslovi za sečenje DNK restrikcionim enzimima, količina enzima, pufer i temperatura inkubacije, određivani su prema uputstvu proizvođača (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija).

3.5.2. Ligacija DNK fragmenata

Ligacija fragmenata DNK (Maniatis *et al.*, 1982) rađena je mešanjem DNK fragmenta i vektora sa komplementarnim lepljivim krajevima u ligacionom puferu (50 mM Tris-HCl, pH7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 1 mM ATP) sa 1U T4 DNK ligaze (Agilent Technologies, SAD) u odgovarajućem odnosu u finalnoj zapremini od 20 µl i inkubiranjem 16 sati na 16°C.

3.5.3. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom („Polymerase Chain Reaction“)

Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom rađeno je tako što je pripremljena reakciona smeša koja sadrži: 1 x reakcioni pufer KAPA *Taq* Buffer A sa 1,5 mM MgCl₂, u koji je dodata dNTP smeša (svaki dNTP po 200 µM), prajmeri (svaki po 2,5 µM) i 1U KAPA *Taq* DNA Polimeraze (Kapa Biosystems, Inc., Boston, MA, USA). Količina DNK matrice u eksperimentima bila je 1 ng.

PCR reakcija u kojoj je korišćen (GTG)₅ prajmer (Versalovic *et al.*, 1994) 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.

Za umnožavanje dela gena za 16S rRNK korišćeni su prajmeri UNI16SF i UNI16SR. PCR reakcija je rađena po sledećem programu: početna denaturacija 7 min na 94°C, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 30 sek na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 55°C, polimerizacija 30 sek na 72°C; poslednji ciklus polimerizacija 7 min na 72°C.

PCR reakcije u kojoj su korišćeni prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence poreklom iz bakteriocinskih gena rađena je po sledećem programu: početna denaturacija 5 min na 94°C, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 30 sek na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na različitim temperaturama (Tabela 4), polimerizacija 30 sek na 72°C; poslednji ciklus polimerizacija 7 min na 72°C.

Materijal i metode

Tabela 4. Sekvence prajmera korišćenih u ovom radu*

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera 5' - - 3'	Temperatura vezivanja prajmera	Referenca
Prajmeri za 16S rDNK			
UNI16SF	GAGAGTTTGATCCTGGC	50°C	Jovčić <i>et al.</i> , 2009
UNI16SR	AGGAGGTGATCCAGCCG		
Prajmer za repetivne sekvence			
GTG ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	50°C	Versalovic <i>et al.</i> , 1994
Prajmeri za <i>bacSJ2-8/bacSJ2-8i</i> operon			
F0 BacSJ	GGGGTGTGACTTTTTTGGC	50°C	Kojic <i>et al.</i> , 2010 Ovaj rad
R4 BacSJ	GATACCGTTCCAGAGATTC		
Prajmeri za <i>acdT</i> gen			
F1 <i>acdT</i>	TATGAAAAGTACTACTAT	39°C	Kojic <i>et al.</i> , 2010
R1 <i>acdT</i>	AATACGAAGGCTTTCCCAGA		
Prajmeri za <i>abcT</i> gen			
PF	CCATTACTGAGCGC	43°C	Ovaj rad
PRBamN	CGGGATTCAAACGGCTAG		
Prajmeri za <i>acc</i> gen			
PFPst	AACTGCAGGCTAGCACTAACA	45°C	Ovaj rad
PR	CTTAGCAGATGGTCG		
Prajmeri za fragment koji nosi <i>abcT</i> i <i>acc</i> gene			
PFPst	AACTGCAGGCTAGCACTAACA	55°C	Ovaj rad
PRBamN	CGGGATTCAAACGGCTAG		

*Sekvence koje prepoznaju restrikcioni enzimi su podvučene

3.5.4. Sekvenciranje DNK

Plazmidi izolovani iz *E. coli* korišćenjem „QIAprep Spin Miniprep Kit-a“ i PCR produkti koji su prečišćeni propuštanjem kroz kolonice „QIAquick PCR Purification KIT/250“ (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka), slati su na sekvenciranje u servis za sekvenciranje Macrogen, Seul, Koreja i Macrogen, Amsterdam, Holandija. Dobijene sekvence su upoređivane uz pomoć NCBI baze podataka, "BLAST" programom (Altschul *et al.*, 1997) za pretraživanje homologe nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.6. Elektroforeza i elucija DNK

3.6.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza totalne DNK, plazmidne DNK i PCR-om umnoženih fragmenata rađena je na 1% ili u slučaju rep-PCR-om umnoženih DNK fragmenata na horizontalnim 1,5% agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u 1 x TAE puferu (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH8) uz dodavanje etidijum bromida

(0,5 µg/ml). Za elektroforezu je korišćen 1 x TAE pufer. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela, a u slučaju rep-PCR-om umnoženih DNK fragmenata 20 sati na + 4°C, pri konstantnom naponu od 60 V.

Veličine analiziranih linearnih fragmenata su određivane upoređivanjem dužine pređenog puta dobijenih fragmenata u odnosu na dužinu puta koju su prešli DNK fragmenti poznate veličine. Korišćen je sledeći DNK standard „Gene Ruler™ DNA 1 kb Ladder Mix” (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania).

3.6.2. Elucija DNK fragmenata

Elucija restrikcionijskih kao i DNK fragmenata dobijenih PCR metodom rađena je tako što je nakon preparativne elektroforeze isecan deo agaroznog gela u okviru koga se nalazio fragment DNK željene dužine, a zatim je za eluciju željenih fragmenata korišćen QIAquick Gel extraction kit/250 po protokolu za „MiniElute Gel Extraction“ (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka).

3.7. DNK/DNK hibridizacija („Southern Blot”)

3.7.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane

Nakon završene elektroforeze rađen je transfer plazmidne DNK u cirkularnoj formi i plazmida sečenih restrikcionim enzimima na najlonske membrane po metodi koju je opisao Southern (1975). Agarozni gel je tretiran sa 0,25 M HCl u trajanju od 15 min, da bi se ostvarilo delimično prekidanje molekula DNK uzrokovano depurinacijom. Gel je zatim ispiran u bidestilovanoj vodi, a denaturacija DNK je rađena potapanjem gela 2 puta po 15 min u denaturacioni rastvor (0,5 M NaOH i 1,5 M NaCl). Pre transfera gel je neutralisan potapanjem 2 puta po 20 min u neutralizacioni pufer (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, finalno pH7,5). Sledeći korak podrazumevao je pripremu listova „Whatman 3 MM” filter papira odgovarajućih dimenzija, većih od gela. Najlonska membrana („SensiBlot™ Olus Nylon Membrane”, Fermentas UAB, Lituanija), na koju će DNK biti prenet, kao i dva lista 3 MM papira potapani su na kratko u 20 x SSC puferu (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat, finalno pH7). Na 3 MM papir, je stavljan tretiran gel, tako da je strana sa DNK bila okrenuta na gore, a oko gela su postavljeni graničnici. Preko gela je stavljena najlonska membrana dimenzija kao i sam gel i preko nje još dva 3 MM papira navlažena u 10 x SSC puferu. Pri stavljanju papira vođeno je računa da mehurići vazduha ne ostanu zarobljeni između papira. Na kraju je preko svega stavljen

10 cm debeo sloj upijajućeg papira i sve je ravnomerno opterećeno tegom od 1 kg. Transfer je vršen preko noći u 20 x SSC puferu.

Posle završenog transfera najlonska membrana je skinuta i dva puta potopljena u 5 x SSC pufer u trajanju od 5 min. Fiksiranje DNK za membranu je rađeno tako što je prosušena membrana stavljena između dva 3 MM papira i pečena 2 sata na temperaturi od 80°C u pećnici.

3.7.2. Obeležavanje probe sa digoksinom-DUTP-om

„DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) korišćen je za obeležavanje DNK probe. Obeležavanje se ostvaruje hibridizacijom „random” oligonukleotida za denaturisanu DNK probu (“random primed labelling”). Komplementarni lanac DNK se sintetiše pomoću „Klenow”-og enzima koji koristi 3'(OH) kraj „random” oligonukleotida kao prajmer i mešavine deoksionukleotida sa digoksinom (DIG-11-dUTP) za produžavanje lanca DNK. DIG-11-dUTP se ugrađuje u novosintetisanu DNK na svakih 20-25 nukleotida. U 1 µg probe (PCR proizvod) je dodata smeša koja se sastoji od: 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, pH7,5), 2 µl mešavine heksanukleotida (10 puta koncentrisan) i „Klenow” enzim za obeležavanje (2 U/µl), a finalna zapremina do 15 µl podešena je sa bidestilovanom vodom. Dobijena smeša je promešana, kratko centrifugirana i inkubirana preko noći na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 µl 0,2 M EDTA, pH8. Pre hibridizacije proba se prvo precipitira etanolom (96%, -20°C) da bi se oslobodila od neugrađenih nukleotida, nakon čega je denaturisana kuvanjem 10 min na temperaturi od 100°C, a zatim prebačena na led do narednog koraka hibridizacije. Na ovaj način je dobijena neradioaktivno obeležena proba.

3.7.3. Neradiokativna DNK/DNK hibridizacija

Protokol za hibridizaciju DNK sa neradioaktivno obeleženom probom je bilo sledeći: nakon pečenja membrana je pakovana u najlonsku kesicu sa 10 ml hibridizacionog pufera (0,1% N-lauril sarkozil, 0,02% SDS, 1% kazein) u kojoj je inkubirana 1 sat na temperaturi od 65°C. Zatim je u kesicu sipan 1 ml svežeg hibridizacionog pufera na 10 cm² membrane u koji je prethodno dodata neradioaktivno obeležena i denaturisana proba. Hibridizacija se odvijala preko noći (16 sati) na 65°C.

Membrana je nakon hibridizacije prana po 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 temperaturi od 65°C.

„DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) korišćen je za detekciju hibrida. Proces detekcije podrazumeva: 1) vezivanje hibridizovane probe sa anti-digoksigenin-AP i Fab fragmentima konjugovanim sa alkalnom fosfatazom i 2) vizuelizaciju sa kolorimetrijskim supstratima NBT/BCIP koji reaguju sa alkalnom fosfatazom. Pranje membrane i detekcija hibrida su vršeni po uputstvu proizvođača (Roche Diagnostics GmbH).

3.8. Transformacija ćelija sa DNK

3.8.1. Transformacija *E. coli*

3.8.1.1. Priprema *E. coli* kompetentnih ćelija

Priprema kompetentnih *E. coli* ćelija za transformaciju temperaturnim šokom, "Heat shock", rađena je po modifikovanoj metodi sa rubidijum hloridom (Hanahan, 1985). LB medijum, 100 ml inokulisan je sa 1 ml kulture dobijene resuspendovanjem 10 kolonija sa sveže, prekonocne, LA petri šolje i ćelije su gajene na 37°C uz intenzivnu areaciju na 180 rpm, do dostizanja srednje logaritamske faze rasta ($OD_{600nm}=0,3-0,6$). Rast bakterijske kulture je zaustavljen inkubacijom kulture 15 min na ledu. Nakon inicijalnog hlađenja bakterije su obarane iz medijuma (5000 rpm, 10 min, + 4°C, klinička centrifuga 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Supernatant je odlivan, a talog resuspendovan laganim mešanjem u istom volumenu prethodno ohlađenog 0,1 M $CaCl_2$ i ostavljen na ledu 15 min. Ćelije su zatim ponovo obarane (3500 rpm, 10 min, + 4°C, klinička centrifuga 5804R), a talog resuspendovan u 1/12.5 volumena RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2 \times 2H_2O$, 15% glicerol, finalno pH6,8). Suspenzija ćelija je inkubirana na ledu 15 min, a zatim podeljena u alikvote od po 200 μ l, koji su naglo zamrzavani u tečnom azotu, a zatim čuvani na -80°C do korišćenja.

3.8.1.2. Transformacija *E. coli* kompetentnih ćelija toplotnim šokom ("Heat shock")

Prethodno pripremljene, pa zamrznute kompetentne ćelije *E. coli* prvo su otapane na ledu, nakon čega je u mikrotube sa 200 μ l ćelija dodavano ne više od 200 ng plazmidne DNK ili prečišćene ligacione smeše (u zapremini do 20 μ l). Suspenzija je držana na ledu 60 min uz povremeno mešanje. Nakon inkubacije ćelije su izlagane

temperaturnom šoku (42°C) u trajanju od 90 sek, a zatim su inkubirane još 5 min na ledu. Posle tretmana u ćelijske suspenzije dodavabno je 300 µl LB medijuma za regeneraciju, smeša je zatim inkubirana 30 do 60 min zavisno od ekspresije antibiotske rezistencije na 37°C uz aeraciju. Alikvoti regenerisane transformacione smeše razmazivani su na odgovarajuće čvrste selektivne LB podloge i inkubirane na 37°C do pojave transformanata (prosečno nakon 24 sata inkubacije).

3.8.2. Transformacija laktobacila elektroporacijom

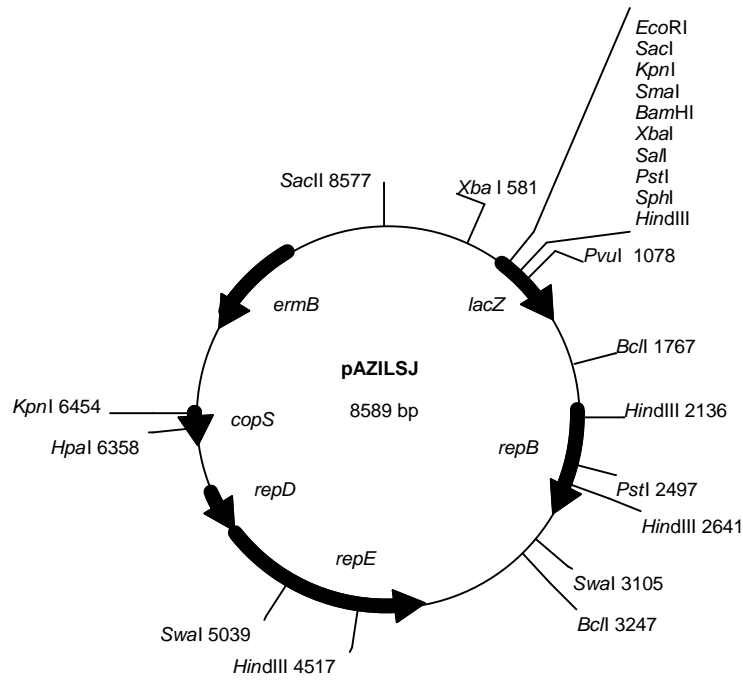
Priprema laktobacilusnih elektrokompetentnih ćelija i elektroporacija rađena je prema metodi koju su opisali Walker i saradnici (1996). Pojedinačna kolonija sa MRS podloge zasejavana je u MRS medijum i gajena na 30°C preko noći. Zatim je prekonoćna kultura razblažena 100 puta u MRS-u sa 1% glicinom. Kultura je inkubirana na 30°C do OD_{600nm}= 0,2-0,6. Talog bakterija iz 10 ml kulture je ispiran dva puta u istoj zapremini HEB pufera (272 mM saharoza, 8 mM HEPES pH7,5) i resuspendovan u 100 µl istog rastvora. Nakon dodavanja 1 µg plazmidne DNK, smeša je držana 5 min na ledu, a zatim je suspenzija mešana i prebacivana u kivete za elektroporaciju (dijametra 0,2 cm). Elektropulsiranje bakterija je rađeno u GENE PULSER aparatu (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) sa podešenim uslovima od 6,25 kV/cm, 25 µF i 200 Ω. U kivetu sa suspenzijom pulsiranih ćelija odmah je dodavana smeša za regeneraciju (MRS, 20 mM saharoza, 10 mM MgCl₂) koja je zatim inkubirana 5 min na ledu. Nakon toga smeša je inkubirana 2 sata na 30°C a zatim su alikvoti transformacione smeše razmazivani na MRS selektivne podloge sa odgovarajućim antibiotikom (eritromicin, 5 µg/ml), koje su inkubirane na 30°C do pojave transformanata (najčešće 2 do 4 dana).

3.9. Konstrukcija *Lactobacillus/E. coli* „shuttle cloning“ vektora pAZILSJ i kozmidnog vektora pAZILSJcos

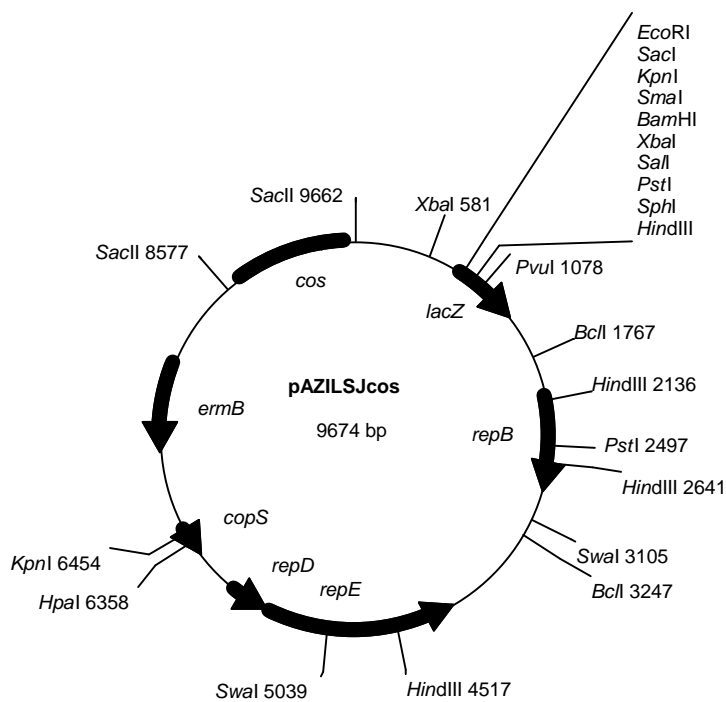
Vektor pAZILSJ, neophodan za pravljenje plazmidne biblioteke soja BGGR2-66, konstruisan je na sledeći način. Prvo je u PCR reakcijama sa plazmidom pSJ2-8 kao matricom i prajmerima BclIF/BclIR dobijen je fragment koji nosi *repB1* gen, veličine 1480 bp, koji je nakon prečišćavanja kloniran u vektor za kloniranje PCR fragmenata, pPCR-ScriptAmpSK(+). Dobijenom ligacionom smešom transformisane su kompetentne *E. coli* DH5α ćelije i nakon selekcije na čvrstoj LA podlozi sa dodatkom ampicilina (100 µg/ml) restrikcijom je analizirano pet transformanata kod kojih je

potvrđeno prisustvo fragmenta željene veličine. Za dalji rad odabran je jedan konstrukt označen kao pPCR1. Nakon digestije konstrukta pPCR1 restrikcionim enzimom *BclI* dobijen je fragment veličine 1480 bp koji je ligiran u vektor pAZIL (Kojic *et al.*, 2011) linearizovanim istim enzimom. Posle transformacije DH5 α ćelija i selekcije na LA Peti šoljama sa eritromicinom (300 μ g/ml) restrikciono je analizirano 144 transformanta od kojih je samo kod jednog identifikovano prisustvo fragmenta sa *repB* genom. Sekvenciranjem je potvrđeno da se radi o *repB1* genu poreklom sa plazmida pSJ2-8. Ovako dobijen konstrukt, označen kao pAZILSJ (Slika 3), zatim je testiran na sposobnost replikacije u sojevima laktobacila. Za transformaciju elektroporacijom su korišćene kompetentne ćelije soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14. Nakon gajenja četiri dana na selektivnim čvrstim MRS podlogama sa eritromicinom (5 μ g/ml) na temperaturi od 30°C dobijeni su Em^f transformanti. Usledila je izolacija plazmida iz 10 transformanata, za koje je nakon restrikcione analize pokazano da nose fragment sa *repB* genom.

Kozmidni vektor pAZILSJcos dobijen je kloniranjem *SacII* restrikcionog fragmenta veličine 1058 bp, koji nosi *cos* sekvenecu u jedinstveno *SacII* (8577) restrikciono mesto konstruisanog vektora pAZILSJ. Nakon transformacije kompetentnih DH5 α ćelija, zatim selekcije na čvrstim LA podlogama sa eritromicinom (300 μ g/ml) i restrikcione analize 154 transformanta identifikovan je jedan koji je posedovao konstrukt sa ukloniranom *cos* sekvencom. Dobijeni konstrukt, označen kao pAZILSJcos (Slika 4), je pokazao sposobnost replikacije u sojevima laktobacila. Urađeni su isti eksperimenti kao i prilikom analize sposobnosti replikacije vektora pAZILSJ u soju *Lb. parcasei* BGHN14.



Slika 3. Restrikciona mapa laktobacilusno/laktokokalnog/*E. coli* vektora za kloniranje pAZILSJ.



Slika 4. Restrikciona mapa laktobacilusno/laktokokalnog/*E. coli* kozmidnog vektora pAZILSJcos.

3.10. Konstrukcija plazmida

3.10.1. Konstrukcija plazmida pA2A

Da bismo utvrdili da li heterolognom ekspresijom gena koji kodiraju ABC-transporter i pomoćni protein možemo da uspostavimo sintezu bakteriocina u bakteriocin neprodukujućem soju BGNK1-62, koji poseduje *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon, neophodno je bilo da se napravi konstrukt koji nosi DNK fragment sa *abcT* i *acc* genim poreklom sa plazmida pSJ2-8.

Kao prvi korak, urađena je PCR reakcija sa PFPst/PRBamN prajmerima (Tabela 3) i totalnim plazmidima poreklom iz soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. Dobijeni PCR fragment kloniran je u pGEM-T Easy vektor. Ligacionom smešom su transformisane DH5 α kompetentne ćelije. Nakon selekcije na čvrstoj LA podlozi sa dodatkom ampicilina (100 μ g/ml), restrikciono je analizirano 10 belih transformanata kod kojih je potvrđeno prisustvo pGEM-T Easy vektora sa ukloniranim PCR fragmentom. Odabran je jedan konstrukt koji je označen kao pG1. Digestijom pG1 vektora *PstI/SphI* restrikcionim enzimima dobijen je restrikcioni fragment koji je zatim kloniran u vektor pA13 sečen istim enzimima. Nakon transformacije kompetentnih DH5 α ćelija i selekcije na selektivnoj LA podlozi sa eritromicinom (300 μ g/ml) restrikciono je analizirano 48 transformanata, a kod sedam je potvrđeno prisustvo željenog fragmenta. Odabran je jedan konstrukt koji je označen kao pA2A. Sekvenciranjem je potvrđeno da *PstI/SphI* fragment koji nosi *abcT* i *acc* gene pokazuje 100% identičnosti sa odgovarajućim genima lokalizovanim na plazmidu pSJ2-8.

3.10.2. Konstrukcija plazmidne biblioteke soja BGGR2-66

Totalni plazmidi soja BGGR2-66 izolovani korišćenjem gradijenta cezijum-hlorida sečeni su restrikcionim enzimima *EcoRI*, *SalI* i *BamHI* pojedinačno. Dobijeni DNK fragmenti ligirani su u vektor pAZILSJ linearizovani odgovarajućim enzimima. Nakon transformacije DH5 α kompetentnih ćelija i selekcije na čvrstim LA podlogama sa eritromicinom (300 μ g/ml), dobijen je veliki broj belih transformanata za koje je nakon restrrikcione analize pokazano da nose fragmente različite dužine poreklom iz plazmida soja BGGR2-66. Dobijeni konstrukti su međusobno upoređeni korišćenjem restrikcionih enzima *EcoRI*, *SalI*, *BamHI* i *PstI*, pojedinačno i u različitim kombinacijama. Na ovaj način dobijeni DNK fragmenti analizirani su na agaroznim

gelovima što je omogućilo da se odaberu konstrukti koji nose različite restrikcione fragmente poreklom sa plazmida soja BGGR2-66.

3.11. Metode rada sa proteinima

3.11.1. Metode rada sa bakteriocinima

3.11.1.1. Bakteriocinski test

Za detekciju sojeva proizvođača bakteriocina pripadnika *Lb. casei/paracasei* grupe korišćen je dufuzioni metod u bunarčićima (Harris *et al.*, 1989) uz nekoliko modifikacija. Petri šolje sa čvrstom podlogom prelivane su sa 7 ml MRS soft agara inokulisanog sa oko 10^5 - 10^6 ćelija indikatorskog soja/ml medijuma. Za potrebe testiranja prisustva bakteriocina u bakterijskoj prekonočnoj kulturi ili supernatantu (oslobođenog ćelija centrifugiranjem i filtriranjem kroz sterilne filtere 0,45 μ m (Sartorius) ili kuvanjem na 100°C (za termostabilne bakteriocinske molekule) i neutralisanog na pH7 pomoću 1 M NaOH) u soft agaru su pravljene bunarčići prečnika 5 mm u koje je sipano po 50 μ l uzorka. Prilikom testiranja bakteriocinske aktivnosti parcijalno prečišćenih bakteriocinskih frakcija kao i prečišćenih bakteriocina na soft agar sa indikatorskim sojem nakapano je 5-10 μ l testiranog uzorka i kap je ostavljena da se osuši na sobnoj temperaturi. Analiza bakterijskih kolonija na sposobnost sinteze bakteriocina podrazumevala je prenošenje istih sterilnim čačkalicama na petri šolje prelivene indikatorskim sojem. U svim slučajevima Petri šolje su zatim inkubirane tokom 48 sati na 30°C. Prisustvo antimikrobne aktivnosti je detektovano na osnovu pojave svetle zone oko testiranog uzorka, kao posledice inhibicije rasta senzitivnog bakterijskog soja. Da bi se potvrdilo da je inhibitorna supstanca koja se detektuje proteinske prirode korišćen je kristal proteaze tipa XIV (Sigma, Dejzenhofen, Nemačka) koji je stavljan u blizinu testiranog uzorka, pa je odsustvo zone inhibicije oko kristala protease uzimano kao potvrda da se radi o bakteriocinu.

3.11.1.2. Pripremanje bakteriocinskog preparata i određivanje arbitrarnih jedinica (AU)

Da bi se odredila bakteriocinska aktivnost soja BGUB9 korišćen je sirovi preparat bakteriocina BacUB9, koji je pripreman na sledeći način. Prekonočna kultura BGUB9 gajena u MRS medijumu, je centrifugirana dva puta (8000 rpm, 20 min, + 4°C, centrifuga Sorvall RC-5B). Dobijeni supernatant je oslobođan od ćelija inkubacijom na 100°C u trajanju od 15 min.

Za određivanje bakteriocinske aktivnosti soja BGGR2-66 korišćen je hloroformom ekstrahovan bakteriocin BacGR, pripremljen na sledeći način; nakon gajenja na čvrstom MRS medijumu na 30°C u trajanju od 48 sati, sakupljene su ćelije sa 10 MRS Petri šolja i resuspendovane intenzivnim vorteksovanjem u 5 ml 0,1 M Na-fosfatnog pufera pH7, a zatim su inkubirane na sobnoj temperatura u trajanju od 30 min. Iz ovako dobijene suspenzije rađena hloroformska ekstrakcija u odnosu 1:1 (v/v). Izdvojena interfaza je nakon sušenja pod vakuumom resuspendovana u 0,1 M natrijum fosfatnom puferu pH7. Ovako dobijeni bakteriocinski preparati su korišćeni za dalje eksperimente. Aktivnost im je testirana bakteriocinskim testom, difuzionim metodom u bunarčićima.

Arbitrarne jedinice su određene po opisanoj metodi (Mayr-Harting *et al.*, 1972) na sledeći način. Od bakteriocinskih preparata pripremljenih na prethodno opisan način napravljena je serija dilucija u MRS medijumu. Alikvoti (5 µl) odgovarajućih razblaženja su testirani bakteriocinskim testom nakapavanjem na Petri šolje sa indikatorskim sojem BGHN14, prilikom testiranja bakteriocina BacUB9, koje su zatim inkubirane preko noći na 30°C. U slučaju testiranja bakteriocina BacGR, aktivnost je testirana korišćenjem indikator soja BGKP20, a inkubacija je trajala 48 sati na 30°C. Recipročna vrednost najvećeg razblaženja, koja daje definisanu zonu inhibicije indikatorskog soja predstavlja količinu ili aktivnost bakteriocina izraženog u AU.

3.11.1.3. Praćenje kinetike biosinteze bakteriocina

Da bi se otklonio prethodno sintetisani bakteriocin BacUB9 iz prekonocne kulture soja BGUB9 stare 16 sati koja je rasla u MRS medijumu, ćelijski talog dobijen centrifugiranjem dva puta je opran u istom volumenu medijuma. Prilikom praćenja kinetike biosinteze bakteriocina BacGR sakupljene su ćelije sa 10 MRS Petri šolja nakon rasta 48 sati na 30°C i resuspendovane su intenzivnim vorteksovanjem u 5 ml 0,1 M Na-fosfatnog pufera pH7, zatim je ćelijski talog dobijen centrifugiranjem još tri puta je opran u istom volumenu 0,1 M Na-fosfatnog pufera pH7, radi odstranjivanja prethodno sintetisanog bakteriocina.

Oprane ćelije su u slučaju oba soja BGUB9 i BGGR2-66, zatim razblažene 100 x MRS medijumom (finalno MRS je inokulisan sa oko 10^5 ćelija/ml proizvođača bakteriocina), i po 5 ml je razliveno u epruvete i inkubirano na 30°C. Tokom 24 sata, svaki sat je merena pH vrednost, absorbanca na 600 nm OD₆₀₀, određivan broj živih

ćelija, CFU/ml („Colony Forming Units“) titiranjem odgovarajućeg razblaženja na Petri šolji sa MRS medijumom. Pored toga uziman je i alikvot kulture soja BGUB9, kome je testirana antimikrobna aktivnost na indikator soj BGHN14, i soja BGGR2-66 kome je testirana antimikrobna aktivnost na indikator soj BGKP20, a određivana je i aktivnost bakteriocina izražena u AU/ml.

3.11.1.4. Testiranje termostabilnosti i pH opsega bakteriocina

Termostabilnost bakteriocina BacUB9 i BacGR je testirana na sledeći način: bakteriocinski preparati, pripremljeni na prethodno opisan način su inkubirani 15 min na temperaturama u opsegu od 40°C do 100°C sa razmakom od 10°C. Bakteriocinski preparati su takođe autoklavirani, tj. inkubirani 15 min na 121°C. Nakon hlađenja (stajanjem na sobnoj temperaturi), ovako tretiranim uzorcima je ispitana bakteriocinska aktivnost. Očuvanje aktivnosti bakteriocina na niskim temperaturama je analizirano tako što je supernatant čuvan na temperaturi od + 4°C i - 20°C i svake nedelje je testirana aktivnost u toku tri meseca.

Određivanje efekta različitih pH vrednosti na aktivnost BacUB9 i BacGR je testirano tako što je alikvotima bakteriocinskih preparata podešen pH na vrednosti od pH1 do pH12 (korišćenjem 1 M HCl ili 1 M NaOH) sa razmakom od po jedne pH jedinice. Ovako tretirani uzorci su inkubirani 1 sat na 30°C, a zatim im je određena bakteriocinska aktivnost. U sledećem koraku alikvotima bakteriocinskih preparata je podešen pH na 12, uzorci su inkubirani 5, 10, 15, 30 i 60 min na 30°C, a zatim je testirana antibakterijska aktivnost istom metodom kao i u prethodnom eksperimentu. Da bi se utvrdila sposobnost restauracije antimikrobne aktivnosti bakteriocina BacUB9 i BacGR iskorišćeni su odgovarajući bakteriocinski preparati su inkubirani 60 min na 30°C, na pH12, nakon čega su neutralisani na pH7 i inkubirani na 30°C. Posle inkubacije od 5, 10, 15, 30 i 60 min alikvotima neutralisanih bakteriocinskih preparata je ispitana inhibitorna aktivnost.

Uporedo sa bakteriocinskim preparatima proizvođača bakteriocina, u svim eksperimentima tretirani su i preparati derivata koji ne sintetišu bakteriocine (negativne kontrole), BGUB9-96 i BGGR2-66-88 da bi se eliminisao efekat pH na rast indikatorskog soja. U svim opisanim eksperimentima, bakteriocinski test je rađen difuzionim metodom nakapavanjem na indikatorski soj BGHN14 u slučaju soja BGUB9, i na indikatorski soj BGKP20 u slučaju soja BGGR2-66.

3.11.1.5. Efekat delovanja različitih enzima na bakteriocine

Ispitivanje delovanja različitih enzima na aktivnost bakteriocina BacUB9 i BacGR rađeno je po prethodno opisanom protokolu (Kojic *et al.*, 1991b): proteaza tipa XIV (Sigma) i proteinaza K (Sigma) su rastvarane u 10 mM Tris-HCl puferu, pH8; tripsin (Calbiochem) i α -himotripsin (Sigma) i lizozim (Sigma) su rastvarani u 50 mM Tris-HCl puferu, pH8; a pepsin (Calbiochem) je rastvaran u 20 mM HCl, pH2. Ostali korišćeni enzimi lipaza (Calbiochem), Dnaza (Sigma) i RNaza (Sigma) su rastvarani u 50 mM Na-fosfatnom puferu, pH6,5. Enzimi u odgovarajućim 2 x puferima su dodavani bakteriocinskom preparatu pripremljenom na prethodno opisan način u odnosu 1:1 tako da je njihova finalna koncentracija bila 1 mg/ml. Smeša bakteriocina i enzima u odgovarajućem puferu je inkubirana 1 sat na 37°C i nakon toga joj je testirana bakteriocinska aktivnost difuzionim metodom nakapavanjem. Sojevi BGHN14 i BGKP20 su korišćeni kao indikatorski sojevi. Kao kontrole su korišćene: smeša bakteriocinskog preparata i odgovarajućeg pufera za ispitivani enzim, smeša enzima i pufera bez bakteriocinskog preparata i korišćeni puferi.

3.11.2. Izolovanje bakteriocina

3.11.2.1. Frakcionisanje amonijum sulfatnom precipitacijom

Izolovanje bakteriocina je rađeno iz 1 l supernatanta prekonocne kulture soja BGUB9 (u MRS medijumu) stare 16 sati. U supernatant dobijen centrifugiranjem (4500 rpm, 20 min, + 4°C, klinička centrifuga 5804R), dodata je količina amonijum sulfata koja odgovara 20% zasićenju, nakon čega je usledilo mešanje preko noći na + 4°C. Precipitat je odvojen od supernatanta centrifugiranjem (8000 rpm, 60 min, + 4°C, centrifuga Sorvall RC-5B, rotor GS3). Precipitat je resuspendovan u 10 ml 100 mM Na-fosfatnom pufera pH7, a supernatant je iskorišćen za sledeći korak frakcionisanja sa 30% zasićenja amonijum sulfata. Manipulacije pri svakom sledećem koraku frakcionisanja su iste kao u prvom koraku, sa porastom za po 10% zasićenja amonijum sulfata, zaključno sa 60% zasićenja.

3.11.2.2. Precipitacija acetonom

Precipitacija acetonom rađena je iz 5 ml supernatanta dobijenog centrifugiranjem (7500 rpm, 15 min, + 4°C) prekonocne kulture soja BGUB9. U ovako dobijen supernatant je dodato 15 ml hladnog acetona i suspenzija je inkubirana na 30°C u periodu od 5 sati. Proteinski precipitat koji sadrži bakteriocin je sakupljen nakon

centrifugiranja (7500 rpm, 15 min, + 4°C) a zatim je osušen pod vakuumom da bi se uklonio aceton. Pelet je resuspendovan u 500 µl 15% (v/v) acetonitrila koji sadrži 0.1% (v/v) TFA. Rastvor koji sadrži bakteriocin je filtriran kroz Dismic-13CP celulozno-acetatni filter i ovako dobijenom uzurku je zatim određivana molekulska masa korišćenjem masene spektrometrije LC/MS.

3.11.2.3. Hloroformska ekstrakcija

Aktivna bakteriocinska frakcija dobijena amonijum sulfatnom precipitacijom (u slučaju soja BGUB9) ili resuspendovanjem bakterijskih ćelija sa MRS Petri šolja u 5 ml 0,1 M Na-fosfatnog puferu pH7 (u slučaju soja BGGR2-66) je pomešana sa hloroformom u odnosu 1:1 i intenzivno mešana 30 sek na vorteksu. Faze su razdvojene centrifugiranjem (5000 rpm, 40 min, + 4°C, klinička centrifuga 5804R). Interfaza se nakon potpunog odstranjivanja gornje i donje faze i sušenja u „Speed Vac-u“ resuspenduje u Na-fosfatnom puferu pH7.

3.11.2.4. Reverzno-fazna hromatografija sa nelinearnim gradijentom elucije

Reverzno-fazna hromatografija sa nelinearnim gradijentom elucije je rađena na Waters Sep Pak 200 mg C18 koloni (Milford, Masačusets, SAD) pod dejstvom manualnog vakuuma. Aktivna bakteriocinska frakcija bakteriocina BacGR, dobijena hloroformskom ekstrakcijom, naneta je na kolonu prethodno tretiranu sa 100% metanolom. Elucija je rađena nelinearnim gradijentom koji je postignut nanošenjem sledećih pufera na kolonu, ovim redosledom: bidestilovana voda, 30% etanol, 25% do 50% izopropanol sa razmakom od 5%, kao i 60% izopropanol i 70% izopropanol. Kolona je u poslednjem koraku isprana sa 100% izopropanolom. Sakupljene frakcije su osušene pod vakuumom (Speed-Vac Plus SC 110A Savant, SAD) i resuspendovane u Na-fosfatnom puferu pH7, i testirana im je inhibitorna aktivnost difuzionim metodom u bunarčićima gde je kao indikator korišćen soj BGHN14.

3.11.2.5. Reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

Za prečišćavanje bakteriocina BacGR u sledećem koraku, nakon hloroformske ekstrakcije, korišćena je reverzno-fazna hromatografija na Symmetry300™ Reverse Phase koloni (C18 kolona, 300 Å, 3,9 x 150 mm i 2,1 x 150 mm) i Phenomenex Jupiter 4µ koloni (Proteo 90 Å, 150 x 2,00 mm, 4 micron) na "High Performance Liquid Chromatography" (HPLC) aparatu Waters Alliance sa Millennium softverom (Milford, Masačusets, SAD). Kolone su prvo ekvilibrisane puferom A (0,1% TFA), a zatim je na

tako pripremljene kolone nanošeno po 200 µl aktivnih frakcija iz prethodnog koraka prečišćavanja. Elucija je rađena pomoću dvodelnog linearnog gradijenta: 0 – 50% pufera B (0,09% TFA, 5% izopropanol, 85% acetonitril u MilliQ vodi) tokom 30 min, zatim je sledio skok na 80% pufera B u trajanju od 2 min, nakon čega je sledio gradijent 80 – 100% pufera B tokom 1 min. Protok je bio 0,8 ml/min na Symmetry300™ koloni ili 0,2 ml/min na Phenomenex Jupiter 4µ koloni. Tokom elucije merena je apsorbanca između 210 i 350 nm korišćenjem detektora sa fotodiodom (model PDA 996, Waters). Frakcije su ručno sakupljane u mikrotube. Skupljene frakcije su potpuno uparene pod vakuumom (Speed-Vac Plus SC 110A Savant, Njujork, SAD), a zatim su resuspendovane u 20 µl MilliQ vode i testirana im je aktivnost metodom iskapavanja na indikatorski soj BGKP20.

3.11.2.6. Elektroforeza proteina na Tricin SDS-poliakrilamidnom gelu (Tricin SDS-PAGE)

Uzorci bakteriocina BacUB9 i BacGR, dobijeni u različitim fazama prečišćavanja, analizirani su elektroforezom na poliakrilamidnom gelu koja je rađena po metodi koju su opisali Schägger i Jagow (1987). Korišćena je aparatura za vertikalnu elektroforezu firme Hoeffler (Hoeffler SE 600, Amersham Biosciences, CA, USA). Pravljen je diskontinuiran sistem gelova, koji se sastojao iz gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje. Koncentracije komponenti u gelu za koncentrovanje su bile sledeće: 4% akrilamid/bisakrilamid, 744 mM Tris-HCl pH8,45, 0,07% SDS, 0,08% amonijum persulfat i 0,08% TEMED. Finalne koncentracije komponenti u gelu za razdvajanje su u slučaju bakteriocina BacUB9 bile: 16% akrilamid/bisakrilamid 1 M Tris-HCl pH8,45, 0,1% SDS, 13,25% glicerol, 0,1% amonijum persulfat i 0,1% TEMED. U slučaju analize bakteriocina BacGR pravljen je i diskontinuiran gel za razdvajanje koji se sastojao se od 10% i 16% akrilamid/bisakrilamidnog gela. Gel za razdvajanje je nalivan do oko 3/4 zapremine ploča, a u ostatak je nalivan gel za koncentrovanje.

Pufer za elektroforezu čine anodni pufer (0,2 M Tris pH8,9) i katodni pufer (0,1 M Tris pH8,2, 0,1 M Tricin i 0,1% SDS). Elektroforeza je tekla pri konstantnoj struji od 40 mA. Uzorak je mešan u odnosu 1:1 sa puferom za uzorak (100 mM Tris pH6,8, 1% SDS, 24% glicerol, 2% β-merkaptotanol, 0,02% BPB), zatim je inkubiran 2 min na 100°C i nanošen na gel u duplikatu. Jedna polovina gela na kojoj je uzorak i proteinski standard "Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standard" (1,4 – 26,6 Da, Bio rad)

je bojena komazi-plavim. Bojenje sa komazi-plavim (Comassie brilliant blue R250) rađeno je po sledećoj proceduri. Gel je tretiran rastvorom koji je sadržao 45% metanol, 10% sirćetnu kiselinu i 0,25% komasi plavu, 3 do 4 sata uz mešanje. Odbojavanje gelova je rađeno po istom postupku koji je opisan za odbojavanje SDS-poliakrilamidnih gelova.

Druga polovina gela je prvo prana uz mešanje u 0,5% Tween-u 80 u trajanju od 45 min, a potom 3 x 45 min u MilliQ vodi. Prisustvo bakteriocina u gelu je utvrđeno bakteriocinskim testom tako što je gel prenet u sterilnu petri šolju i preliven sa 10 ml soft-agara MRS-a, koji je inokulisan sa 10^4 - 10^5 ćelija/ ml indikatorskog soja. Petri šolja je inkubirana na 30°C u trajanju od 48 sati. Upoređivanjem pozicije zone inhibicije rasta indikatorskog soja (prosvetljena zona) sa pozicijama potencijalnih bakteriocinaskih traka na bojenoj polovini gela poređenjem sa standardom približno je utvrđivana molekulaska masa bakteriocina.

Prilikom purifikacije bakteriocina BacGR radi pripreme što čistijeg uzorka za N-terminalno sekvenciranje rađena je ekstrakcija odgovarajuće proteinske trake iz gela. Proteinska traka je isečena iz gela i prebačena u mikrotubu. Ekstrakcije proteina iz gela je rađena po modifikovanoj metodi koju su opisali Cohen i Chait (1997): isečak gela je dobro usitnjen i preliven rastvorom za eluciju koji se sastojao od 0,09% TFA, 80% acetonitril, u MilliQ vodi, uz intenzivno mešanje na šejkeru u trajanju od 48 sati na temperaturi od + 8°C. Nakon kratkog centrifugiranja, supernatant je prenet u drugu mikrotubu, potpuno uparen pod vakuumom (Speed-Vac Plus SC 110A Savant, SAD), a zatim je resuspendovan u 40 μ l MilliQ vode i testirana mu je aktivnost metodom iskapavanja na indikatorski soj BGKP20. Kao kontrole su korišćeni isečak sa istog gela bez vidljive proteinske trake i isečak koji sadrži mioglobinsku traku, molekulske mase 16,95 kDa, poreklom iz proteinskog standarda (Bio rad). U sledećem koraku tako dobijen aktivan uzorak je ponovo nanešen na 16% Tricine-SDS-PAGE, a zatim je sa gela prenesen „Semi-dry” transferom na PVDF („Polyvinylidene fluoride”) membranu, koja je potom bojena 0.1 % komazi-plavim (Coomassie Blue R250) u rastvoru 1 % sirćetnoj kiseline i 40% metanola, nakon čega je odbojena sa 50% rastvorom metanola. Membrana je zatim isečena u nivou koji odgovara proteinskoj traci veličine između 1,7 i 4,6 kDa, i poslata je na N-terminalno sekvenciranje

3.11.3. Masena spektrometrija

Za određivanje mase izolovanog proteina, bakteriocina BacUB9, korišćena je LC/MS („Liquid chromatography/mass spectrometry“) po metodi koju su prethodno opisali Zendo i saradnici (2008). Dobijeni spektar je analiziran u opsegu odnosa mase i naelektrisanja (m/z) 1000-3000. Dobijeni pikovi poreklom od komponenti medijuma su isključeni iz dalje analize.

Za određivanje molekulske mase bakteriocina BacGR, korišćena je kombinovana tehnika tečne hromatografije i masene spektrometrije (ESI/MS). Dobijeni peptidi su analizirani korišćenjem MALDI – TOF aparata u Plateforme B.I.B.S. – Spectrométrie de Masse, Unité BIA, INRA, Nant, Francuska.

3.11.4. Određivanje N-terminalne aminokiselinske sekvence bakteriocina

N-terminalno sekvenciranje proteinske trake koja je ispoljavala bakteriocinsku aktivnost vezane za PVDF membranu je rađeno korišćenjem „Procise protein sequencing system 492A“ (PE Applied Biosystems) u Institutu Jožef Štefan, Ljubljana, Slovenija. Urađeno je sekvenciranje prvih deset aminokiselina.

4. REZULTATI

U poslednjih nekoliko godina bakteriocini klase II, proizvedeni od strane BMK, predstavljaju jednu od najinteresantnijih grupa antimikrobnih peptida od kojih su neki našli primenu u prehrambenoj industriji kao konzervansi hrane (Cleveland *et al.*, 2001) i u medicini, gde se koriste kao dopuna antibiotskoj terapiji infektivnih bolesti (Ingham *et al.*, 2003) ili kao antiviralni agensi (Wachsman *et al.*, 1999; Wachsman *et al.*, 2003). Usled sve veće primene bakteriocina klase II od velikog je značaja identifikacija novih sojeva proizvođača i potencijalno novih bakteriocina.

4.1. Detekcija antimikrobne aktivnosti sojeva *Lactobacillus casei/paracasei* grupe

Testiranje antimikrobne aktivnosti 52 soja *Lb. casei/paracasei* grupe, preliminarno je urađeno korišćenjem sledećih odabranih sojeva laktobacila: *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14, BGLI18 i BGKP20, i laktokoka: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sojeva BGMN1-596, MG1363 i IL1403 kao indikatora u bakteriocinskom testu (rezultati nisu prikazani). Analiza rezultata dobijenih u bakteriocinskim testovima je pokazala da samo 32,69% sojeva (17/52) pokazuje antimikrobnu aktivnost. Dalja analiza je podrazumevala korišćenje sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe, za koje je pokazano da proizvode bakteriocine, kao indikator sojeva (Tabela 5).

Tabela 5. Antimikrobna ativnost sojava *Lb. casei/paracasei* grupe

Proizvođač	BGSJ2-8	BGUB9	BGKP19	BGBUK2-19	BGNJ1-61	BGGR2-64	BGGR2-66	BGCCGK4	BGDA17b	BGBUK2-16	BGZLS10-6	BGGR2-68	BGNJ1-24	BGNJ1-35	BGNJ1-77	BGNJ1-64	BGJB9-123
BGSJ2-8	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGUB9	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGKP19	-	-	/	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
BGBUK2-19	-	-	-	/	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
BGNJ1-61	+	+	+	+	/	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
BGGR2-64	+	-	+	+	-	/	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BGGR2-66	+	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
BGCCGK4	-	-	-	-	+	-	-	/	-	-	-	-	+	-	-	-	-
BGDA17b	-	+	-	-	+	-	-	-	/	-	-	-	+	-	-	-	+
BGBUK2-16	+	+	+	-	-	-	-	+	+	/	+	-	-	-	-	-	+
BGZLS10-6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-
BGGR2-68	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	/	-	-	-	-	-
BGNJ1-24	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	/	-	-	-	-
BGNJ1-35	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	/	-	-	-
BGNJ1-77	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	/	-	-
BGNJ1-64	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	/	-
BGJB9-123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
BGHN14	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
BGLI18	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
BGKP20	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
BGMN1-596	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MG1363	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
IL1403	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+ = prisustvo zone inhibicije osetljive na dejstvo proteaze tipa XIV; - = odsustvo zone inhibicije.

Testom unakrsne inhibicije sojeva proizvođača bakteriocina utvrđeno je da 76,47% (13/17) sojeva inhibitorno deluje na najmanje tri soja proizvođača bakteriocina korišćenih kao indikatori. Sojevi proizvođači bakteriocina na osnovu dobijenih rezultata antimikrobnog spektra delovanja su podeljeni na pet grupa (A - E). Grupa A - BGSJ2-8, BGUB9, BGKP19, BGBUK2-19, BGCCGK4, BGDA17b i BGZLS10-6; Grupa B - BGNJ1-61 i BGNJ1-24; Grupa C - BGGR2-64, BGGR2-66 i BGBUK2-16; Grupa D - BGGR2-68, BGNJ1-35, BGNJ1-77 i BGNJ1-64 i Grupa E - BGJB9-123. U grupu A svrstani su sojevi koji imaju sličan antimikrobni spektar kao okarakterisani proizvođač bakteriocina soj BGSJ2-8. Ujedno sojevi iz grupe A pokazuju najširi spektar delovanja u odnosu na druge testirane sojeve *Lb. casei/paracasei* grupe. Grupu B čine samo dva soja (BGNJ1-61 i BGNJ1-24) koje karakteriše isti spektar antimikrobnog delovanja. Najverovatnije je da ova dva soja, pošto su poreklom iz istog sira, proizvode isti bakteriocin. U grupu C su svrstani sojevi BGGR2-64 i BGGR2-66, koji pokazuju isti inhibitorni spektar, i soj BGBUK2-16, koji dodatno inhibira i dva laktokokalna soja.

Grupi D čine četiri soja koja ostvaruju dejstvo samo na indikator soj BGLI18, dok grupi E pripada samo soj BGJB9-123 sa drugačijim antimikrobnim u odnosu na sve testirane sojeve. Interesantno je da su sojevi iz grupe D ostvarili inhibitorno dejstvo samo na indikatorski soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGLI18 (Tabela 5). Uočeno je da se prilikom testiranja antimikrobne aktivnosti soja BGGR2-66 iz grupe C, zone inhibicije rasta indikatorskih sojeva javljaju tek nakon 48 sati inkubacije na 30°C, za razliku od ostalih sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe kod kojih se proizvodnja bakteriocina detektuje kao zona inhibicije indikatorskog soja već nakon 24 sata.

4.2. Distribucija gena koji kodiraju bakteriocin BacSJ, acidocin 8912, ABC-transporter i pomoćni protein

Sposobnost pojedinih sojeva BMK da proizvode više bakteriocina sa uskim, ali različitim inhibitornim spektrom ima važnu ulogu u njihovom opstanku u istom ekološkom okruženju. Analiza odgovarajućih filogenetskih stabala ukazuje da se geni koji su uključeni u proizvodnju bakteriocina često prenose horizontalno i u mnogo slučajeva pokazuju velike razlike u organizaciji operona koji ih kodiraju, čak i kod blisko srodnih vrsta (Makarova *et al.*, 2006). U prethodnom radu okarakterisan je soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, proizvođač dva bakteriocina BacSJ i acidocina 8912. Pokazano je takođe da se geni koji kodiraju ove bakteriocine, kao i ABC-transporter i pomoćni protein nalaze na plazmidu pSJ2-8 (Lozo *et al.*, 2007; Kojić *et al.*, 2010).

Usled toga što su sojevi svrstani u grupu A pokazali sličan antimikrobni spektar delovanja kao i soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, cilj eksperimenata je bio da se utvrdi da li analizirani sojevi poseduju genetičke determinante uključene u proizvodnju bakteriocina BacSJ i acidocina 8912. S obzirom da su Kojić i saradnici (2010) ukazali na mogućnost da dva različita bakteriocina BacSJ i acidocin 8912 koriste isti ABC-transporter i pomoćni protein, a kako je iz literature poznato da su u nekim bakteriocinskim genomima prisutni samo delovi bakteriocinskih sistema (Moretro *et al.*, 2005; Diep *et al.*, 2006), postojala je mogućnost da i sojevi *Lb. casei/paracasei* grupe kod kojih nije identifikovana antimikrobna aktivnost, poseduju potencijalne strukturne gene za proizvodnju bakteriocina (BacSJ, acidocina 8912 ili nekog novog bakteriocina), koji zavise od istog transportnog sistema, a ne proizvode odgovarajuće bakteriocine usled nedostatka ili mutacija u nekom od ključnih bakteriocinskih gena.

Imajući u vidu prethodno navedene literaturne podatke sprovedena je studija o rasprostranjenosti bakteriocinskih gena neophodnih za proizvodnju bakteriocina BacSJ i acidocina 8912, koja je obuhvatila sve sojeve *Lb. casei/paracasei* grupe, nezavisno od toga da li im je detektovana aktivnost u bakteriocinskim testovima.

Ukupno je testirano 52 soja poreklom iz različitih ekoloških niša, ali prevashodno sireva proizvedenih bez upotrebe starter kultura u domaćinstvima sa različitih geografskih lokaliteta. Sojevi su analizirani PCR metodom sa specifičnim prajmerima (Tabela 3) na prisustvo gena koji kodiraju bakteriocin BacSJ i njegov imuni protein (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon), acidocin 8912 (*acdT*), ABC-transporter (*abcT*) i pomoćni protein (*acc*) (eksperimenti su urađeni u triplikatu). Prajmeri korišćeni u PCR amplifikacijama su dizajnirani na osnovu nukleotidnih sekvenci odgovarajućih gena poreklom sa plazmida pSJ2-8. Iz literature je poznato da se PCR amplifikacija često koristi u studijama u kojima se analizira distribucija bakteriocina među različitim bakterijskim vrstama (Ben Omar *et al.*, 2004; Faye *et al.*, 2004).

Analizom dobijenih PCR produkata na agaroznoj gel elektroforezi strukturni geni za bakteriocine BacSJ i njegov imuni protein ili acidocin 8912 (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* i/ili *acdT*) identifikovani su kod 96,15% (50/52) testiranih sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe. Među njima kod 18% (9/50) sojeva detektovano je prisustvo samo *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operona, dok je kod samo jednog soja (2% sojeva (1/50)) pokazano prisustvo jedino *acdT* gena. Oba strukturna bakteriocinska gena detektovana su kod čak 80% testiranih sojeva (40/50). Jedino sojevi BGLI15 i BGGR1-15 nemaju nijedan od analiziranih bakteriocinskih gena (Tabela 6).

U sledećem koraku totalna DNK poreklom iz analiziranih sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe je kao matrica u PCR reakcijama analizirana za prisustvo gena *abcT* i *acc* upotrebom specifičnih prajmera. Zastupljenost analiziranih gena značajno varira između predstavnika *Lb. casei/paracasei* grupe. Pokazano je da su *abcT* i/ili *acc* geni prisutni kod 59,61% (31/52) sojeva. Među njima 38,71% (12/31) sojeva poseduje samo *abcT* gen, drugih 38,71% ima samo *acc* gen, dok samo 22,58% (7/31) poseduje oba analizirana gena. Zanimljivo je da kod čak 40,38% (21/52) sojeva nije uočeno prisustvo nijednog od navedenih gena (Tabela 6).

Rezultati

Tabela 6. Bakteriocinska aktivnost sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe i distribucija relevantnih gena

Grupa	Soj	Vrsta	Poreklo	Plazmidi	Bac	<i>SJ2-8/SJ2-8i</i>	<i>acdT</i>	<i>abcT</i>	<i>acc</i>
P1	BGSJ2-8	LP	sir	+	+	+	+	+	+
	BGUB9	LP	sir	+	+	+	+	+	+
	BGKP19	LP	sir	+	+	+	+	+	+
	BGBUK2-19	LP	sir	+	+	+	+	+	+
P2	BGNJ1-61	LC/LP	sir	+	+	+	+	+	-
P3	BGGR2-64	LR/LP	sir	+	+	+	+	-	+
	BGGR2-66	LP	sir	+	+	+	+	-	+
	BGCGK4	LP	kajmak	+	+	+	+	-	+
	BGDA17b	LP	sir	+	+	+	+	-	+
	BGBUK2-16	LP	sir	+	+	+	+	-	+
	BGZLS10-6	LP	sir	+	+	+	+	-	+
P4	BGGR2-68	LP	sir	+	+	+	+	-	-
	BGNJ1-24	LP	sir	+	+	+	+	-	-
	BGNJ1-35	LC/LP	sir	+	+	+	+	-	-
P5	BGNJ1-77	LP	sir	+	+	+	-	+	-
P6	BGNJ1-64	LP	sir	+	+	+	-	-	-
P7	BGJB9-123	LC/LP	sir	-	+	-	+	-	-
N1	BGNJ1-14	LP/LC	sir	+	-	+	+	+	+
	BGNK1-77	LP	sir	-	-	+	+	+	+
	BGBK1-67	LC/LP	sir	-	-	+	+	+	+
N2	BGLI18	LP	sir	+	-	+	+	+	-
	BGNK1-99	LC/LP	sir	+	-	+	+	+	-
	BGGR2-20	LC/LP	sir	+	-	+	+	+	-
	BGNJ1-48	LC/LP	sir	+	-	+	+	+	-
	BGNJ1-53	LC/LP	sir	+	-	+	+	+	-
	BGNK1-50	LC/LP	sir	-	-	+	+	+	-
	BGHN14	LP	sir	-	-	+	+	+	-
	BGGR2-59	LC/LP	sir	-	-	+	+	+	-
N3	B-4560 ^b	LP	mleko	+	-	+	+	-	+
	BGBUK2-8	LP	sir	+	-	+	+	-	+
	BGNJ1-83	LP/LC	sir	-	-	+	+	-	+
	LMG10774 ^a	LP	csf*	-	-	+	+	-	+
N4	LMG19719 ^a	LP	krv	+	-	+	+	-	-
	B-4564 ^b	LP	saliva	+	-	+	+	-	-
	BGNJ1-27	LP	sir	+	-	+	+	-	-
	BGGR2-18	LC/LP	sir	+	-	+	+	-	-
	BGGR2-94	LC/LP	sir	+	-	+	+	-	-
	BGNJ1-3	LC/LP	sir	+	-	+	+	-	-
	BGNJ1-93	LC/LP	sir	+	-	+	+	-	-
	BGNK1-31	LC/LP	sir	+	-	+	+	-	-
	BGKP20	LP	sir	-	-	+	+	-	-
	BGNK1-11	LP/LC/LR	sir	-	-	+	+	-	-
	LMG13552 ^a	LP	sir	-	-	+	+	-	-
N5	BGNJ1-38	LC/LP	sir	+	-	+	-	+	-
	BGNK1-70	LC/LP	sir	+	-	+	-	+	-
N6	BGAR75	LP	sir	+	-	+	-	-	+
	LMG11459 ^a	LP	karijes	-	-	+	-	-	+
N7	BGJB9-124	LC/LP	sir	+	-	+	-	-	-
	BGNK1-62	LC/LP	sir	+	-	+	-	-	-
	BGNK1-80	LC/LP	sir	+	-	+	-	-	-
N8	BGLI15	LP	sir	+	-	-	-	-	-
	BGGR1-15	LP	sir	+	-	-	-	-	-

Sojevi determinisani na osnovu sekvenci gena za 16S rRNK; LP – *Lb. paracasei*; LC – *Lb. casei*; LR – *Lb. rennangily*. Prisustvo (+) ili odsustvo (-): plazmida, proizvodnje bakteriocina (Bac) i odgovarajućih gena (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operona, *acdT*, *abcT* i *acc* gena koji kodiraju bakteriocin BacSJ i imuni protein, bakteriocin acidocin 8912, ABC-transporter i pomoćni protein). ^aBelgian Coordinated Collections of Microorganisms/LMG Bacteria Collection; ^bAgricultural Research Service Culture Collection (NRRL), USA; Bac - bakteriocinska aktivnost; *csf – cerebro-spinalna tečnost.

4.3. Korelacija prisustva bakteriocinskih gena i proizvodnje bakteriocina

Uporedna analiza rasprostranjenosti bakteriocinskih gena i proizvodnje bakteriocina kod testiranih sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe sugerisala je na njihovu moguću podelu na dve glavne grupe: sojeve proizvođače bakteriocina (P grupa) i sojeve koji ne proizvode bakteriocine (N grupa) (Tabela 6). Dalja podela sojeva na podgrupe urađena je na osnovu prisustva oba ili jednog od analiziranih strukturnih bakteriocinskih gena (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* i/ili *acdT*), a zatim i prisustvom oba ili jednog od analiziranih *abcT* i/ili *acc* gena.

Na osnovu navedenih parametara napravljena podela testiranih sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe omogućila je da se uoče razlike između sojeva proizvođača bakteriocina. Sojevi BGSJ2-8, BGUB9, BGKP19 i BGBUK2-19, svrstani u grupu P1 (Tabela 6) poseduju sve analizirane gene (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon, kao i *acdT*, *abcT* i *acc* gene) i pokazuju sličan antimikrobni spektar (Tabela 5 i Tabela 6).

Jedan od najinteresantnijih rezultata je to što je identifikovano 8,57% (3/35) sojeva koji poseduju svih pet analiziranih bakteriocinskih gena, a da kod njih pri korišćenim uslovima i indikatorskim sojevima nije detektovana proizvodnja bakteriocina (Tabela 6, N1 grupa). Sojevi N1 grupe su takođe pokazali senzitivnost na dejstvo bakteriocina koje proizvode sojevi pripadnici P1 i P3 grupe (rezultati nisu prikazani). Detektovana su i dva soja BGLI15 i BGGR1-15 (Tabela 6, N8 grupa) koji ne poseduju ni jedan od analiziranih gena, a ujedno ne pokazuju antimikrobno delovanje ni na jedan od korišćenih indikatorskih sojeva.

Dva analizirana soja BGSJ2-8 i BGUB9 predstavnika P1 grupe i soj BGJB9-123 iz P7 grupe su pokazala rezistenciju na sve analizirane sojeve kada su korišćeni kao indikatori u bakteriocinskim testovima (Tabela 5).

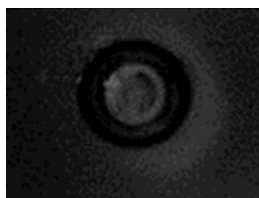
Još jedan zanimljiv podatak koji je proizašao iz sprovedene PCR analize je da svi testirani sojevi koji proizvode bakteriocine poseduju bar jedan od analiziranih strukturnih bakteriocinskih gena, *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon ili *acdT* gen. Pokazano je da čak 82,35% sojeva (14/17) poseduje oba strukturna gena, dva soja BGNJ1-77 i BGNJ1-64 (Tabela 6, P5 i P6 grupa) poseduju samo *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon, dok soj BGJB9-123 (Tabela 6, P7 grupa) poseduje samo *acdT* gen.

Dalja analiza je pokazala da postoji varijabilnost među sojevima proizvođačima bakteriocina u pogledu prisustva *abcT* i *acc* gena. Tako da 23,53% (4/17) sojeva poseduje oba gena (Tabela 6, P1), kod 35,29% (6/17) sojeva nedostaje *abcT* gen (Tabela 6, P3), dok *acc* gen nije prisutan kod 11,76% (2/17) sojeva (Tabela 6, P2 i P5). Interesantno je da čak 29,41% (5/17) sojeva proizvođača ne poseduje ni *abcT* ni *acc* gen (Tabela 6, P4, P6 i P7).

4.4. Restauracija sposobnosti sinteze bakteriocina BacSJ

Uporedna analiza prisustva analiziranih bakteriocinskih gena kod sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe je pokazala da tri soja BGJB9-124, BGNK1-62 i BGNK1-80 koji ne proizvode bakteriocine poseduju *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon (Tabela 6, N7), ali im nedostaju *abcT* i *acc* geni. Za sva tri soja je pokazano da *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon ima identičnu nukleotidnu sekvencu sa odgovarajućim genima identifikovanim na plazmidu pSJ2-8 (EMBL GenBank ID: FM246455) (Kojic *et al.*, 2010). Za dalji rad odabran je soj BGNK1-62 za koji je pokazano da je transformabilan.

U cilju utvrđivanja da li identifikovani *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon može da dovede do proizvodnje bakteriocina urađena je heterologna ekspresija gena koji kodiraju ABC-transporter i pomoćni protein, poreklom sa plazmida pSJ2-8. Za ovu svrhu napravljen je konstrukt pA2A (Materijal i metode 3.10.1. Konstrukcija plazmida pA2A), koji nosi *abcT* i *acc* gene, kojim je zatim transformisan soj BGNK1-62. Dobijeni Em^r transformanti testirani su na sposobnost sinteze bakteriocina metodom prenošenja odabranih kolonija sterilnim čačkalicama na Petri šolje prelivene indikator sojem *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14. U sledećem koraku odabran je jedan transformant, označen kao BGNK1-62-8, koji je testiran bakteriocinskim testom sa bunarićima na sposobnost sinteze bakteriocina (Slika 5).



Slika 5. Analiza sposobnosti sinteze bakteriocina transformanta BGNK1-62-8. Kao indikatorski soj korišćen je senzitivni soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14.

U sledećem koraku urađeni su bakteriocinski testovi kojima je pokazano da transformant BGNK1-62-8 proizvodi bakteriocin sa istim spektrom delovanja kao i bakteriocin BacSJ (rezultati nisu prikazani), čime je potvrđeno da *in trans* prisutni *abcT* i *acc* geni mogu dovesti do restauracije bakteriocinskog fenotipa kod soja BGNK1-62.

4.5. Molekularna determinacija soja BGUB9

Uporednom analizom prisustva analiziranih bakteriocinskih gena sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe uočeno da soj BGUB9, iako poseduje sve neophodne gene za proizvodnju bakteriocina BacSJ i acidocina 8912, ipak pokazuje razlike u inhibitornom spektru u odnosu na soj BGSJ2-8, tako da je odlučeno da se detaljnije izuči antimikrobni potencijal soja BGUB9.

Soj BGUB9 je prirodni izolat, izolovan klasičnim mikrobiološkim metodama iz domaćeg tvrdog sira sa lokaliteta Ubli, Crna Gora, proizvedenog na tradicionalan način. Preliminarna determinacija soja kao pripadnika vrste *Lb. paracasei* dobijena je na osnovu biohemijskih testova i analize njegove sposobnosti da fermentiše različite šećere korišćenjem API 50 CH sistema (API System S.A.; Montelieu-Vercieu, France). Da bi se potvrdila definitivna pripadnost soja BGUB9 vrsti *Lb. paracasei* dalja determinacija soja je urađena korišćenjem metoda molekularne determinacije, rep-PCR metodom sa (GTG)₅ prajmerom, kao i sekvenciranjem gena za 16S rRNK. Na osnovu ovih rezultata soj BGUB9 je determinisan kao predstavnik vrste *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*.

4.5.1. Detekcija antimikrobne aktivnosti soja BGUB9

Preliminarni eksperimenti testiranja antimikrobne aktivnosti soja BGUB9 urađeni su korišćenjem odabranih indikatorskih sojeva laktobacila (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14 i *Lb. plantarum* A112) i laktokoka (*L. lactis* subsp. *lactis* NS1, BGMN1-596, MG1363 i IL1403) sojeva. U daljem toku rada za testiranje antimikrobne aktivnosti soja BGUB9 odabran je soj BGHN14 usled toga što je bio najsenzitivniji indikator soj. Tokom analize prirode inhibitornog delovanja soja BGUB9 na različite senzitivne sojeve utvrđeno je da ona delimično potiče i od produkcije mlečne kiseline kao i od vodonik peroksida. Pokazano je da je mlečna kiselina odgovorna za inhibiciju rasta sledećih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih sojeva: *Ent. faecalis* ATCC29212, *Strep. pyogenes* grupe A443 i A337; *Strep. pneumoniae* 25; *Staph. aureus* ATCC25923;

Rezultati

B. subtilis ATCC6633; *M. flavus* ATCC10240; *E. coli* ATCC5922; *Ps. aeruginosa* ATCC7853; *Pr. vulgaris* 246 i *Kl. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* NCIMB 9111 (Tabela 7). U cilju utvrđivanja da li antimikrobno dejstvo soja BGUB9 potiče i od vodonik peroksida urađen je i test sa peroksidazom rena gde je dobijen pozitivan rezultat (plava boja izraslih kolonija nakon izlaganja vazduhu) (Slika 6).



Slika 6. Analiza sposobnosti proizvodnje vodonik peroksida soja BGUB9.

Tabela 7. Spisak sojeva senzitivnih na delovanje soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9.

Soj	Vrsta
BGNJ1-61, BGDA17b, BGBUK2-16, BGZLS10-6, BGGR2-68, BGNJ1-24, BGNJ1-35, BGNJ1-77, BGNJ1-64, ZLS10-1, ZLM1-2 i BGPT4-82	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , Bac ⁺
BGHN14, BGLI18, BGKP20 i BGLI17	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
JCM 1157 ^{Td}	<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>
BGAN8, A112 i ATCC14917 ^c	<i>Lb. plantarum</i>
BGEN1	<i>Lb. rahmnosus</i>
BGIS29	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , Bac ⁺
IL1403	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
JCM 5887 ^{Td}	<i>Pediococcus dextrinicus</i>
JCM 5885 ^d	<i>Ped. pentosaceus</i>
ATCC29212 ^c i JCM 5803 ^{Td}	<i>Enterococcus faecalis</i>
A443 i A337	<i>Strep. pyogenes</i>
25	<i>Strep. pneumoniae</i>
ATCC25923 ^c	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC6633 ^c	<i>Bacillus subtilis</i>
ATCC10240 ^c	<i>Micrococcus flavus</i>
ATCC25922 ^c	<i>E. coli</i>
ATCC27853 ^c	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
246	<i>Proteus vulgaris</i>
NCIMB 9111 ^e	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
ATCC33090 ^{Tc}	<i>List. innocua</i>

Bac⁺ - soj koji proizvodi bakteriocin.

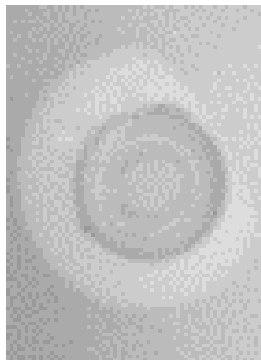
^cAmerican Type Culture Collection/ATCC Collection; ^dJapan Collection of Microorganisms, RIKEN BRC which is participating in the National BioResource Project of the MEXT, Japan/JCM kolekcija mikroorganizama; ^eUK's National Collection of Industrial Bacteria/NCIMB.

Rezultati

Pored inhibitornog efekta koji ostvaruje na sojeve pripadnike iste ili blisko srodnih vrsta, soj BGUB9 ispoljava antimikrobni potencijal i prema velikom broju patogenih vrsta kao što su *Streptococcus pneumoniae*, *Strep. pyogenes*, *Listeria innocua*, i druge.

Testom unakrsne inhibicije ispitano je međusobno antagonističko delovanje sojeva predstavnika *Lb. casei/paracasei* grupe proizvođača bakteriocina. Interesantano je ovde naglasiti da je soj BGUB9 inhibitorno delovao na čak 12 sojeva laktobacila proizvođača bakteriocina (BGNJ1-61, BGDA17b, BGBUK2-16, BGZLS10-6, BGGR2-68, BGNJ1-24, BGNJ1-35, BGNJ1-77, BGNJ1-64, BGPT2-48, BGZLS10-1, BGZLM1-2), a da ni jedan od analiziranih sojeva nije ostvario antimikrobno dejstvo na soj BGUB9 kada je on korišćen kao indikatorski soj u bakteriocinskim testovima (Tabela 5 i Tabela 7).

Inhibitorni efekat soja BGUB9 može se pripisati i prisustvu dodatne antimikrobne supstance čija je proteinska priroda pokazana bakteriocinskim testom sa proteazom tip XIV. U prisustvu kristala proteaze tipa XIV u blizini bunarčića dolazi do pojave karakterističnog polumesečastog izgleda zone inhibicije usled odsustva antimikrobne aktivnosti u blizini proteaze, koja degraduje proteine (Slika 7). Ovaj test je potvrdio da soj BGUB9 sintetiše bakteriocin, nazvan BacUB9.



Slika 7. Analiza sposobnosti sinteze bakteriocina soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9. Polumesečast izgled zone inhibicije je posledica aktivnosti proteaze tipa XIV. Kao indikatorski soj korišćen je senzitivni soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14.

Bakteriocin BacUB9 deluje i na soj *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, predstavnike vrste *Lb. plantarum* ATCC14917, A112 i BGAN8, zatim na soj *Lb.*

rahmnosus BGEN1, kao i na nekoliko laktokokalnih sojeva predstavnika vrste *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 i BGIS29. Zanimljiv je podatak da kao i u slučaju bakteriocina BacSJ poreklom iz soja BGSJ2-8, bakteriocin BacUB9 od svih testiranih proizvođača bakteriocina iz roda *Lactococcus* deluje samo na soj BGIS29. Pokazano je i inhibitorno delovanje acetonom precipitiranog supernatanta soja BGUB9 i na sojeve *Ent. faecalis* JCM 5803^T, *Ped. pentosaceus* JCM 5885, *Ped. dextrinicus* JCM 5887^T i soj *List. innocua* ATCC33090^T.

4.5.2. Biohemijska karakterizacija bakteriocina BacUB9

Za sve biohemijske testove korišćen je supernatant šesnaestočasovne prekonodne kulture soja BGUB9.

4.5.2.1. Efekat proteolitičkih enzima, različitih pH vrednosti i temperatura na aktivnost bakteriocina BacUB9

Tretman bakteriocina BacUB9 različitim proteolitičkim enzimima kao što su proteaza tip XIV, proteinaza K, α -himotripsin, pepsin i tripsin rezultuje u gubitku antimikrobne aktivnosti bakteriocina ukazujući na taj način na njegovu proteinsku prirodu. Na inhibitorno dejstvo bakteriocina BacUB9 na senzitivni indikator soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14 nije imao efekat tretman katalazom, DNK-azom, RNK-azom i lizozimom.

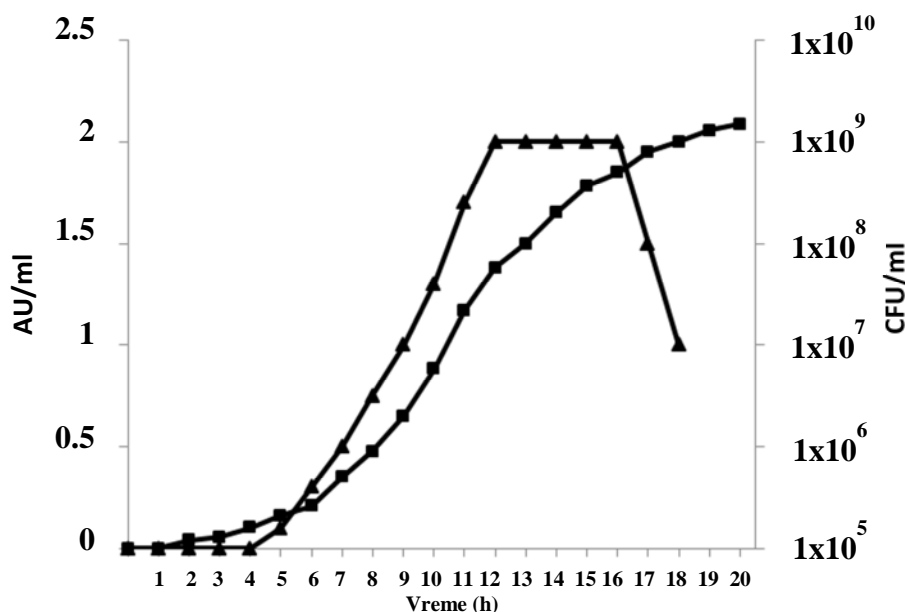
Bakteriocin BacUB9 kada je prisutan u supernatantu zadržava antimikrobnu aktivnost u opsegu pH od 1 do 10, dok se ona potpuno inaktivira na pH11. Nakon 30 min inkubacije na pH11 BacUB9 gubi svoju aktivnost koja se više ne može obnoviti ni nakon ponovnog podešavanja vrednosti supernatanta na pH7.

Bakteriocin BacUB9 je umereno termostabilan molekul, koji zadržava antimikrobnu aktivnost i nakon inkubiranja 30 min na 100°C. Efekat inkubiranja 60 min na 100°C je smanjena bakteriocinska aktivnost, dok toplotni tretman u trajanju od 120 min na 100°C kao i sterilizacija bakteriocinskih uzoraka u autoklavu u trajanju od 15 min na 121°C, dovodi do potpunog gubitka bakteriocinske aktivnosti.

Rezultati dobijeni biohemijskom karakterizacijom bakteriocina BacUB9 potvrdili su njegovu proteinsku prirodu i ukazali su na njegovu verovatnu pripadnost klasi II bakteriocina.

4.5.2.2. Kinetika sinteze bakteriocina BacUB9

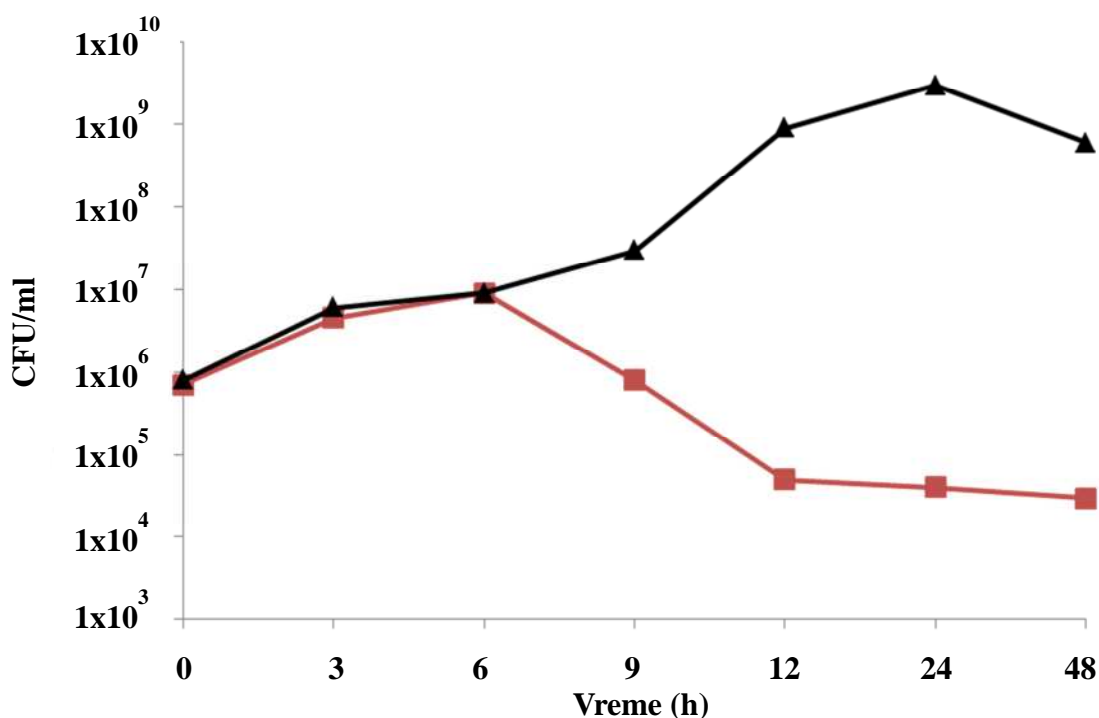
Utvrđeno je da soj BGUB9 kada raste u MRS medijumu proizvodi bakteriocin u zavisnosti od faze rasta u kojoj se nalazi. Nije bilo moguće detektovati bakteriocinsku aktivnost u prvih 5 sati rasta kulture soja BGUB9 na 30°C. Sinteza bakteriocina BacUB9 dostiže plato, najvišu vrednost posle 12 sati inkubacije na 30°C, kada kultura ulazi u ranu stacionarnu fazu rasta, a proizvodnja se nastavlja do 16 sati inkubacije, nakon čega sinteza bakteriocina brzo opada (Slika 8). Analizirana je i proizvodnja bakteriocina BacUB9 u modifikovanom medijumu za rast. Uočeno je značajno povećanje proizvodnje bakteriocina BacUB9, koje je praćeno merenjem veličine zone inhibicije indikatorskog soja, kada soj raste u MRS medijumu sa 2% glukoze.



Slika 8. – Sinteza bakteriocina BacUB9 soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9 na 30°C u MRS medijumu u zavisnosti od faze rasta; ▲ - AU/ml; ■ - CFU/ml.

4.5.2.3. Efekat soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9 na rast soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14 u mešanoj kulturi

U cilju utvrđivanja da li bakteriocin BacUB9 pokazuje baktericidni ili bakteriostatički način delovanja, praćen je efekat parcijalno prečišćenog bakteriocina na preživljavanje senzitivnog indikator soja. Tretman soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14 sa bakteriocinom BacUB9 dovodi do značajnog smanjenja broja preživelih ćelija. U slučaju kada je početni broj ćelija soja BGHN14 bio 10^6 cfu/ml, nakon 12 sati od početka tretmana dolazi do smanjenja broja preživelih ćelija senzitivnog soja na 3×10^4 cfu/ml (Slika 9). Stoga se može zaključiti da BacUB9 poseduje bakterioistatički način delovanja.

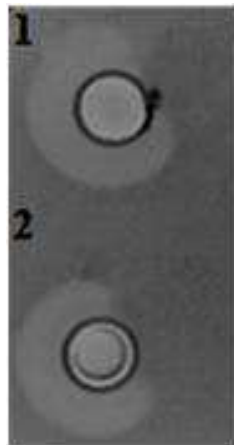


Slika 9. Efekat soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9 na rast soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14 u mešanoj kulturi. Rast soja BGHN14 u čistoj (▲) i mešanoj kulturi (■).

4.5.3. Izolovanje bakteriocina BacUB9

Izolovanje bakteriocina BacUB9 rađeno je frakcionisanjem supernatanta prekončne kulture (stare 16 sati) soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9, gajene u MRS medijumu, amonijum sulfatnom precipitacijom. Najveća aktivnost (kao mera

aktivnosti bakteriocinskih frakcija korišćena je veličina zone inhibicije rasta senzitivnog indikator soja) dobijena je u frakciji dobijenoj precipitacijom sa 40% zasićenim rastvorom amonijum sulfata. Nakon hloroformske ekstrakcije aktivnost je detektovana samo u interfaznoj frakciji, koja je zatim prečišćena korišćenjem reverzno-fazne hromatografije. Frakcija sa najvećom aktivnošću, koja je u bakteriocinskom testu dala najveću zonu inhibicije, eluirana je sa C18 kolone 50% izopropanolom (Slika 10). Ovako pripremljen uzorak korišćen je za Tricin SDS-PAGE analizu.



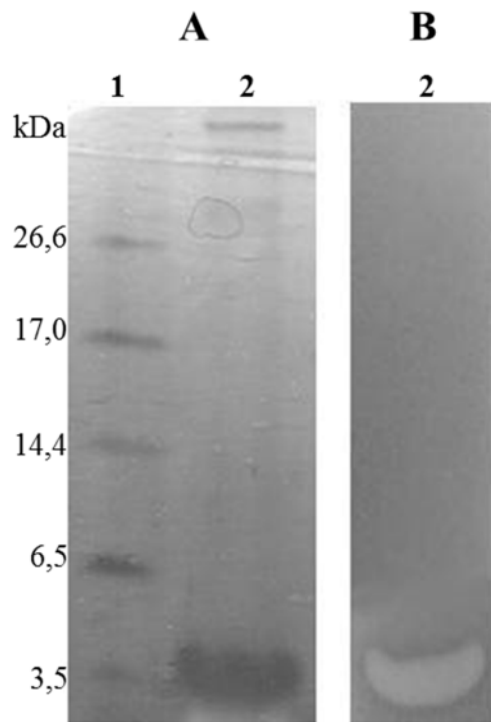
Slika 10. Analiza antimikrobne aktivnosti bakteriocinskih frakcija: 1. Hloroformska frakcija, 2. Frakcija eluirana sa C18 kolone 50% izopropanolom. Kao indikatorski soj korišćen je senzitivni soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14.

Aktivan bakteriocinski uzorak dobijen precipitacijom supernatanta prekononoćne kulture soja BGUB9 acetonom korišćen je za analizu masenom spektrometrijom LC/MS („Liquid chromatography/mass spectrometry“).

4.5.3.1. Određivanje molekulske mase bakteriocina BacUB9 iz uzorka dobijenog reverzno faznom hromatografijom na C18 koloni

Tricin SDS-PAGE analiza uzorka dobijenog nakon preparativne reverzno fazne hromatografije na C18 koloni je pokazala da se u uzorku nalazi protein, približne molekulske mase oko 3,5 kDa (Slika 11A) i da je on odgovoran za antimikrobnu aktivnost koja dovodi do inhibicije rasta senzitivnog soja BGHN14. Vizuelizacija proteinske trake rađena je tako što je druga polovina gela na kojoj se pored bakteriocinske frakcije nalazio i proteinski marker bojena komazi-plavim R250.

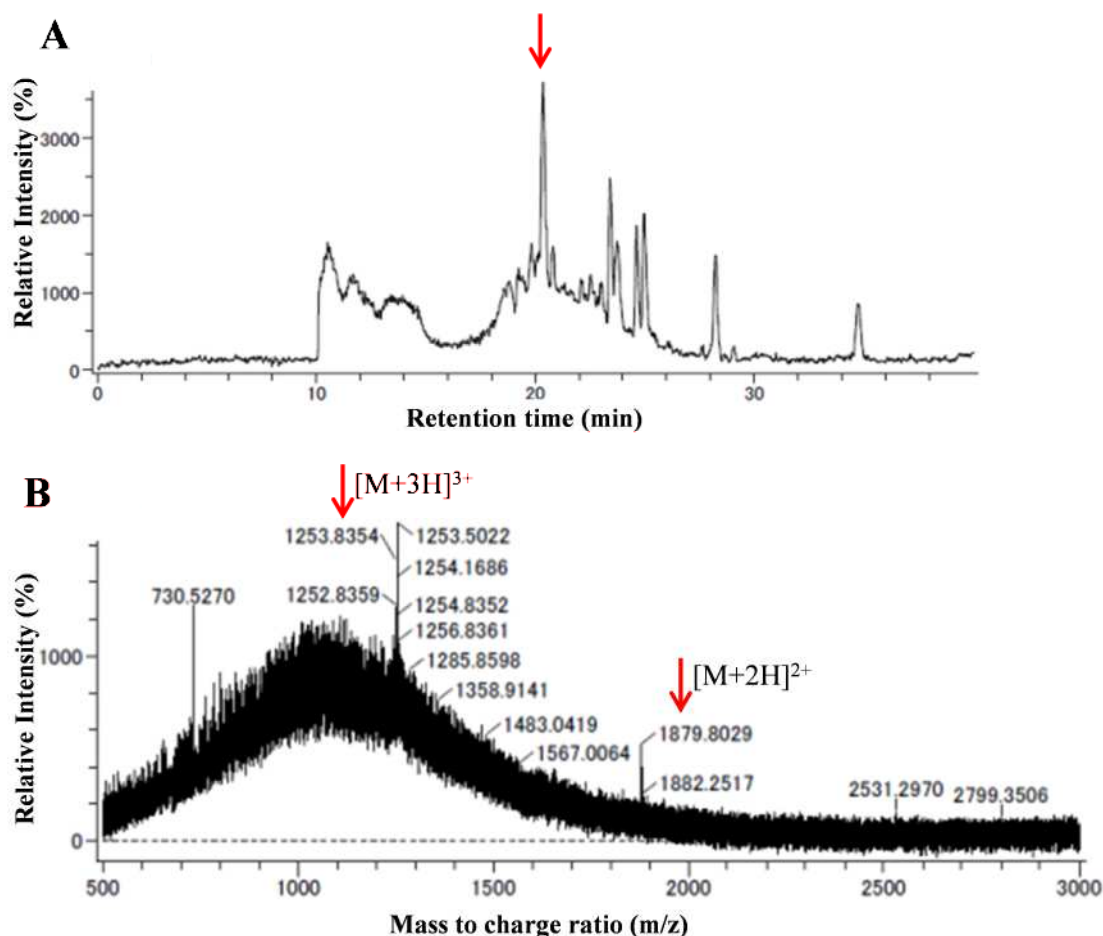
Aktivnost bakteriocinske frakcije potvrđena je prisustvom zone inhibicije u nivou detektovane proteinske trake nakon preliivanja druge polovine gela soft agarom inokulisanim indikatorskim sojem BGHN14 (Slika 11B).



Slika 11. **A** - Tricin SDS-PAGE analiza aktivne bakteriocinske frakcije nakon preparativne reverzno fazne hromatografije na C18 koloni i **B** - detekcija bakteriocinske aktivnosti na gelu. **A**) 1. Proteinski standard; 2. Proteinska traka bakteriocina BacUB9; **B**) 2. antimikrobna aktivnost BacUB9 na gelu preliveanim soft MRS agarom inokulisanim indikatorskim sojem *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14.

4.5.3.2. Određivanje molekulske mase bakteriocina BacUB9 iz uzorka dobijenog acetonskom precipitacijom

Dalja analiza uzorka bakteriocina, dobijenog precipitacijom iz supernatanta acetonom, rađena je masenom spektrometrijom LC/MS (Zendo *et al.* 2008). Nakon analize masenog spectra identifikovanog pika u 20,82 min na masenom hromatogramu pokazano je da se u uzorku nalazi protein čija molekulska masa iznosi 3758 Da (Slika 12).



Slika 12. Masena spektrometrija acetonske frakcije bakteriocina BacUB9. **A** – maseni hromatogram acetonske frakcije u opsegu m/z 1000 – 3000; **B** – maseni spektar potencijalnog bakteriocinskog pika sa “Retention time” od 20,28 min.

Identifikovani pikovi od 1253 i 1879 ($[M+3H]^{3+}$ i $[M+2H]^{2+}$), su derivati poreklom od proteinske komponente molekulske mase od 3758 Da. Za dobijeni pik od 730 se smatra da je poreklom od komponente medijuma (Tabela 8). Molekulska masa (M) identifikovanog bakteriocina izračunata je na osnovu sledeće formule: $M = ([M+2H]^{2+}-1)*2 = ([M+3H]^{3+}-1)*3 = \dots = ([M+nH]^{n+}-1)*n$. Gde je n – “charge”, a $[M+nH]^{n+}$ - detektovana vrednost (m/z , “mass to charge ratio”).

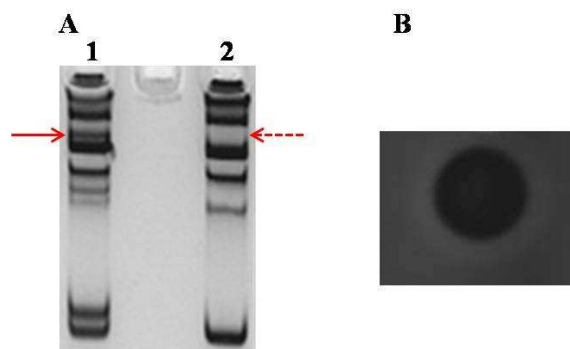
Rezultati

Tabela 8. Identifikovane molekulske mase molekula dobijenih acetonskom precipitacijom iz supernatanta soja BGUB9

Soj	“Retention time” (min)	Detektovani pikovi (m/z)	Molekulske mase (Da)
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BGUB9	19,2	701, 1089, 1451	4356
	20,82	730, 1253 , 1879	3758
	25	889, 1344, 1792	5376
	28,2	1074, 1611	3222
	28,6	1231, 1846	3693
	29,1	1269	3807

4.5.4. Lokalizacija bakteriocinskih gena kod soja BGUB9

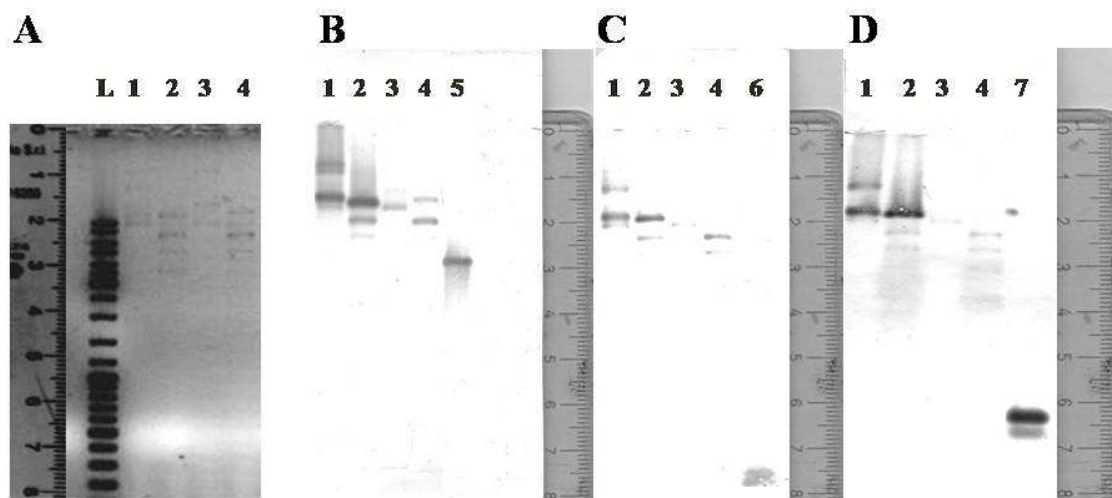
Da bi se ispitala moguća plazmidna lokalizacija gena koji kodiraju proizvodnju i imunost na bakteriocin BacUB9, primenjena je metoda čišćenja plazmida iz soja BGUB9. Dobijeni su čišćeni derivati soja BGUB9 koji su izgubili sposobnost sinteze bakteriocina, kao i imunost na njegovo dejstvo. Upoređivanjem plazmidnih profila soja BacUB9 i njegovog čišćenog derivata, označenog kao BGUB9-96, koji ne proizvodi bakteriocin i senzitivan je na njegovo delovanje, pokazana je ekstrahromozomalna lokalizacija (u okviru istog plazmida) kompletne genetičke determinante za proizvodnju i imunost na bakteriocin BacUB9 (Slika 13).



Slika 13. **A** - Plazmidni profil soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9 i njegovog čišćenog derivata BGUB9-96, koji ne proizvodi bakteriocin **1** - BGUB9 Bac⁺; **2** - BGUB9-96 Bac⁻. (→ – Strelica pokazuje plazmid koji nedostaje u Bac⁻ derivatu); **B** – Analiza inhibitornog delovanja soja BGUB9 kada se kao indikator koristi Bac⁻ derivat BGUB9-96).

Rezultati

U cilju potvrde plazmidne lokacije bakteriocinskih gena homolognih odgovarajućim genima poreklom sa plazmida pSJ2-8, urađena je „Southern blot“ analiza cirkularnih formi plazmida i plazmida isečenih *Bam*HI restrikcionim enzimom poreklom iz soja BGUB9 i njegovog čišćenog Bac⁻ derivata. gde su kao probe korišćeni PCR fragmenti, poreklom sa plazmida pSJ2-8, koji nose *abcT* i *acc* gene (fragment dužine 3730 bp), *acdT* gen (fragment dužine 190 bp) i *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon (fragment dužine 660 bp) (Slika 14).

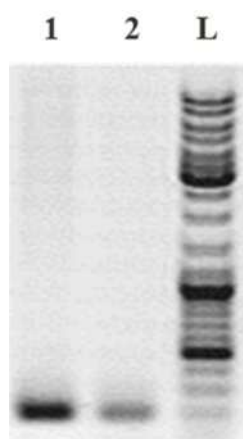


Slika 14. **A** - Elektroforeza plazmida izolovanih iz soja BGUB9 i njegovog čišćenog Bac⁻ derivata BGUB9-96 na 1% agaroznom gelu i „Southern blot“ hibridizacija sa PCR probama za: **B** - *abcT* i *acc* gene, **C** – *acdT* gen i **D** - *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon; L - "Gene Ruler™" 1 kbp DNA Ladder mix, 1. nesečeni plazmidi soja BGUB9, 2. sečeni plazmidi soja BGUB9 *Bam*HI enzimom, 3. nesečeni plazmidi Bac⁻ derivata BGUB9-96, 4. sečeni plazmidi Bac⁻ derivata BGUB9-96 *Bam*HI enzimom, 5. Proba za *abcT* i *acc* gene, 6. Proba za *acdT* gen i 7. Proba za *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon.

Analizom dobijenih rezultata uočava se da soj BGUB9 na *Bam*HI fragmentu, dužine oko 10 kb, poseduje gene koji kodiraju ABC – transporter (*abcT*) i pomoćni protein (*acc*) homologe odgovarajućim genima poreklom sa plazmida pSJ2-8 (Slika 14). Možemo uočiti da soj BGUB9 kao i njegov Bac⁻ derivat BGUB9-96 poseduju gen za acidocin 8912 (*acdT*), što je potvrđeno i u PCR reakciji sa prajmerima F1*acdT*/R1*acdT* u kojoj su totalni plazmidi poreklom iz soja BGUB9 i derivata BGUB9-96 korišćeni kao

matrica (Slika 15). Dobijeni rezultati ukazali su da soj BGUB9, iako poseduje strukturni gen za acidocin 8912 poreklom iz soja BGSJ2-8, ipak ne produkuje ovaj bakteriocin.

Hibridizacijom je pokazano da se na *Bam*HI fragmentu većem od 10 kb poreklom sa plazmida soja BGUB9 nalazi sekvenca homologa sekvenci *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operona. Signal koji odgovara ovom *Bam*HI fragmentu, u slučaju kada su u hibridizaciji korišćeni plazmidi izolovani iz *Bac*⁻ derivata, nije detektovan (Slika 14), što je ukazalo na mogućnost da soj BGUB9, pored bakteriocina BacUB9, sintetiše i bakteriocin sličan ili isti kao bakteriocin BacSJ poreklom iz soja BGSJ2-8.



Slika 15. Elektroforeza PCR produkata dobijenih sa prajmerima F1acdT/R1acdT za *acdT* gen na 1% agaroznom gelu: 1. BGUB9; 2. BGUB9-96; L - „Gene RulerTM“ 1 kbp DNA Ladder mix.

4.6. Molekularna determinacija i karakterizacija soja BGGR2-66

PCR analizom učestalosti bakteriocinskih gena kod sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe, utvrđeno je da soj BGGR2-66 poseduje potencijalne bakteriocinske gene neophodne za proizvodnju bakteriocina BacSJ i acidocina 8912, ali da ne poseduje gen za ABC-transporter (Tabela 6). Na osnovu antimikrobnog spektra delovanja soj BGGR2-66 je svrstan u C grupu zajedno sa sojem BGBUK2-16, koji proizvodi bakteriocin Bac217 (Rezultati, 4.1. Detekcija antimikrobne aktivnosti sojava *Lb. casei/paracasei* grupe). Dobijeni rezultati su indicirali da inhibitorna aktivnost soja BGGR2-66 može poticati od proizvodnje ili bakteriocina BacSJ, acidocina 8912 ili bakteriocina Bac217, međutim odsustvo *abcT* gena, uočene razlike u antimikrobnom spektru u odnosu na pomenute bakteriocine, senzitivnost na delovanje soja BGSJ2-8,

kao i pojava zone inhibicije rasta indikatorskih sojeva (kada se soj BGGR2-66 koristi kao proizviđač) tek nakon 48 sati inkubacije na 30°C (Rezultati, 4.1. Detekcija antimikrobne aktivnosti sojava *Lb. casei/paracasei* grupe), ukazali su na mogućnost da soj BGGR2-66 sintetise drugačiji bakteriocin.

Soj BGGR2-66 je prirodni izolat poreklom iz sira proizvedenog u domaćinstvu, bez dodataka starter kulture, sa lokaliteta Zakurjaj na nadmorskoj visini od 750 m. Korišćenjem molekularnih metoda, Rep-PCR-a sa (GTG)₅ prajmerom i sekvenciranjem gena za 16S rRNK soj BGGR2-66 je identifikovan kao predstavnik vrste *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*.

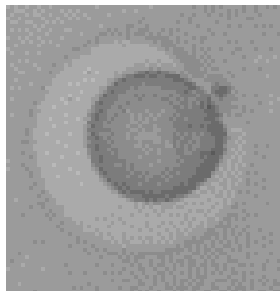
Daljom karakterizacijom soja BGGR2-66 utvrđeno je da pored proizvodnje bakteriocina, što je veoma česta odlika probiotičkih sojeva (Ghosh *et al.*, 2004), sintetise kapsularni polisaharid (CPS) i poseduje sposobnost adhezije za epitelijalne ćelije. PCR analizom je pokazano da soj BGGR2-66 poseduje plazmidno lokalizovane gene, koji pokazuju visok stepen homologije sa *cps1J*, *cps1G*, *cps1B*, i *cps1A* genima uključenim u sintezu CPS-a preklom iz soja *L. casei* Shiota (rezultati nisu prikazani).

4.6.1. Antimikrobna aktivnosti soja BGGR2-66 i proizvodnja bakteriocina

Analiza inhibitornog delovanja soja BGGR2-66 je ukazala na njegov izuzetno uzak antimikrobni spektar delovanja (Tabela 5) ograničen isključivo na pripadnike iste vrste. Najveća zona inhibicije uočena je prilikom delovanja soja BGGR2-66 na senzitivni soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGKP20. Ispitivanjem prirode inhibitornog delovanja soja BGGR2-66 utvrđeno je da je ona nezavisna i od sinteze mlečne kiseline kao i od vodonik peroksida, stoga je zaključeno da soj BGGR2-66 proizvodi antimikrobno jedinjenje.

Proteinska priroda inhibitorne supstance pokazana je bakteriocinskim testom sa proteazom tipa XIV. Prisustvo mutne zone inhibicije osetljive na dejstvo proteaze tipa XIV (koja degraduje proteine) bio je prametar na osnovu koga je zaključeno da je identifikovana antimikrobna supstanca bakteriocin, označen kao BacGR (Slika 16). Testom unakrsne inhibicije pokazano je da od svih testiranih proizviđača, predstavnika *Lb. casei/paracasei* grupe samo sojevi BGSJ2-8 i BGJB9-123, deluju inhibitorno na rast soja BGGR2-66. U prethodno navedenim eksperimentima za testiranje antimikrobnog

potencijala soja BGGR2-66 korišćena je prekonocna kultura stara 16 sati. Kada je kao uzorak koji se testira korišćen supernatant prekonocne kulture, ne dolazi do inhibicije rasta indikatorskih sojeva, što ukazuje na malu količinu bakteriocina koji se oslobađa u medijum za rast.



Slika 16. Analiza sposobnosti sinteze bakteriocina soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGGR2-66. Polumesečast izgled zone inhibicije je posledica aktivnosti proteaze tipa XIV. Kao indikator korišćen je soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGKP20.

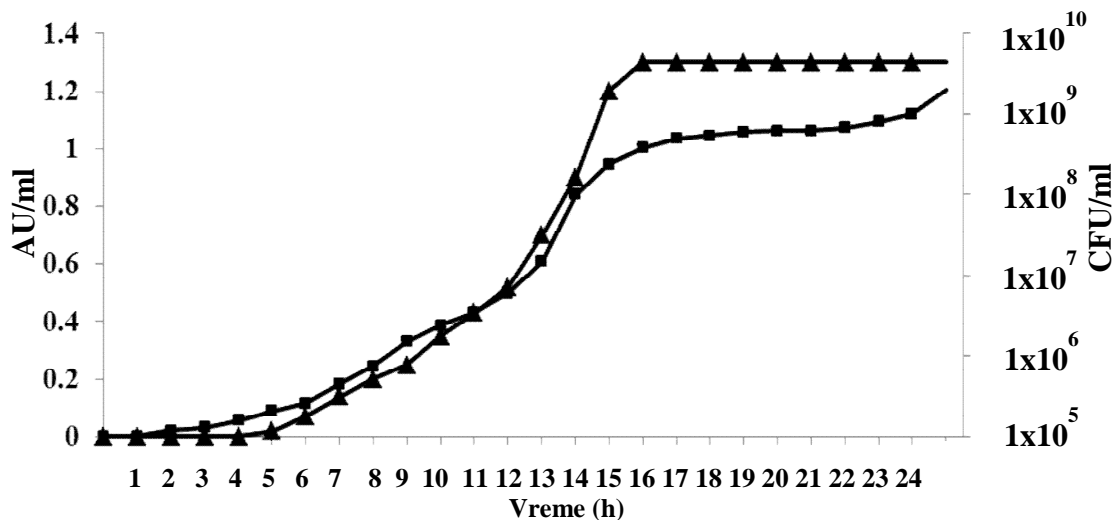
4.6.2. Biohemijska karakterizacija bakteriocina BacGR

Usled malog prinosa prečišćenog bakteriocina u odnosu na početni uzorak, za analizu biohemijskih karakteristika bakteriocina BacGR korišćen je delimično prečišćeni bakteriocinski preparat tj. ćelijski ekstrakt, dobijen hloroformskom ekstrakcijom bakteriocina iz ćelijskog taloga.

Za bakteriocin BacGR je pokazano da je umereno termostabilan molekul koji zadržava antimikrobnu aktivnost i nakon inkubiranja 30 min na 100°C, dok se njegovo inhobitorno dejstvo potpuno gubi nakon autoklaviranja u trajanju od 15 min na 121°C. Uticaj različitih pH vrednosti na aktivnost bakteriocina BacGR testiran je inkubiranjem u trajanju od jednog sata na 30°C, na pH vrednostima od 1 do 11. Na pH11 dolazi do potpune inaktivacije testiranog bakteriocina. Inaktivacija bakteriocina ostvaruje se i delovanjem proteolitičkih enzima (proteaza tip XIV, proteinaza K, α -himotripsin, pepsin i tripsin) koji dovode do potpunog gubitka bakteriocinske aktivnosti.

4.6.2.1. Kinetika proizvodnje bakteriocina BacGR

Kinetika proizvodnje bakteriocina praćena je tokom rasta soja BGGR2-66 u MRS medijumu. Antimikrobno dejstvo testiranog uzorka ispoljava se nakon 6 sati od inokulacije medijuma, na temperaturi gajenja od 30°C, što se podudara sa završetkom ekspanzionalne faze rasta i ulaskom u ranu stacionarnu fazu (Slika 17). Zona inhibicije rasta senzitivnog soja BGKP20 je rasla sve do šesnaestog sata, kada je dostigla maksimalnu veličinu koja je ostala ista i prilikom testiranja svih kasnijih uzoraka do isteka 24 sata. Ovde je važno napomenuti da se zona inhibicije kod uzoraka uzetih u svim testiranim vremenskim intervalima pojavljuje tek nakon 48 sati inkubacije na 30°C.



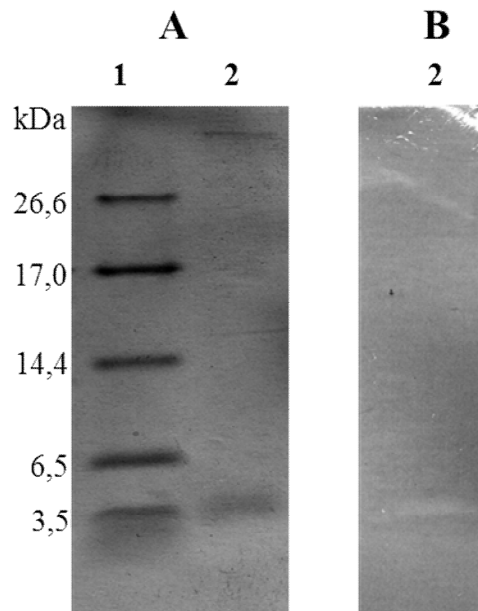
Slika 17. Sinteza bakteriocina BacGR soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGGR2-66 na 30°C u MRS medijumu u zavisnosti od faze rasta; ▲ - AU/ml; ■ - CFU/ml.

4.6.3. Izolovanje bakteriocina BacGR

Izolovanje bakteriocina BacGR je rađeno hloroformsom ekstrakcijom bakteriocina iz ćelijskog taloga nakon gajenja na čvrstom MRS medijumu na 30°C u trajanju od 48 sati. Utvrđeno je da se bakteriocin BacGR nalazi u interfazi (aktivna frakcija je detektovana bakteriocinskim testom na soj BGKP20).

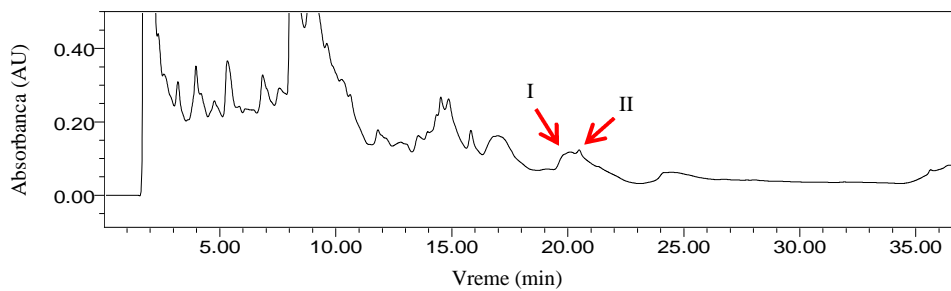
Rezultati

Dobijeni bakteriocinski preparat je zatim podvrgnut Tricin SDS-PAGE analizi, koja je pokazala da se u uzorku nalazi jedan protein, približne molekulske mase oko 3,5 kDa. Antimikrobna aktivnost je potvrđena prelivanjem gela MRS agarom koji je sadržao indikator soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGKP20 (Slika 18).

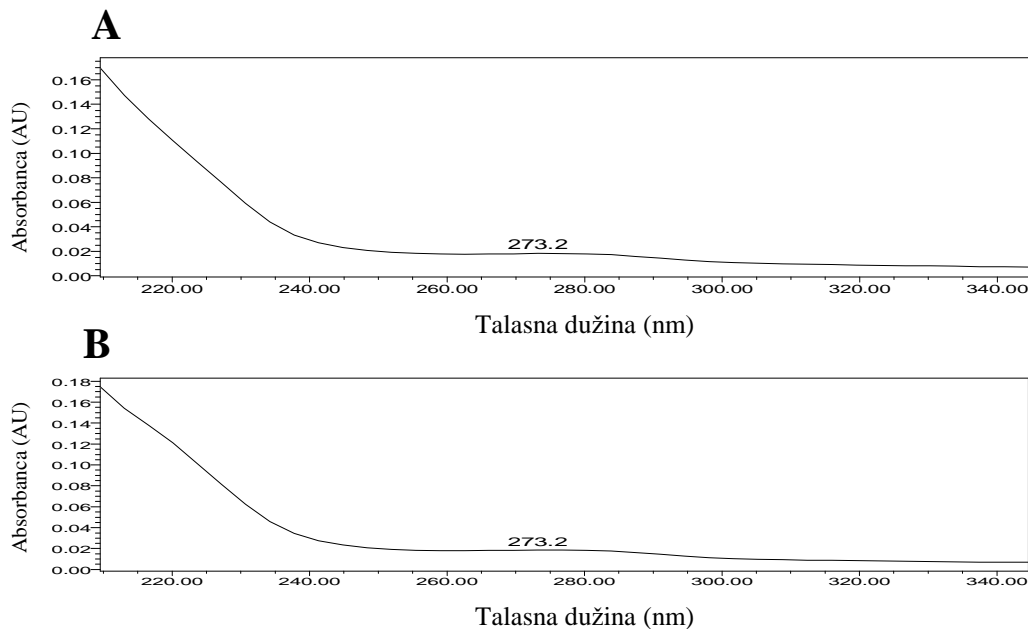


Slika 18. **A** - Tricin SDS-PAGE analiza aktivne bakteriocinske frakcije nakon hloroformske ekstrakcije i **B** - detekcija bakteriocinske aktivnosti na gelu: **A**) 1. Proteinski standard; 2. Proteinska traka bakteriocina BacGR; **B**) 2. antimikrobna aktivnost BacGR na gelu preliveanim soft MRS agarom inokulisanim indikatorskim sojem *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGKP20.

Aktivna hloroformska frakcija je zatim iskorišćena za prečišćavanje BacGR korišćenjem reverzno-fazne tečne hromatografije visokih performansi (HPLC). Nakon elucije sa kolone identifikovane su dve aktivne frakcije označene kao I i II, koje odgovaraju uzorcima eluiranim u 19,8 min odnosno 20,4 min reakcije (Slika 19). Zatim je urađena analiza ekstrahovanih pikova u opsegu talasnih dužina 210-350 nm, koja je pokazala da su identifikovani pikovi poreklom od proteinskih frakcija (Slika 20).

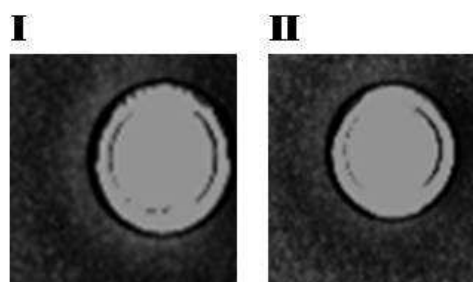


Slika 19. Hromatogram reverzno-fazne tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) uzorka dobijenog hloroformskom ekstrakcijom. Za hromatografiju je korišćena Symmetry300™ kolona. Prikazana je apsorbancija na 220 nm.



Slika 20. Analiza ekstrahovanih pikova koji odgovaraju eluiranim frakcijama u UV detekcionom spektru (210 – 350 nm). **A.** – Spektar koji odgovara frakciji I i **B.** – Spektar koji odgovara frakciji II.

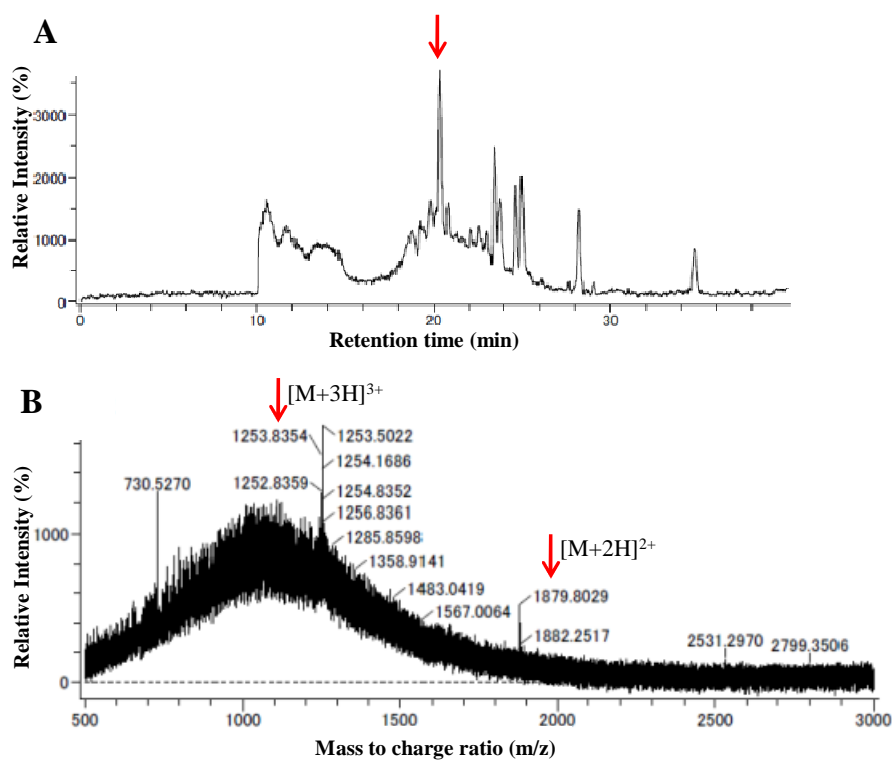
Elurane frakcije testirane su zatim na prisustvo bakteriocinske aktivnosti metodom sa bunarićima (Slika 21). Aktivni uzorci su nakon toga analizirani korišćenjem masene spektrometrije, metodom ESI-MS (“Electrospray ionization mass spectrometry”).



Slika 21. Analiza antimikrobne aktivnosti eluiranih frakcija nakon HPLC-a: **I** – Aktivna frakcija eluirana u 19,8 min i **II** - Aktivna frakcija eluirana u 20,4 min.

4.6.4. Molekulska masa i N-terminalna sekvenca bakteriocina BacGR

Uzorak bakteriocina BacGR prečišćen korišćenjem HPLC-a je analiziran masenom spektrometrijom, korišćenjem metode ESI-MS (Slika 22).



Slika 22. **A** - Maseni spektar aktivne frakcije I bakteriocina BacGR i **B** - Maseni spektar aktivne frakcije II bakteriocina BacGR.

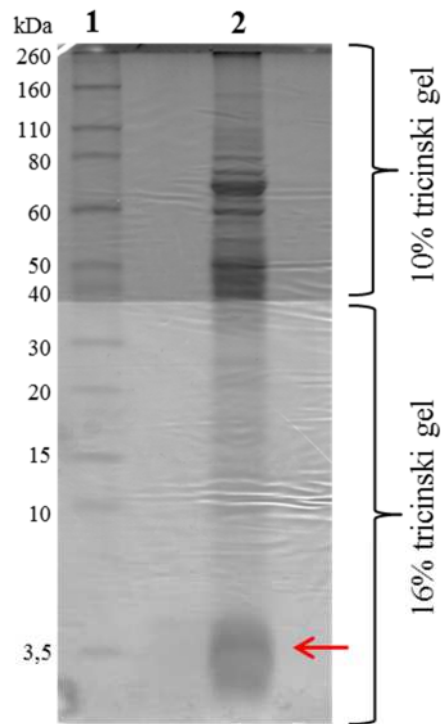
Rezultati

Analizom dobijenog masenog spektra aktivnih bakteriocinskih frakcija I i II bakteriocina BacGR, uočeno je prisustvo brojnih peptida kod oba uzorka, koji u većini predstavljaju kontaminante verovatno poreklom iz medijuma. Identifikovani su i pikovi koji odgovaraju peptidima sa mogućom bakteriocinskom funkcijom ali sa manjom molekulskom masom od očekivane vrednosti od 3,5 kDa dobijene na osnovu Tricin SDS-PAGE analize. Postoji mogućnost da je došlo do razlaganja bakteriocinskog peptida (Tabela 9).

Tabela 9. Identifikovani pikovi aktivnih bakteriocinskih frakcija I i II bakteriocina BacGR.

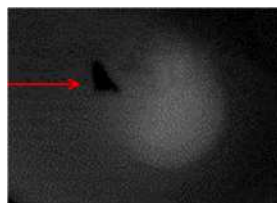
Soj	“Retention time” (min)	Detektovani pikovi (m/z)
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BGGR2-66	19,8	2207, 1440, 2632
	20,4	3218 , 93494

Usled toga što na prethodno opisan način korišćenjem HPLC-a, nije dobijena dovoljna količina prečišćenog uzorka koja bi mogla biti iskorišćena za N-terminalno sekvenciranje modifikovani su pojedini koraci prilikom izolacije bakteriocina BacGR. Aktivna hloroformska frakcija, dobijena na prethodno opisan način, je iskorišćena za testiranje Tricin SDS-PAGE analizom na diskontinuiranom gelu za razdvajanje. Gel za razdvajanje činile su dve faze, 10% i 16%, što je omogućilo bolje razdvajanje bakteriocinske trake od ostalih proteinskih traka prisutnih u testiranom uzorku. Nakon bojenja gela identifikovana je proteinska traka očekivane veličine oko 3,5 kDa (Slika 23).



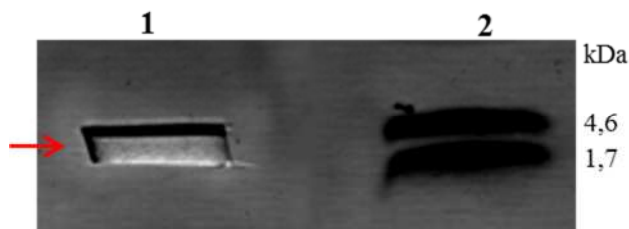
Slika 23. Tricin SDS-PAGE analiza aktivne hloroformske frakcije bakteriocina BacGR na diskontinuiranom tricinskom gelu: 1. Proteinski standard; 2. Hloroformska frakcija bakteriocina BacGR. (→ – Strelica pokazuje proteinsku traku bakteriocina BacGR).

Nakon ekstrahovanja bakteriocina iz tricinskog gela dobijeni uzorak je testiran bakteriocinskim testom iskapavanjem čime je pokazano inhibitorno dejstvo bakteriocina BacGR na indikator soj BGKP20 (Slika 24).



Slika 24. Analiza antimikrobne aktivnosti uzorka bakteriocina BacGR nakon ekstrakcije iz tricinskog gela. Polumesečast izgled zone inhibicije je posledica aktivnosti proteaze tipa XIV. (→ – Strelica pokazuje mesto nanošenja proteaze).

Aktivan bakteriocinski uzorak je nakon završene Tricin-SDS elektroforeze, prenesen na PVDF membranu. Membrana je zatim isečena u nivou koji odgovara proteinskoj traci veličine između 1,7 i 4,6 kDa, i poslata je na N-terminalno sekvenciranje (Slika 25).



Slika 25. Aktivirani bakteriocinski uzorak koji je prenesen na PVDF membranu sa tricinskog gela. (→ – Strelica pokazuje mesto isecanja membrane sa uzorkom bakteriocina BacGR).

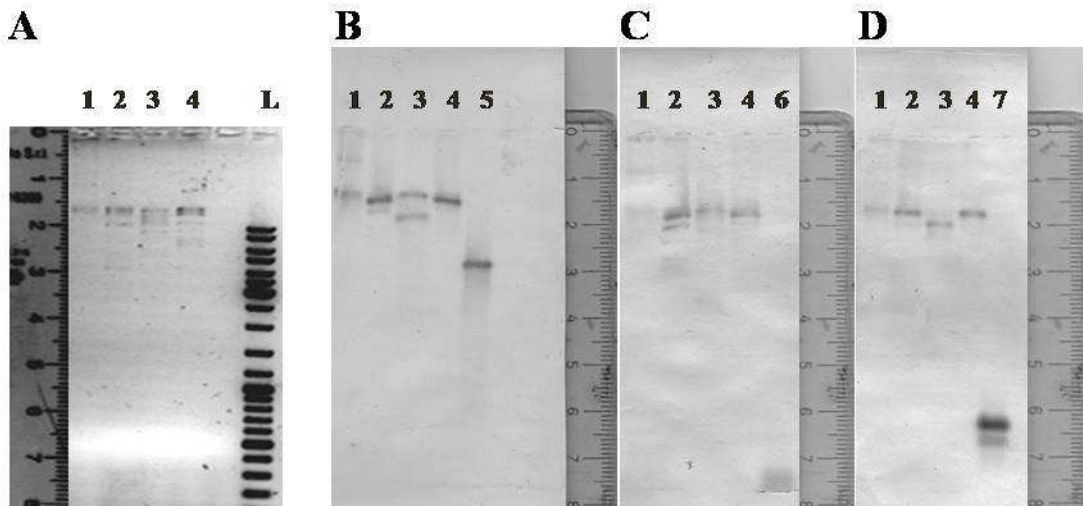
Bakteriocinski uzorak nanet na drugi tricinski gel je nakon završene elektroforeze ekstrahovan na prethodno opisan način, a zatim je bakteriocinskim testom iskapavanjem potvrđena njegova antimikrobna aktivnost.

N-terminalna aminokiselinska sekvenca prečišćenog bakteriocina BacGR dobijena je primenom metode Edmanove degradacije i „Pulsed-liquid Blot” metode. Sekvenca prvih deset aminokiselina bakteriocina BacGR je **GNVAELTEVR**. Pretraživanjem NCBI/BLAST baze podataka nije pronađen nijedan protein koji poseduje sličan N-terminalni domen.

4.6.5. Lokalizacija bakteriocinskih gena kod soja BGGR2-66

Metodom čišćenja plazmida utvrđeno je da su kod soja BGGR2-66 bakteriocinski geni plazmidno lokalizovani. Za dalji rad je odabran jedan Bac⁺ derivat označen kao BGGR2-66-88. Da bi se utvrdilo da li su i kod soja BGGR2-66 bakteriocinski geni homologni odgovarajućim genima poreklom sa plazmida pSJ2-8, plazmidno lokalizovani, urađena je „Southern blot“ hibridizacija totalnih plazmida izolovanih iz soja BGGR2-66 i prečišćenih u gradijentu cezijum hlorida. Kao probe za hibridizaciju su korišćeni DNK fragmenti koji nose *abcT* i *acc* gene, *acdT* i *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon dobijeni u PCR reakcijama sa plazmidom pSJ2-8 kao matricom. U reakcijama hibridizacije korišćeni su totalni plazmidi soja BGGR2-66 u cirkularnoj

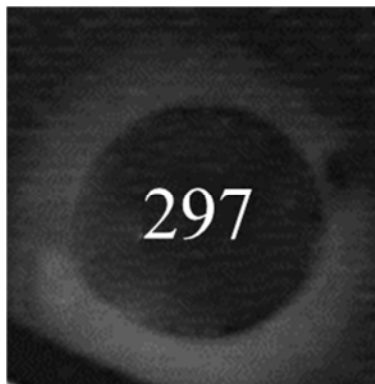
formi i sečeni u zasebnim reakcijama *Bam*HI, *Sal*I i *Pst*I restrikcijom enzimima. Pokazano je da soj BGGR2-66 poseduje sve analizirane gene (Slika 26).



Slika 26. A – Elektroforeza plazmida izolovanih iz soja BGGR2-66 na 1% agaroznom gelu i Southern blot hibridizacija sa PCR-om umnoženim probama za: B – *abcT* i *acc* gene, C – *acdT* gen i D - *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon; 1. nesečeni plazmidi soja BGGR2-66, 2. plazmidi soja BGGR2-66 sečeni *Bam*HI enzimom, 3 plazmidi BGGR2-66 sečeni *Sal*I enzimom, 4. plazmidi BGGR2-66 sečeni *Pst*I enzimom, 5. Proba za *abcT* i *acc*, 6. Proba za *acdT* gen i 7. Proba za *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon, L - "Gene Ruler™" 1 kbp DNA Ladder mix.

Da bi se utvrdilo da li se prethodno analizirani bakteriocinski geni nalaze kao i u slučaju soja BGSJ2-8 na istom plazmidu ili je kao u slučaju soja BGUB9 došlo do genetičkih rearanžmana, u narednom koraku urađene su i PCR reakcije sa plazmidima soja BGGR2-66 i njegovog *Bac*⁻ derivata BGGR2-66-88 sa prajmerima za *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon, *acdT* gen kao i fragment koji nosi *abcT* i *acc* gene. Pokazano je da *Bac*⁻ derivat ne poseduje gen za acidocin 8912 (*acdT*), ali zato daje PCR produkt sa prajmerima kojima se umnožava *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon, što ukazuje da inhibitorna aktivnost soja BGGR2-66 ne potiče i od dejstva bakteriocina *BacSJ*, kao i da su genetičke determinante za bakteriocin *BacSJ* i acidocin 8912 lokalizovane na različitim plazmidima.

U cilju određivanja lokalizacije gena za proizvodnju i imunitet na bakteriocin BacGR, u prvom koraku klonirani su različiti restrikcioni fragmenti poreklom od plazmida soja BGGR2-66 u novokonstruisani vektor pAZILSJ (Materijal i metode, 3.10.2. Konstrukcija plazmidne biblioteke soja BGGR2-66), a zatim su transformacijom ubačeni u heterologog domaćina soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14, koji je senzitivn na delovanje bakteriocina BacGR. Korišćenjem bakteriocinskog testa analizirana je sposobnost identifikovanih Em^r transformanta da inhibiraju rast indikator sojeva BGHN14 i BGKP20. Za dalji rad je odabran jedan Bac⁺ transformant, označen kao BGHN14-297 (Slika 27).



Slika 27. Analiza sposobnosti proizvodnje bakteriocina jednog od transformanta BGHN14-297, koji nosi konstrukt sa *Bam*HI restrikcionim DNK fragmentom poreklom sa plazmida soja BGGR2-66. Kao indikator je korišćen soj BGHN14.

U bakteriocinskim testovima sa bunarićima korišćene su prekonoćne kulture transformanata gajene u MRS medijumu sa i bez dodatka eritromicina (5 µg/ml), da bi se eliminisao inhibitorni efekat eritromicina na rast senzitivnog soja.

Restrikcionom analizom konstrukta, označenog kao pAZILSJbac, poreklom iz transformanta BGHN14-297, pokazano je da ovaj konstrukt nosi *Bam*HI fragment veličine preko 10 kb, koji obezbeđuje sintezu bakteriocina.

5. DISKUSIJA

Literaturni podaci pokazuju da sojevi *Lactobacillus casei/paracasei* grupe predstavljaju dominantne nestarterske bakterije mlečne kiseline ("Non Starter Lactic Acid Bacteria" – NSLAB) prisutne tokom zrenja posebno tvrdih ili polutvrdih sireva (Litopoulou-Tzanetaki, 1990; Fitzsimons *et al.*, 1999; Beresford *et al.*, 2001; Mama *et al.*, 2002; Callon *et al.*, 2004; Ostlie *et al.*, 2005; Samelis *et al.*, 2010). Međutim, okarakterisano je samo nekoliko sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe poreklom iz mikroflore sireva za koje je utvrđeno da sinterišu različite bakteriocine (Lozo *et al.*, 2004; Lozo *et al.*, 2007; Ortu *et al.*, 2007; Settanni *et al.*, 2011). Kako sposobnost produkcije bakteriocina predstavlja važnu karakteristiku sojeva laktobacila, sa stanovišta njihove moguće primene za konzerviranje hrane (Buriti *et al.*, 2007; Anas *et al.*, 2008) ili kao probiotika (Ghosh *et al.*, 2004), brojna istraživanja su usmerena na izučavanje genetičkog potencijala prirodnih izolata. Različiti fermentisani mlečni proizvodi dobijeni na tradicionalni način u domaćinstvima sa specifičnih ekoloških lokaliteta predstavljaju nepresušan izvor potencijalno novih bakteriocina sa različitim antimikrobnim spektrom (Topisirovic *et al.*, 2006).

Jedan od ciljeva ove studije bio je da se ispita antimikrobni potencijal prirodnih izolata *Lb. casei/paracasei* grupe poreklom iz sireva i kajmaka sa različitih geografskih lokaliteta, proizvedenih bez upotrebe starter kultura. Studija je obuhvatila ukupno 52 soja *Lb. casei/paracasei* grupe, uključujući i dva *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* soja za koje se već znalo da sintetišu bakteriocine, soj BGBUK2-16 koji sintetiše bakteriocin Bac217 (Lozo *et al.*, 2004) i soj BGSJ2-8 koji sintetiše dva bakteriocina BacSJ i acidocin 8912 (Lozo *et al.*, 2007; Kojic *et al.*, 2010), kao i šest referentnih sojeva vrste *Lb. paracasei* subsp. *paraasei*.

Primenom bakteriocinskih testova, identifikovano je ukupno 17 sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe koji pokazuju bakteriocinsku aktivnost na korišćene senzitivne indikatorske sojeve. Na osnovu sličnosti antimikrobnog spektra delovanja dobijenog u testu unakrsne inhibicije sojeva proizvođača bakteriocina (Tabela 5) moguće je razlikovati pet grupa sojeva (A-E). Na osnovu inhibitornog spektra delovanja možemo pretpostaviti da analizirani prirodni izolati *Lb. casei/paracasei* grupe proizvode potencijalno pet različitih bakteriocina. Međutim, iako je poređenjem inhibitornog

spektra sojeve proizvođače moguće svrstati u pet grupa, uočava se da postoje izvesne razlike u spektru delovanja sojeva u okviru A i C grupe. Moguće objašnjenje je da sojevi u okviru A i C grupe proizvode isti(e) ili sličan(e) bakteriocin(e), a da su detektovane razlike u inhibitornom spektru ustvari posledica primenjenih uslova za rast sojeva proizvođača. Iz literature je poznato da na produkciju bakteriocina mogu uticati različiti faktori soljašne sredine (Hechard i Sahl, 2002), kao i prisustvo kompleksnih regulatornih mehanizma uključenih u regulaciju sinteze bakteriocina (Diep *et al.*, 2000; Nes i Johnsborg, 2004; Nes *et al.*, 2007). Primećene varijacije u produkciji bakteriocina sojeva A i C grupe, mogu jednostavno reflekovati razlike u fazama rasta između sojeva proizvođača u kojima dolazi do najintenzivnije sinteze bakteriocina. Pokazano je da se propionicin T1 proizvodi pod različitim uslovima rasta od strane dva soja *Propionibacterium thoenii* (Faye *et al.*, 2000). Soj *P. thoenii* 419 proizvodi bakteriocin u kasnoj logaritamskoj fazi rasta na temperaturi inkubacije od 30°C, dok se produkcija propionicina T1 kod soja *Prop. thoenii* LMGT 2792 može uočiti samo u stacionarnoj fazi rasta nakon inkubacije na 22°C (Faye *et al.*, 2000).

S obzirom da je soj BGSJ2-8 koji sintetiše dva bakteriocina BacSJ i acidocin 8912 svrstan u grupu A, na osnovu prethodno navedenih podataka moguće je pretpostaviti da i ostali članovi ove grupe proizvode iste ili slične bakteriocine. Na osnovu istog principa predstavnici grupe C, verovatno proizvode bakteriocin isti ili sličan bakteriocinu Bac217 koji sintetiše soj BGBUK2-16 (Lozo *et al.*, 2004).

S obzirom da su Kojić i saradnici (2010) okarakterisali genetičke determinante neophodne za sintezu i transport bakteriocina BacSJ i acidocina 8912, bilo je moguće korišćenjem PCR analize sa specifičnim prajmerima dizajniranim na osnovu sekvence gena, poreklom sa plazmida pSJ2-8, koji kodiraju bakteriocin BacSJ i njegov imuni protein (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon), acidocin 8912 (*acdT*), ABC-transporter (*abcT*) i pomoćni protein (*acc*), utvrditi da li sojevi koji pokazuju isti ili sličan antimikrobni spektar kao soj BGSJ2-8 poseduju gore navedene bakteriocinske gene. Usled toga što je iz literature poznato da upotreba klasičnih metoda za detekciju sojeva proizvođača bakteriocina može takođe da dovede i do značajnog potcenjivanja potencijala za proizvodnju bakteriocina testiranih sojeva, sprovedena PCR studija je obuhvatila svih 52 soja *Lb. casei/paracasei* grupe, koji su testirani na sposobnost produkcije

bakteriocina korišćenjem fenotipskih testova, a ne samo sojeve iz grupe A koji su pokazali sličan antimikrobni spektar kao soj BGSJ2-8. Pokazano je da je izbor senzitivnih sojeva limitirajući faktor za fenotipsko detektovanje inhibitorne aktivnosti (Gajic *et al.*, 1999). Poznato je da je korišćenjem različitih molekularnih tehnika kao što su sekvenciranje bakterijskih genoma i njihova komparativna analiza, PCR analiza i DNK-DNK hibridizacija, moguće utvrditi prisustvo potencijalnih bakteriocinskih gena kao i potencijalno novih bakteriocina nezavisno od uslova neophodnih da odgovarajući soj proizvodi baktericin(e) (Maldonado *et al.*, 2002; Ben Omar *et al.*, 2004; Faye *et al.*, 2004; Nes i Johnsborg, 2004; Altermann *et al.*, 2005).

Analiza rezultata dobijenih PCR metodom omogućila je uvid u odnos između proizvodnje bakteriocina BacSJ i acidocina 8912, ili njima sličnih bakteriocina, i distribucije relevantnih gena kod sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe. Ova studija je pokazala da su analizirani bakteriocinski geni (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon i/ili *acdT* gen) veoma rasprostranjeni u okviru *Lb. casei/paracasei* grupe sa učestalošću od čak 96.15%. De Vuyst i saradnici (2003) su u svojoj studiji pokazali da 64 od 122 testirana soja vrste *Enterococcus* izolovanih iz različitih ekoloških niša, poseduje bar jedan enterocinski gen.

Na osnovu podataka da li pokazuju inhibitornu aktivnost sojevi *Lb. casei/paracasei* grupe su podeljeni na dve glavne grupe, P (sojevi proizvođači bakteriocina) i N (sojevi kod kojih nije detektovana bakteriocinska aktivnost), dok je dalja podela bila uslovljena prisustvom odnosno odsustvom analiziranih bakteriocinskih gena (P1-P7 i N1-N8, Tabela 6).

Interesantno je da je kod svih 17 sojeva proizvođača bakteriocina (Tabela 6, P1-P7) identifikovano prisustvo oba ili bar jednog strukturnog bakteriocinskog gena (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon i/ili *acdT* gen), što ukazuje da je mogući uzrok različitog inhibitornog spektra ovih sojeva prisustvo, odnosno odsustvo *abcT* ili *acc* gena. Uočava se da svi sojevi koji su svrstani u grupu P1 kao i tri soja iz P3 grupe (BGCGK4, BGDA17b i soj BGZLS10-6) ujedno pripadaju i grupi A, dok ostali sojevi iz P3 grupe sa drugačijim inhibitornim spektrom čine grupu C. Zajednička karakteristika sojeva P3 grupe, a koja ih razlikuje od sojeva P1 grupe, je odsustvo *abcT* gena. Na osnovu dobijenih rezultata može da se pretpostavi da je kod sojeva iz P3 grupe, koji pokazuju

sličan antimikrobni spektar kao sojevi iz P1 grupe, najverovatnije ulogu bakteriocinskog ABC-transportera preuzeo njemu sličan ABC-transporter kome primarna uloga nije transport bakteriocina. Uži spektar delovanja ostala tri soja P3 grupe (BGGR2-64, BGGR2-66 i BGBUK2-16), može se objasniti ne mogućnošću da se kompenzuje odsustvo *abcT* gena, kao i produkcijom potencijalno novog bakteriocina različitog od bakteriocina BacSJ i acidocina 8912. Kako je za soj BGBUK2-16 poznato da sintetiše bakteriocin Bac217, moguće je da male razlike u spektru delovanja ovog soja u odnosu na sojeve BGGR2-64 i BGGR2-66 takođe ukazuju na mogućnost da ova dva soja proizvode potencijalno novi bakteriocin.

Zajednička karakteristika sojeva iz grupa P2 i P4-P7 je odsustvo *acc* gena. Značajno uži spektar delovanja sojeva iz ovih grupa, iako svi poseduju bar jedan strukturni bakteriocinski gen (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon i/ili *acdT* gen), može se objasniti produkcijom bakteriocina različitih od bakteriocina BacSJ i acidocina 8912, za čiju aktivnost nije neophodno prisustvo pomoćnog proteina. Postoji mogućnost da ovi sojevi proizvode bakteriocine slične bakteriocinu BacSJ i/ili acidocinu 8912, a da gubitak *acc* gena uslovljava njihovu slabu bakteriocinsku aktivnost. Nedavne studije su pokazale da se u genomu soja *Pediococcus pentosaceus* ATCC25745 nalazi genski klaster koji poseduje gene koji pokazuju homologiju sa genima uključenim u proizvodnju bakteriocina (Diep *et al.*, 2006). Identifikovani genski klaster ima strukturu operona u kome se nalaze potencijalni gen koji kodira pediocin (*penA*), potencijalni gen za imunost (*peiA*), kao i genetičke determinante uključene u regulaciju i transport bakteriocina. Ipak, gen za pomoćni protein uključen u transport kao i gen za indukcioni peptid koji učestvuje u regulaciji, nedostaju, što karakteriše ovaj soj kao slabog bakteriocinskog proizvođača (Diep *et al.*, 2006).

U sprovedenoj PCR studiji o rasprostranjenosti bakteriocinskih gena u genomima 33 soja *Lb. casei/paracasei* grupe koji nisu pokazali antimikrobnu aktivnost, pri korišćenim uslovima, identifikovano je prisustvo jednog ili oba potencijalna strukturna gena za bakteriocin BacSJ i acidocin 8912. Izostanak antimikrobne aktivnosti kod analiziranih sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe može biti posledica prisustva mutacija, gubitka gena ili genetskih rearanžmana u okviru genetičkog sistema uključenog u proizvodnju bakteriocina. Poznato je, takođe, da su identifikovani

bakterijski genomi koji kodiraju samo delove bakteriocinskog sistema ili je prisustvo mutacija uzročnik nefunkcionalnih bakteriocinskih gena (Moretro *et al.*, 2005; Diep *et al.*, 2006). Komparativna analiza bakterijskih genoma ukazala je na veoma često prisustvo više od dva potencijalna bakteriocinska gena (Huhne *et al.*, 1996; Moschetti *et al.*, 1996; Tettelin *et al.*, 2001). Maldonado i saradnici (2002) su korišćenjem PCR amplifikacije i hibridizacijom sa specifičnim probama utvrdili da je operon koji kodira plantaricin S široko rasprostranjen među sojevima vrste *Lb. plantarum* izolovanim iz fermentisanih maslina. Sekvenciranjem genoma soja *Lb. sakei* 23 K, koji ne pokazuje bakteriocinsku aktivnost, pokazalno je da poseduje region veličine 6,5 kb koji sadrži deo *spp* genskog klastera odgovornog za proizvodnju sakacina P (Moretro *et al.*, 2005). Usled široke rasprostranjenosti bakteriocinskih gena (uglavnom homologa *sppK* i *sppR* gena) i kod sojeva vrste *Lb. sakei* koji ne proizvode bakteriocin, predloženo je da se ovi geni koriste kao “fingerprinting” regioni i/ili kao genski markeri za sojeve vrste *Lb. sakei* (Moretro *et al.*, 2005). Međutim, iako je naša studija pokazala da čak 96,15 % od svih analiziranih sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe poseduje bar jedan analizirani strukturni bakteriocinski gen, ni identifikovani *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon kao ni *acdT* gen ne mogu se iskoristiti kao genski markeri za sojeve *Lb. casei/paracasei* grupe, jer prisustvo ovih gena nije specifično za vrstu, pošto je pokazano njihovo prisustvo na plazmidu pLA103 poreklom iz soja *Lactobacillus acidophilus* TK8912 (Kanatani *et al.*, 1995). Identifikovana su, takođe i dva soja *Lb. casei/paracasei* grupe, BGLI15 i BGGR1-15, koja nisu posedovala ni jedan od testiranih bakteriocinskih gena (Tabela 6; N8).

Odsustvo sposobnosti proizvodnje bakteriocina istog ili sličnog bakteriocinu BacSJ i/ili acidocinu 8912, kod sojeva N1, N3 i N6 grupe, moguće je objasniti ili prisustvom mutacija u genima ili regulatornim sekvencama gena koji kodiraju komponente uključene u sintezu ili sekreciju bakteriocina. Postoji i mogućnost da kod sojeva N3 i N6 grupe, dolazi do ekspresije strukturnih bakteriocinskih gena, ali da odsustvo *abcT* gena uslovljava izostanak sekrecije sintetisanog bakteriocina.

Moguće objašnjenje zašto sojevi iz N2, N4, N5 i N7 grupe ne proizvode bakteriocine slične bakteriocinu BacSJ ili acidocinu 8912, a poseduju odgovarajuće strukturne gene, je u nedostatku *acc* gena. Iako specifična uloga pomoćnih proteina u

transportu bakteriocina još uvek nije rasvetljena (Ennahar *et al.*, 2000), pokazano je na primeru nekoliko bakteriocina da su pomoćni proteini od suštinskog značaja za proces sekrecije bakteriocina zavisnog od prisustva ABC-transportera (Axelsson i Holck, 1995; Van Belkum i Stiles, 1995; Venema *et al.*, 1995; Franke *et al.*, 1996; Nes *et al.*, 1996; Van Belkum *et al.*, 1997). Međutim, Vaughan i saradnici (2003) su u svojoj studiji pokazali da prisustvo pomoćnog proteina nije neophodno za obradu i transport sakacina T i sakacina X, iako nisu mogli u potpunosti da isključe mogućnost da su ove funkcije nadomeštene od strane soja domaćina koji je korišćen u studiji. Prepostavili su da postoji neki oblik komplementacije produkta nepoznatog hromozomalno lokalizovanog gena koji ispunjava ulogu pomoćnog proteina. Podaci ove studije su takođe pokazali da je odsustvo *acc* gena kod sojeva iz P2 i P4-P7 grupe je uticalo na nivo ekspresije, ali su oni ipak pokazivali antimikrobnu aktivnost.

Iz literature je poznato da prisustvo potencijalnih bakteriocinskih sekvenci u genomima velikog broja sojeva koji ne proizvode bakteriocine, kao i u genomima sojeva proizvođača bakteriocina sa različitim antimikrobnim spektrom ukazuju na mogućnost da neki sojevi poseduju samo deo sistema uključenog u proizvodnju bakteriocina, a da je razlika u inhibitornom spektru sojeva proizvođača posledica produkcije više od dva bakteriocina (Abriouel *et al.*, 2006).

Iz literature je poznato da genetičke determinante uključene u proizvodnju bakteriocina klase II (strukturni bakteriocinski gen, njegov imuni protein, kao i dva gena koji kodiraju ABC-transporter i pomoćni protein), mogu biti organizovane u jednom ili dva operona, gde u skoro svim slučajevima gen za imunitet pripada operonu u kome se nalazi i strukturni bakteriocinski gen (Nes *et al.*, 1996). Kojić i saradnici (2010) su pokazali da su kod soja BGSJ2-8 geni uključeni u proizvodnju bakteriocina BacSJ i acidocina 8912 lokalizovani na plazmidu pSJ2-8. Pokazano je i da su strukturni geni i geni koji obezbeđuju imunitet na bakteriocin BacSJ lokalizovani u okviru istog operona, što je slučaj i sa genima koji kodiraju sintezu i imunitet na acidocin 8912, dok su *abcT* i *acc* geni lokalizovani u neposrednoj blizini *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operona. Utvrđeno je da svi bakteriocinski geni poreklom sa plazmida pSJ2-8, pokazuju homologiju sa odgovarajućim genima poreklom sa plazmida pLA103 (Kanatani *et al.*, 1995). Iako je pokazano da je pomoćni protein kodiran *acc* genom sa plazmida pSJ2-8 kraći nego isti

protein kodiran genom sa plazmida pLA103, funkcija i eksport bakteriocina BacSJ i acidocina 8912 ostaju nepromenjeni (Kojic *et al.*, 2010). Iz literature je poznato da se gen za pomoćni protein obično nalazi odmah nizvodno od odgovarajućeg gena za ABC-transporter i kotranskribuje se sa njim, što predstavlja relativno konzerviranu genetičku organizaciju (Diep *et al.*, 1996; Nes *et al.*, 1996). Na osnovu navedenih podataka može se pretpostaviti da su i analizirani bakteriocinski geni kod sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe verovatno plazmidno lokalizovani, kao što je slučaj kod divljeg soja BGSJ2-8. Kod svih sojeva koji proizvode bakteriocine identifikovano je prisustvo plazmida, izuzev kod soja BGJB9-123 koji ne poseduje plazmide. Postoji mogućnost da su kod soja BGJB9-123 odgovarajući bakteriocinski geni hromozomalno lokalizovani, ali je takođe moguće da su lokalizovani na velikom plazmidu koji nije izolovan korišćenjem klasičnih metoda za izolaciju plazmida.

Geni za proizvodnju bakteriocina se često nalaze na mobilnim genetičkim elementima poput transpozona ili plazmida (Kojic *et al.*, 2006). Slični plazmidni profili koji su detektovani kod sojeva koji nose bakteriocinske gene, ukazuju na postojanje odnosa korelacije prisustva plazmida i potencijalnih bakteriocinskih gena. Prethodne studije su pokazale da je konjugacija čest mehanizam transfera u mlečnim starter kulturama, kako u laboratorijskim uslovima (Neve *et al.*, 1987), takao i tokom proizvodnje sira (Gabin-Gauthier *et al.*, 1991). Kompleksna struktura okruženja u kome se nalaze ovi sojevi mogla bi da predstavlja pogodne uslove za transfer plazmida ili transpozona putem konjugacije (Moschett *et al.*, 1996). Na ovaj način mogla bi da se objasni široka rasprostranjenost analiziranih bakteriocinskih gena u genomima prirodnih izolata *Lb. casei/paracasei* grupe, što je u skladu sa saznanjima da se geni koji su uključeni u proizvodnju bakteriocina često prenose horizontalno između bakterija (Makarova *et al.*, 2006).

Sprovedena studija o rasprostranjenosti bakteriocinskih gena omogućila je i identifikaciju tri soja BGJB9-124, BGNK1-62 i BGNK1-80 (N7 grupa) kod kojih je utvrđeno prisustvo samo *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operona. Sekvenciranjem je potvrđeno da analizirani sojevi poseduju bakteriocinske gene 100% identične odgovarajućim genima poreklom sa plazmida pSJ2-8. Utvrđeno je da su sojevi N7 grupe imuni na dejstvo bakteriocina koje proizvodi soj BGSJ2-8, što je dodatno ukazalo na intaktnost i

funkcionalnost gena za imunost u okviru *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operona. Cilj ove studije je bio da se utvrdi da li je kod sojeva N7 grupe izostanak bakteriocinskog fenotipa posledica gubitka *abcT* i *acc* gena ili izostanka ekspimiranja *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operona. Kloniranjem *abcT* i *acc* gena poreklom iz soja BGSJ2-8 i njihovom *in trans* ekspresijom u soju BGNK1-62 koji poseduje *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon, a nedostaju mu geni uključeni u transport bakteriocina, ostvarena je proizvodnja bakteriocina koji pokazuje sličan spektar delovanja kao i soj BGSJ2-8, što je ukazalo da je, PCR-om identifikovan *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon, funkcionalan. Diep i saradnici (2006) su kloniranjem potencijalnih bakteriocinskih gena *penA* i *peiA* soja *Pediococcus pentosaceus* ATCC25745 i njihovom heterologom ekspresijom u *Lb. sakei* soju koji poseduje kompletan genetički sistem neophodan za aktivaciju, maturaciju i transport bakteriocina, potvrdili produkciju novog potentnog bakteriocina, označenog kao penocin A.

Sprovedena studija je potvrdila da identifikacija potencijalnih bakteriocinskih gena ne znači ujedno da relevantni soj poseduje antimikrobnu aktivnost, kao što ni nedostatak antimikrobne aktivnosti ne mora da znači da su geni uključeni u proizvodnju bakteriocina odsutni ili defektni. Ukazano je takođe na neophodnost analize genoma prirodnih izolata BMK na prisustvo različitih bakteriocinskih gena kako bi se identifikovali potencijalni proizvođači bakteriocina koji bi inače ostali neotkriveni. Analiza kompletnih genoma može da otkrije prisustvo potencijalnih bakteriocinskih gena i novih bakteriocina nezavisno od uslova neophodnih da odgovarajući soj proizvodi baktericin (Nes i Johnsborg, 2004).

Uporednom analizom podataka o rasprostranjenosti relevantnih bakteriocinskih gena kod sojeva *Lb. casei/paracasei* grupe sa rezultatima dobijenim u bakteriocinskim testovima identifikovana su dva soja BGUB9 i BGGR2-66 koji su bili interesantni za dalje izučavanje kao potencijalni proizvođači novih bakteriocina. Soj BGUB9 je na osnovu antimikrobnog spektra delovanja, kao i na osnovu prisustva bakteriocinskih gena uključenih u produkciju bakteriocina BacSJ i acidocina 8912 svrstan u istu grupu sa sojem BGSJ2-8. Međutim, kako je soj BGUB9 ipak pokazao razlike u antimikrobnom spektru u odnosu na soj BGSJ2-8 postojala je mogućnost da sintetiše nov baktericin. Soj BGGR2-66 je takođe odabran za dalji rad kao potencijalni

proizvođač novog bakteriocina usled razlika u inhibitornom spektru u odnosu na spektar soja BGBUK2-16, proizvođača bakteriocina Bac 217 (Lozo *et al.*, 2004). Na osnovu dobijenih rezultata moguće je bilo identifikovati i sojeve (grupe B, D i E) proizvođače još tri potencijalno nova bakteriocina, nezavisna od prisustva *acc* gena, ali oni nisu bili predmet daljih istraživanja usled izuzetno uskog inhibitornog spektra delovanja. Moguće je da u slučaju sojeva B, D i E grupe nisu primenjeni optimalni uslovi za produkciju bakteriocina, ili nije odabran dovoljno osetljiv indikatorski soj, što može da predstavlja problem pošto je za mnoge bakteriocine karakterističan uzak spektar inhibitornog delovanja, a takođe je u velikom broju slučajeva proizvodnja bakteriocina regulisana (Nes *et al.*, 2007).

Utvrđeno je da soj BGUB9 pored blisko srodnih vrsta inhibitorno deluje i na veći broj Gram-negativnih i Gram-pozitivnih patogenih vrsta bakterija kao i na nepatogenu vrstu *Listeria innocua*, koja je veoma slična zagađivaču hrane patogenoj vrsti *List. monocytogenes*. Iz literature je poznato da su mehanizmi kojima probiotički sojevi laktobacila ostvaruju svoje antibakterijsko delovanje najčešće multifaktorijski (Servin, 2004). Inhibicija rasta patogenih bakterija dejstvom sojeva laktobacila uglavnom je rezultat delovanja metaboličkih produkata kao što su sirćetna i mlečna kiselina koje dovode do snižavanja pH vrednosti sredine u kojoj se nalaze (Vandenbergh, 1993), ili proizvodnjom vodonik peroksida. Utvrđeno je da inhibitorno delovanje soja BGUB9 potiče od sinergističkog delovanja bakteriocina, mlečne kiseline, a verovatno se delimično može pripisati i dejstvu vodonik peroksida. Pokazano je da supernatant soja dobijen iz prekonocne kulture soja *Lb. paracasei* HL32 inhibira rast različitih mikroorganizama, ali je nakon neutralizacije supernatanta identifikovan značajno uži spektar delovanja (Pangsomboon *et al.*, 2006). Isti efekat je imala i neutralizacija supernatanta soja BGUB9 na njegov antimikrobni spektar delovanja. Važno je istaći da je uočeno da supernatant soja BGUB9 precipitiran acetonom inhibitorno deluje na rast soja *List. innocua* ATCC33090^T, pa se to dejstvo može pripisati bakteriocinskoj aktivnosti.

Poznato je da ukoliko neutralizovan besćelijski supernatant inhibira rast odabranog indikatorskog soja, to ukazuje na mogućnost da je antimikrobna aktivnost koja se detektuje posledica produkcije bakteriocina (Tatsadjieu *et al.*, 2009). Potpuni

gubitak antimikrobne aktivnosti koji je zabeležen posle tretmana besćelijskog supernatanta soja BGUB9 proteolitičkim enzimima potvrdio je proteinsku prirodu aktivne komponente označene kao BacUB9. Bakteriocin BacUB9 je termostabilan peptid, koji ostaje aktivan u širokom opsegu pH vrednosti. Sličan efekat proteolitičkih enzima na bakteriocinsku aktivnost, kao i širok opseg pH vrednosti u kojima su aktivni detektovan je kod nekoliko bakteriocina kao što su S50 (Kojic *et al.*, 1991b), Bac501, LsbA i LsbB (Gajic *et al.*, 1999; Gajic *et al.*, 2003), Bac217 (Lozo *et al.*, 2004) i drugi. Način delovanja bakteriocina BacUB9 je identifikovan kao bakteriostatički. Iako većina identifikovanih bakteriocina poreklom iz BMK pokazuje baktericidno dejstvo, okarakterisani su i bakteriocini sa bakteriostatičkim načinom delovanja kao što su plantaricin TF711 koji proizvodi soj *Lb. plantarum* TF711 (Hernandez *et al.*, 2005), ramnozina A koji proizvodi soj *Lb. rhamnosus* 68 (Dimitrijević *et al.*, 2009) kao i glikocin F, bakteriocin izolovan iz soja *Lb. plantarum* (Venugopal *et al.*, 2011). Faktori koji utiču na način delovanja bakteriocina zavise od primenjene koncentracije i stepena prečišćenosti bakteriocina, faze rasta indikatorskog soja, kao i od opštih uslova pod kojima se sprovodi eksperiment (Deraz *et al.*, 2007). Uočeno je da je u soju BGUB9 proizvodnja bakteriocina zavisna od faze rasta, počinje u ranoj eksponencijalnoj fazi, a maksimum produkcije dostiže pri ulasku u ranu stacionarnu fazu rasta. Do sada je okarakterisano više bakteriocina koje karakteriše slična dinamika proizvodnje (Kojic *et al.*, 1991b; Gajic *et al.*, 1999; Messi *et al.*, 2001; Lozo *et al.*, 2004), koja je verovatno uslovljena selektivnim pritiskom usled ograničenih hranjivih resursa u stacionarnoj fazi rasta.

U literaturi su opisani različiti protokoli za izolaciju bakteriocina poreklom iz BMK. U slučaju prečišćavanja bakteriocina BacUB9 korišćena je amonijum sulfatna precipitacija iz supernatanta prekonoćne kulture soja BGUB9. Amonijum sulfatna precipitacija se često koristi kao prvi korak prilikom izolacije različitih bakteriocina, dok dalje prečišćavanje bakteriocina zavisi od njegovih karakteristika kao što su naelektrisanje, veličina, hidrofobnost i dr. (Mortvedt, *et al.* 1991; Parente i Riccardi, 1999). Prečišćenom bakteriocinu BacUB9 je određena je približna molekulska masa od 3500 Da na osnovu Tricin SDS-PAGE analize. Aktivan uzorak bakteriocina BacUB9, dobijen precipitacijom supernatanta prekonoćne kulture soja BGUB9 acetonom, analiziran je masenom spektrometrijom koja je pokazala da je u uzorku prisutan protein

molekulske mase 3758 Da (Tabela 8). Pretragom baze podataka nije identifikovan bakteriocin ili bakteriocinu sličan peptid odgovarajuće molekulske mase, što je ukazalo da se radi o potencijalno novom bakteriocinu. Na osnovu biohemijskih karakteristika, male molekulske mase i antilisterijalnog dejstva, bakteriocin BacUB9 se može razmatrati kao predstavnik klase IIa bakteriocina.

Na osnovu rezultata dobijenih u eksperimentima čišćenja plazmida pokazano je da su genetičke determinante za sintezu i imunost na bakteriocin BacUB9 lokalizovane u okviru istog plazmida. Ovo je dodatno potvrđeno u bakteriocinskom testu prisustvom zone inhibicije rasta čišćenog Bac⁻ derivata BGUB9-96, koji je korišćen kao indikator, usled bakteriocinske aktivnosti divljeg soja BGUB9. Poznato je da je najveći broj okarakterisanih bakteriocinskih operona lokalizovan na plazmidima kao što je slučaj kod pediocina PA-1 poreklom iz soja *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 (Marugg *et al.*, 1992), pediocina AcH oporeklom iz soja *Ped. acidilactici* LB42-923 (Bukhtiyarova *et al.*, 1994), sakacina A iz soja *Lb. sakei* Lb706 (Axelsson i Holck, 1995), acidocina 8912 poreklom iz soja *Lb. acidophilus* TK8912 (Kanatani *et al.*, 1995) ili bakteriocina BacSJ iz soja *Lb. paracasei* subsp *paracasei* BGSJ2-8 (Kojic *et al.*, 2010). Sugerisano je da plazmidna lokalzacija bakteriocinskih gena pomaže intra- i inter-filogenetsko rasprostranjenje bakteriocinskih gena između različitih vrsta BMK (Dimov *et al.*, 2005). Komparativne analize sekvenciranih genoma vrsta iz roda *Lactobacillus* su potvrdile da geni za bakteriocine spadaju u grupu gena koji su podložni horizontalnom genskom transferu (Makarova *et al.*, 2006; Makarova i Koonin, 2007).

Na osnovu sprovedene studije o distribuciji bakteriocinskih gena uključenih u sintezu i sekreciju bakteriocina BacSJ i acidocina 8912 utvrđeno je da soj BGUB9 poseduje sve analizirane bakteriocinske gene za koje je nakon sekvenciranja potvrđeno da pokazuju 100% identičnosti sa genima poreklom sa plazmida pSJ2-8. Korišćenjem DND-DNK hibridizacije pokazano da Bac⁻ derivat BGUB9-96 ne poseduje *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon, što je ukazalo na mogućnost da antimikrobna aktivnost soja BGUB9 možda potiče i od sinteze bakteriocina istog kao BacSJ. Moguće je da su genetičke determinante uključene u produkciju bakteriocina BacUB9 i BacSJ lokalizovane na istom plazmidu, tako da je prilikom čišćenja plazmida dobijen derivat bez bakteriocinske aktivnosti. Dodatno je hibridizacijom pokazano da Bac⁻ derivat

BGUB9-96 poseduje *acdT* gen, kao i *abcT* i *acc* gene uključene u transport bakteriocina, što je zatim i potvrđeno PCR-om. Dobijeni rezultati sugeriraju da kod soja BGUB9 potencijalni bakteriocinski geni uključeni u transport (*abcT* i *acc* geni) i gen za sintezu acidocina 8912 (*acdT* gen), nisu lokalizovani na istom plazmidu sa *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operonom. Uočena lokalizacija bakteriocinskih gena se razlikuje od do sada opisanih slučajeva u literaturi, gde je za analizirane bakteriocinske gene pokazano da su locirani na istom plazmidu: pLA103 izolovanom iz soja *Lb. acidophilus* TK8912 (Kanatani *et al.*, 1995), kao i pSJ2-8 izolovanom iz soja BGSJ2-8 (Kojic *et al.*, 2010). Uočen genetički rearanžman sekvenci koje su homologe bakteriocinskim operonima verovatno je posledica razmene genetičkog materijala koja se najverovatnije dogodila između bakterija koje su nosile ove ekstrahromozomalne genetičke elemente.

Gubitak bakteriocinske aktivnosti derivata BGUB9-96, koji poseduje *acdT* gen, ujedno ukazuje na mogućnost da se *acdT* gen ne eksprimira u soju BGUB9, što može biti posledica uočenog genetičkog rearanžmana koji je verovatno imao za posledicu promene u ekspresiji analiziranog bakteriocinskog gena. Međutim, ne može se isključiti mogućnost da do ekspresije *acdT* gena nije došlo zbog primenjenih uslova za rast soja BGUB9 i njegovog derivata BGUB9-96.

Imajući u vidu sve prethodno navedene rezultate kao i podatke iz literature o molekulskim masama acidocina 8912 od 5400 Da (Tahara *et al.*, 1992), i bakteriocina BacSJ od 5372 Da (Kojic *et al.*, 2010), može da se zaključi da prirodni izolat *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9 poseduje genetički potencijal za produkciju tri bakteriocina, ali da je njegova bakteriocinska aktivnost najverovatnije posledica delovanja novog do sada neokarakterisanog bakteriocina klase IIa, označenog kao BacUB9.

U ovom radu analiziran je i antimikrobni potencijal soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGGR2-66. Soj BGGR2-66 pored produkcije bakteriocina karakteriše i produkcija kapsularnih polisaharida (CPS), što su dve značajne osobine koje ga ističu kao potencijalni probiotski soj (Isolauri *et al.*, 1991; Salminen *et al.*, 1996; Rolfe, 2000; Reid i Burton, 2002; Todorov *et al.*, 2007). Produkcija antimikrobnih supstanci je predožena kao potencijalni mehanizam koji soju proizvođaču daje kompetitivnu

prednost u preživljavanju nad drugim članovima mikrobiološke zajednice u gastrointestinalnom traktu (Doron i Gorbach, 2006).

Ustanovljeno je da se antimikrobno delovanje soja BGGR2-66, koje je ograničeno je na sojeve *Lb. casei/paracasei* grupe, a nezavisno je od efekta snižavanja pH vrednosti usled prisustva mlečne kiseline, može u potpunosti pripisati delovanju bakteriocina označenog kao BacGR. Prilikom testiranja antimikrobne aktivnosti soja BGGR2-66 bakteriocinskim testom, primećeno je da do pojave zone inhibicije senzitivnih sojeva dolazi tek nakon 48 sati inkubacije na 30°C. Moguće objašnjenje je postepeno širenje dejstva bakteriocina na indikatorski soj. Sličana aktivnost je opisana kod delovanja bakteriocinima sličnih supstanci („bacteriocin-like substances - BLS“) na vrstu *Staphylococcus* spp., gde je delovanje BLS bilo pod uticajem hemolitičke aktivnosti soja proizvođača (Messi *et al.*, 2003). Kao i kod većine opisanih bakteriocinskih proizvođača proizvodnja bakteriocina soja BGGR2-66 zavisi od faze rasta, gde se maksimum proizvodnje dostiže pri ulasku u stacionarnu fazu, jer se na taj način obezbeđuje maksimalna koncentracija bakteriocina kada je konkurencija za hranljive resurse sredine najveća.

Kada je za testiranje antimikrobne aktivnosti soja BGGR2-66 korišćen supernatant prekonocne kulture gajene u MRS medijumu, nije detektovana inhibitorna aktivnost koju je soj BGGR2-66 prethodno ispoljavao kada je testirana aktivnost pune kulture. Iz literature je poznato da se u određenim uslovima bakteriocini mogu nalaziti adsorbovani na površini ćelija proizvođača, dok se drugi izlučuju u spoljašnju sredinu (Yang *et al.*, 1992). Kako je zaključeno da se bakteriocin BacGR verovatno nalazi adsorbovan na ćelijama soja BGGR2-66 primenjena je metoda za izolaciju bakteriocina, gde su kao početni uzorci korišćene ćelije soja BGGR2-66 nakon gajenja na čvrstom MRS medijumu. U prečišćenom aktivnom uzorku je nakon Tricin-SDS-PAGE analize detektovan bakteriocin približne molekulske mase od 3500 Da. Korišćenjem reverzno-fazne hromatografije visokih performansi (HPLC), dobijena su dva aktivna uzorka (I i II) koja su zatim analizirana masenom spektrometrijom (ESI-MS), kojom je pokazano da se u oba uzorka nalaze peptidi sa mogućom bakteriocinskom funkcijom. U uzorku I identifikovano je prisustvo tri peptida, ali sa značajno manjom molekulskom masom od očekivane vrednosti od 3500 Da dobijene na osnovu Tricin SDS-PAGE analize.

Najverovatnije objašnjenje je da je došlo do razlaganja bakteriocina prilikom primene ESI-MS metode. Pokazano je da različiti tretmani prilikom prečišćavanja bakteriocina mogu da dovedu do razdvajanja dimernih ili tetramernih molekula (Mortvedt *et al.*, 1991; Onda *et al.*, 2003). Poznato je da bakteriocini laktobacila pored toga što formiraju dimere, trimere i dr., formiraju komplekse i sa drugim supstancama u nedisosujućim uslovima (Mortvedt *et al.* 1991). U uzorku II identifikovano je prisustvo peptida molekulske mase od 3218 Da. N-terminalnim sekvenciranjem uzorka bakteriocina BacGR dobijena je sekvenca prvih deset aminokiselina: GNVAELTEVR. Pretraživanjem baza podataka bakteriocina nije pronađen bakteriocin iste molekulske mase kao BacGR, niti je pokazana homologija N-terminalne aminokiselinske sekvence BacGR ni sa jednim do sada okarakterisanim bakteriocinom, na osnovu čega se može zaključiti da je bakteriocin BacGR nov bakteriocin različit od do sada okarakterisanih bakteriocina vrste *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*.

Metodom čišćenja plazmida pokazano je da se genetičke determinante uključene u proizvodnju bakteriocina BacGR nalaze na plazmidu. Kako je prethodno u PCR studiji pokazano da soj BGGR2-66 poseduje potencijalne bakteriocinske gene uključene u proizvodnju bakteriocina BacSJ i acidocina 8912 postojala je mogućnost da antimikrobna aktivnost soja BGGR2-66 potiče i od aktivnosti oba ili jednog od navedenih bakteriocina. Korišćenjem PCR metode pokazano je da čišćeni Bac⁻ drivat soja BGGR2-66, označen kao BGGR2-66-88 ne poseduje gen za acidocin 8912 (*acdT*), ali zato poseduje *bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon. Ovaj rezultat je ukazao da poreklo antimikrobne aktivnosti soja BGGR2-66 ne potiče od delovanja bakteriocina BacSJ. Kao i kod bakteriocina BacUB9, potencijalni geni koji kodiraju BacSJ i acidocin 8912 su locirani na različitim plazmidima.

Za bakteriocin BacGR je pokazano da je termostabilan bakteriocin, aktivan u širokom opsegu pH vrednosti, koga u potpunosti inaktivira dejstvo proteolitičkih enzima. Osetljivost bakteriocina na proteolitičke enzime je poželjna karakteristika za njihovu upotrebu u proizvodima namenjenim ljudskoj ishrani (Cotter *et al.*, 2005). Na osnovu svojih biohemijskih osobina, kao i strukturnih karakteristika utvrđenih u ovom radu (molekulske mase i N-terminalne aminokiselinske sekvence), bakteriocin BacGR možemo svrstati u klasu IId bakteriocina.

Radi utvrđivanja lokalizacije gena uključenih u proizvodnju bakteriocina BacGR i njihove ekspresije u heterolognim domaćinima, u prvom koraku su konstruisani novi *Laktobacillus/E. coli* vektori za kloniranje i kozmidni vektor, pAZILSJ i pAZILcos, na osnovu pAZIL vektora (Kojic *et al.*, 2011). Brojni vektori za kloniranje su do sada konstruisani, ali je i dalje veoma mali broj onih koji poseduju sposobnost replikacije u laktokokama, laktobacilima i *E. coli* (Zhu *et al.*, 2009). Vektor pAZILSJ je omogućio kloniranje velikih DNK fragmenata i veliku stabilnost konstrukata. Plazmidna biblioteka soja BGGR2-66 dobijena korišćenjem pAZILSJ vektora je omogućila ekspresionu analizu dobijenih konstrukata u heterolognom domaćinu soju *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14. Restrikcionom analizom konstrukata pAZILSJbac poreklom iz Bac⁺ transformanata BGHN14-297, pokazano je da se genetičke determinante za produkciju bakteriocina BacGR nalaze na *Bam*HI fragmentu veličine preko 10 kb. Da bi se finalno potvrdila struktura gena za sintezu bakteriocina BacGR neophodno je uraditi subkloniranje i sekvenciranje fragmenata koji bi trebalo da potvrde postojanje aminokiselinske sekvence GNVAELTEVR na N-terminalnom kraju sekretovanog bakteriocina.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu cilja rada i rezultata izloženih u ovom radu mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Analizom antimikrobne aktivnosti 52 soja *Lactobacillus casei/paracasei* grupe identifikovano je 17 sojeva koji proizvode bakteriocine;
2. Utvrđeno je da su genetičke determinante neophodne za proizvodnju bakteriocina BacSJ (*bacSJ2-8/bacSJ2-8i* operon) i/ili acidocina 8912 (*acdT* gen) veoma rasprostranjene u okviru *Lb. casei/paracasei* grupe sa učestalošću od čak 96,15%;
3. Restauracijom bakteriocinskog fenotipa soja BGNK1-62 nadomešćujućom ulogom heterologno eksprimiranog *abcT* i *acc* gena ukazano je na važnost identifikacije potencijalnih bakteriocinskih gena prilikom analize antimikrobnog potencijala bakterijskih sojeva od interesa, tj. da proces nastanka antimikrobne funkcije može teći u jednom ali i u dva koraka;
4. Pokazano je da su geni ključni za produkciju bakteriocina BacSJ i acidocina 8912 plazmidno lokalizovani kod sojeva BGUB9 i BGGR2-66, ukazujući na postojanje odnosa korelacije prisustva plazmida i potencijalnih bakteriocinskih gena;
5. Soj BGUB9 sintetiše bakteriocin BacUB9. Bakteriocin BacUB9 je termostabilan molekul, aktivan u širokom opsegu pH vrednosti, sa bakteriostatičkim načinom delovanja, osetljiv na delovanje proteolitičkih enzima, koji pored blisko srodnih vrsta inhibira i rast sojeva *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T i *Listeria innocua* ATCC 33090^T;
6. Molekulska masa izolovanog bakteriocina BacUB9 određena je masenom spektrometrijom i iznosi 3758 Da;
7. Na osnovu molekulske mase, načina delovanja, biohemijske i genetičke analize može se zaključiti da prirodni izolat *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9 poseduje genetički potencijal za produkciju tri bakteriocina, ali da je njegova bakteriocinska aktivnost najverovatnije posledica delovanja novog do sada neokarakterisanog bakteriocina klase IIa, označenog kao BacUB9;
8. Soj BGGR2-66 sintetiše bakteriocin BacGR. Bakteriocin BacGR je termostabilan molekul, aktivan u širokom opsegu pH vrednosti, osetljiv na

Zaključci

- delovanje proteolitičkih enzima, uskog spektra delovanja ograničenog na blisko srodne vrste;
9. Molekulska masa izolovanog bakteriocina BacGR procenjena na osnovu Tricin-SDS-PAGE analize iznosi oko 3500 Da, dok je masenom spektrometrijom identifikovan aktivan peptid veličine 3218 Da;
 10. N-terminalnim sekvenciranjem određena je sekvenca prvih deset aminokiselina bakteriocina BacGR: GNVAELTEVR;
 11. Čišćenjem plazmida iz soja BGGR2-66 dobijen je Bac⁺ derivat BGGR2-66-88, na osnovu čega je zaključeno da se genetičke determinante za bakteriocin BacGR plazmidno lokalizovane, dok je analizom plazmidne biblioteke pokazano da se odgovarajući geni nalaze na *Bam*HI fragmentu veličine preko 10 kb;
 12. Na osnovu molekulske mase, biohemijske analize i N-terminalne sekvence može se zaključiti da soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGGR2-66 sintetiše nov bakteriocin, nazvan BacGR koji po svojim karakteristikama pripada bakteriocinima klase II_d.

7. LITERATURA

- Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Galvez, A. 2006. Bacteriocin production, plasmid content and plasmid location of enterocin P structural gene in enterococci isolated from food sources. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 331-337.
- Acedo-Félix, E., Pérez-Martínez, G. 2003. Significant differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393T and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 67-75.
- Adams, M.R., Hall, C.J. 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 287-292.
- Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R., Klaenhammer, T.R. 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 102: 3906-3912.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Anas, M., Eddine, H.J., Mebrouk, K. 2008. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy Food Sci.* 3: 39-49.
- Anderson, D.G., McKay, L.L. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 549-552.
- Antonio, M.A., Hawes, S.E., Hillier, S.L. 1999. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J. Infect. Dis.* 180: 1950-1956.
- Aucher, W., Lacombe, C., Hequet, A., Frere, J., Berjeaud, J.M. 2005. Influence of amino acid substitutions in the leader peptide on maturation and secretion of mesentericin Y105 by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 187: 2218-2223.
- Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J., Lindgren, S.E. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2: 131-136.
- Axelsson, L., Holck, A. 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* Lb706. *J. Bacteriol.* 177: 2125-2137.
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L.S., Hugas, M., Gariga, M., Nes, I.F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1676-1682.
- Belguesmia, Y., Madi, A., Sperandio, D., Merieau, A., Feuilloley, M., Prévost, H., Drider, D., Connil, N. 2010. Growing insights into safety of bacteriocins: case of enterocin S37. *Res. Microbiol.* 162: 159-163.

- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M., Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Perez-Pulido, R., Martinez-Canamero, M., Galvez, A., 2004. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 118-130.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11: 259-274.
- Bergey, D. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 3. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.
- Beukes, M., Bierbaum, G., Sahl, H.G., Hastings, J.W. 2000. Purification and partial characterization of a murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 23-28.
- Biet, F., Berjeaud, J.M., Worobo, R.W., Cenatiempo, Y., Fremaux, C. 1998. Heterologous expression of the expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiol.* 144: 2845-2854.
- Borrero J., Jiménez J.J., Gútiérrez L., Herranz C., Cintas L.M., Hernández P.E. 2011. Use of the usp45 lactococcal secretion signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 131-143.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H., de Kruijff, B. 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286: 2361-2364
- Bukhtiyarova, M., Yang, R., Ray, B. 1994. Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3405-3408.
- Buriti, F.C., Cardarelli, H.R., Saad, S.M. 2007. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. *J. Food Prot.* 70: 228-235.
- Byczkowski, J., Gessner, T. 1988. Biological role of superoxide ion-radical. *Int. J. Biochem.* 20: 569-580.
- Cai, H., Thompson, R., Budinich, M.F., Broadbent, J.R., Steele, J.L. 2009. Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. *Genome Biol. Evol.* 14: 239-257.
- Callanan, M., Kaleta, P., O'Callaghan, J., O'Sullivan, O., Jordan, K., McAuliffe, O., Sangrador-Vegas, A., Slattery, L., Fitzgerald, G.F., Beresford, T., Ross, R.P. 2008. Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *J. Bacteriol.* 190: 727-735.
- Callon, C., Millet, L., Montel, M.C. 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res.* 71: 231-244.
- Calvez, S., Rincé, A., Auffray, Y., Prévost, H., Drider, D. 2007. Identification of new genes associated with intermediate resistance of *Enterococcus faecalis* to divercin V41, a pediocin-like bacteriocin. *Microbiology* 153: 1609-1618.
- Canchaya, C., Claesson, M.J., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., O'Toole, P.W. 2006. Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology.* 152: 3185-3196.

- Cannon, J.P., Lee, T.A., Bolanos, J.T., Danziger, L.H. 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24: 31-40.
- Chen, Y., Ludescher, R.D., Montville, T.J. 1997a. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4770-4777.
- Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M., Montville, T.J. 1997b. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 524-531.
- Chen, H., Lim, C.K., Lee, Y.K., Chan, Y.N. 2000 Comparative analysis of the genes encoding 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of *Lactobacillus casei*-related strains, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 471-478.
- Chen, H., Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 2: 82-100.
- Chikindas, M.L., Garcia-Garcera, M.J., Driessen, A.J., Ledebøer, A.M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N., Venema, G. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3577-3584.
- Cho, H.S., Pelton, J.G., Yan, D., Kustu, S., Wemmer, D.E. 2001. Phosphoaspartates in bacterial signal transduction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 679-684.
- Chopin, A., Chopin, M.C., Moillo-Bat, A., Langella, P. 1984. Two plasmid-determined restriction and modification system in *Streptococcus lactis*. *Plasmid.* 11: 260-263.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Henardez, P.E., Nes, I.F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4321-4330.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Henardez, P.E., Nes, I.F., Håvarstein, L.S. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988-1994.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Henardez, P.E., Nes, I.F. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806-6814.
- Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Le Blay, G. 2008. Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63: 56-64.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1-20.
- Clewell, B.D. 1994. Plasmids in Bacteria. In: *Plasmid transfer*. p: 431-432. Plenum Publishing corp., New York.

- Cohen, S.L., Chait, B.T. 1997. Mass spectrometry of whole proteins eluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* 247: 257-267.
- Collins, C.H., Lyne, P.M. 1976. *Microbiological Methods*. Butterworths and Co., London.
- Collins, M.D., Phillips, B.A., Zanoni, P. 1989. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 105-108.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P.R. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777-788.
- Dabour, N., Zihler, A., Kheadr, E., Lacroix, C., Fliss, I. 2009. In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 133: 225-233.
- Dal Bello, F., Walter, J., Hammes, W.P., Hertel, C. 2003. Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation conditions. *Microb. Ecol.* 45: 455-463.
- Dal Bello, F., Hertel, C. 2006. Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 69-76.
- Dalet, K., Briand, C., Cenatiempo, Y., Héchard, Y. 2000. The *rpoN* gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 41: 441-443.
- Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., Hechard, Y. 2001. European Listeria Genome Consortium. A sigma (54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* 147: 3263-3269.
- Davidson, A.L., Chen, J. 2004. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 241-268.
- de Kwaadsteniet, M., Fraser, T., van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. 2006. Bacteriocin T8, a novel Class IIa *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4761-4766.
- De Vuyst, L., Vandamme, E. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. p: 539. Blackie London, United Kingdom.
- De Vuyst L, Degeest B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 153-177.
- De Vuyst, L., Foulquie Moreno, M.R., Revets, H. 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysis and vancomycin resistance in enterococci of different origin. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 299-318.
- De Vuyst, L., Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microb. Biotech.* 13: 194-199.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.
- Dellaglio, F., Felis, G.E., Torriani, S. 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 285-287.

- Dellaglio, F., Felis, G.E., Torriani, S. 2005. Is the genus *Lactobacillus* a single genus? In LAB8 Symposium on Lactoc Acid Bacteria. Egmond aan Zee, Netherlands: FEMS
- Delves-Broughton, J. 2005. Nisin as a food preservative. *Food Australia* 57: 525-527.
- Deraz, S.F., Karlsson, E.N., Khalil, A.A., Mattiasson, B. 2007. Mode of action of acidocin D20079, a bacteriocin produced by the potential probiotic strain, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 373-379.
- Dicks, L.M.T., DuPlessis, E.M., Dellaglio, F., Lauer, E. 1996. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the *Lactobacillus paracasei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 337-340.
- Diep, D.B., Havarstein, L.S., Nes, I.F., 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178: 4472-4483.
- Diep, D.B., Axelsson, L., Grefslis, C., Nes, I.F. 2000. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiol.* 146: 2155-2160.
- Diep, D.B., Nes, I.F. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets.* 3: 107-122.
- Diep, D.B., Godager, L., Brede, D., Nes, I.F. 2006. Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. *Microbiol.* 152:1 649-1659.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., Nes, I.F. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 2384-2389.
- Dimitrijević, R., Stojanović, M., Zivković, I., Petersen, A., Jankov, R.M., Dimitrijević, L., Gavrović-Jankulović, M. 2009. The identification of a low molecular mass bacteriocin, rhamnosin A, produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain 68. *J. Appl. Microbiol.* 107: 2108-2115.
- Dimov, S., Ivanova, P., Harizanova, N. 2005. Genetics of bacteriocins biosynthesis by Lactic acid bacteria. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 19: 4-10.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., Hacker, J. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev. Microbiol.* 2: 414-424.
- Doron, S., Gorbach, S.L. 2006. Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 4: 261-275.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M., Prevos, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564-582.
- Earnshaw, R.G. 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease.* ed. Wood, B.J.B. p: 211-232. Elsevier Applied Science, London and New York. 19-436.
- Eijsink, V.G., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., Nes, I.F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbio.* 64: 3275-3281.

- Eijsink, V.G., Axelsson, L., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 81: 639-654.
- Eklund, T. 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *Int. J. Food Microbiol.* 1: 179-185.
- Elena, S.F., Lenski, R.E. 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Genet.* 4: 457-469.
- El-Ziney, M.G., van den Tempel, T., Debevere, J., Jakobsen, M. 1999. Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. *J. Food Prot.* 62: 257-261.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 85-106.
- Eschenbach, D.A., Davick, P.R., Williams, B.L., Klebanoff, S.J., Young-Smith, K., Critchlow, C.M., Holmes, K.K. 1989. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 27: 251-256.
- Faye, T., Langsrud, T., Nes, I.F., Holo, H. 2000. Biochemical and genetic characterization of propionicin T1, a new bacteriocin from *Propionibacterium thoenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4230-4236.
- Faye, T., Brede, D.A., Langsrud, T., Nes, I.F., Holo, H. 2002. An antimicrobial peptide is produced by extracellular processing of a protein from *Propionibacterium jensenii*. *J. Bacteriol.* 184: 3649-3656.
- Faye, T., Brede, D.A., Langsrud, T., Nes, I.F., Holo, H. 2004. Prevalence of the genes encoding propionicin T1 and protease-activated antimicrobial peptide and their expression in classical propionibacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2240-2244.
- Feldgarden, M., Byrd, N., Cohan, F.M. 2003. Gradual evolution in bacteria: evidence from *Bacillus* systematics. *Microbiol.* 149: 3565-3573.
- Feng, G., Guron, G.K., Churey, J.J., Worobo, R.W. 2009. Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5708-5713.
- Field, D., Connor, P.M., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2008. The generation of nisin variants with enhanced activity against specific gram-positive pathogens. *Mol. Microbiol.* 69: 218-230.
- Fimland, G., Jack, R., Jung, G., Nes, I.F., Nissen-Meyer, J. 1998. The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C terminus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 5057-5060.
- Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G., Nissen-Meyer, J. 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.* 182: 2643-2648.
- Fimland, G., Eijsink, V.G., Nissen-Meyer, J. 2002. Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiol.* 148: 3661-3670.
- Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., Nissen-Meyer, J. 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure and mode of action. *J. Pept. Sci.* 11: 688-696.

- Fimland, G., Pirneskoski, J., Kaewsrichan, J., Jutila, A., Kristiansen, P.E., Kinnunen, P.K.J., Nissen-Meyer, J. 2006. Mutational analysis and membrane-interactions of the beta-sheet-like N-terminal domain of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P. *Biochim. Biophys. Acta.* 1764: 1132–1140.
- Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S., Beresford, T. 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non- starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3418-3426.
- Franke, C.M., Leenhouds, K.J., Haandrikman, A.J., Kok, J., Venema, G., Venema, K. 1996. Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 178: 1766-1769.
- Fregeau Gallagher, N.L., Sailer, M., Niemczura, W.P., Nakashima, T.T., Stiles, M.E., Vederas, J.C. 1997. Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* 36: 15062-15072.
- Gabin-Gauthier, K., Gratadoux, J.J., Richard, J. 1991. Conjugal plasmid transfer between lactococci on solid surface matings and during cheese making. *FEMS Microbiol. Lett.* 85: 133-140.
- Gajic, O., Kojic, M., Banina, A., 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.* 51: 69-78.
- Gajic, O., Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., Kuipers, O.P., Kok, J. 2003. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 34291-34298.
- Ganzle, M.G., Holtzel, A., Walter, J., Jung, G., Hammes, W.P. 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4325-4333.
- Garneau, S., Ference, C.A., van Belkum, M.J., Stiles, M.E., Vederas, J.C. 2003. Purification and characterization of brochocin A and brochocin B(10-43), a functional fragment generated by heterologous expression in *Carnobacterium piscicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1352-1358.
- Gasson, M.J. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154: 1-9.
- Ghosh, S., van Heel, D., Playford, R.J. 2004. Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation? *Gut* 53: 620-622.
- Giraud, A., Matic, I., Tenaillon, O., Clara, A., Radman, M., Fons, M., Taddei, F. 2001. Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science* 291: 2606-2608.
- Goto, Y., Li, B., Claesen, J., Shi, Y., Bibb, M.J., van der Donk, W.A. 2010. Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. *PLoS Biol.* 8:e1000339.
- Gould, G.W. 1991. Antimicrobial compound. In: *Biotechnology and Food Ingredients*. eds. Goldberg, I., Williams, R. p. 461-483. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Hammes, W.P., Tichaczek, P.S. 1994. The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Z. Lebensm. Unters Forsch.* 198: 193-201.

- Hammes, W.P., Vogel R.F. 1995. The Genus *Lactobacillus*. In: The Lactic Acid Bacteria, Vol. 2, eds. Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. p: 19-54. Chapman and Hall, London, UK.
- Hammes, W.P., Hertel, C. 2003. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: The Prokaryotes, 3rd edn. eds. Dworkin *et al.* p. release 3.15. Springer- Verlag, New York.
- Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hanahan, D. 1985. DNA Cloning (Glover, D.M., ed) IRL Press, Oxford, 1: 109.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52: 384-387.
- Haugen, H.S., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., Kristiansen, P.E. 2005. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A. *Biochemistry* 44: 16149-16157.
- Havarstein, L.S., Diep, D.B., Nes, I.F. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16: 229-240
- Hayden, R.L. 1923. Elective localization in the eye of bacteria from infected teeth. *Arch. Int. Med.* 32: 828-849.
- Héchar, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y., Frère, J. 2001. Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiol.* 147: 1575-1580.
- Hechar, Y., Sahl, H.G: 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84: 545-557.
- Hedin, C., Whelani, K., Lindsay, J.O. 2007. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc. Nutr. Soc.* 66: 307-315.
- Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D., de Vos, W.M. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 114-123.
- Heng, N.C.K., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W., Tagg, J.R. 2007. The diversity of bacteriocins in Grampositive bacteria. In: *Bacteriocins: ecology and evolution.* eds. Riley, M.A., Chavan, M. p: 45-92. Springer. Berlin.
- Hernandez, D., Cardell, E., Zárte, V. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J. Appl. Microbiol.* 99: 77-84.
- Herranz, C., Chen, Y., Chung, H.J., Cintas, L.M., Hernandez, P.E., Montville, T.J., Chikindas, M.L. 2001a. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1689-1692.
- Herranz, C., Cintas, L.M., Hernandez, P.E., Moll, G.N., Driessen, A.J. 2001b. Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 901-904.

- Herranz, C., Driessen, A.J.M. 2005. Sec-mediated secretion of enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1959-1963.
- Hickey, R.M., Twomey, D.P., Ross, R.P., Hill, C. 2003. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiol.* 149: 655-664.
- Höltzel, A., Gänzle, M.G., Nicholson, G.J., Hammes, W.P., Jung, G. 2000. The first low-molecular-weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39: 2766-2768.
- Hopwood, D.A., Bibb, J.M., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, K.M., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrempf, H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. Norwich, UK, The John Innes Foundation.
- Hosono, A., Lee, J., Ametani, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T., Kaminogawa, S. 1997. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 312-316.
- Huang, L., Forsberg, C.W., Gibbins, L.N. 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermented products. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1230-1234.
- Huhne, K., Axelsson, L., Holck, A., Krockel, L. 1996. Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. *Microbiol.* 142: 1437-1448.
- Huttunen, E., Noro, K., Yang, Z.N. 1995. Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *Int. Dairy J.* 5: 503-513.
- Hyman, R.W., Fukushima, M., Diamond, L., Kumm, J., Giudice, L.C., Davis, R.W. 2005. Microbes on the human vaginal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 7952-7957.
- Ingham, A.B., Ford, M., Moore, R.J., Tizard, M. 2003. The bacteriocin piscicolin 126 retains antilisterial activity in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:1365-1371.
- Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanauke, P., Koivula, T. 1991. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. Strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88: 90-97.
- James, R., Lazdunski, C., Pattus, F. 1991. Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics. Vol. 65. p: 519. New York: Springer-Verlag.
- Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 525-532.
- Jay, J.M. 1986. *Modern Food Microbiology*, 3rd edition. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Holo, H., Nes, I.F., Sletten, K.H., Warner, P.J. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4459-4463.

- Joerger, M.C., Klaenhammer, T.R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* 167: 439-446.
- Johnsen, L., Finland, G., Nissen-Meyer, J. 2005a. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* 280: 9243–9250.
- Johnsen, L., Dalhus, B., Leiros, I., Nissen-Meyer, J. 2005b. 1.6 Angstroms crystal structure of EntA-im: a bacterial immunity protein conferring immunity to the antimicrobial activity of the pediocinlike bacteriocin enterocin A. *J. Biol. Chem.* 280: 19045-19050.
- Jolly, L., Newell, J., Porcelli, I., Vincent, S.J., Stingele, F. 2002. *Lactobacillus helveticus* glycosyltransferases: from genes to carbohydrate synthesis. *Glycobiology* 12: 319-327.
- Jovčić, B., Begović, J., Lozo, J., Topisirović, L., Kojić, Milan. 2009. Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch. Biol. Sci.* 61: 159-164.
- Jung, G. 1991. Lantibiotics: a survey. In Nisin and novel lantibiotics G Jung and HG Sahl Editors ESCOM Science Publishers, BV Leiden
- Kabara, J.J. 1993. Medium-chain fatty acids and esters. In: *Antimicrobials in Foods*, 2nd edition. eds. Davidson, P.M., Branen, A.L. p: 307-342. Marcel Dekker Inc., New York.
- Kalmokoff, M.L., Banerjee, S.K., Cyr, T., Hefford, M.A., Gleeson, T. 2001. Identification of a new plasmid-encoded sec-dependent bacteriocin produced by *Listeria innocua* 743. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4041-4047.
- Kanatani, K., Tahara, T., Oshimura, M., Sano, K., Umezawa, C. 1995. Cloning and nucleotide sequence of the gene for acidocin 8912, a bacteriocin from *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 384-386.
- Kandler, O. 1984. Current taxonomy of lactobacilli. *Ind. Microbiol.* 25: 109-123.
- Kandler, O., Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9th edition. p. 1063-1065. Baltimore (MD): Williams & Wilkins.
- Kant, R., Blom, J., Palva, A., Roland J. Siezen, R.J., de Vos, W.M. 2011. Comparative genomics of *Lactobacillus*. *Microb. Biotech.* 4: 323-332.
- Kato, Y., Sakala, R.M., Hayashidani, H., Kiuchi, A., Kaneuchi, C., Ogawa, M. 2000. *Lactobacillus algidus* sp. nov., a psychrophilic lactic acid bacterium isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1143-1149.
- Kaur, K., Andrew, L.C., Wishart, D.S., Vederas, J.C. 2004. Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic alpha helix as a receptor-binding region. *Biochemistry* 43: 9009-9020.
- Kawai, Y., Saitoh, B., Takahashi, O., Kitazawa, H., Saito, T., Nakajima, H., Itoh, T. 2000. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 2201-2208.

- Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R.T., Mercier, P., Diaper, C.M., Zuber, P., Vederas, J.C. 2003. Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 4726-4727.
- Kazacic, M., Nissen-Meyer, J., Fimland, G. 2002. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiol.* 148: 2019-2027.
- Keddie, R.M. 1959. The properties and classification of lactobacilli isolated from grass and silage. *J. Appl. Bacteriol.* 22: 403-416.
- Kemperman, R., Jonker, M., Nauta, A., Kuipers, O.P., Kok, J. 2003. Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5839-5848.
- Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S., Yamaguchi, T. 1991. Antitumoral activity of slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian ropy sour milk, 'viili'. *Anim. Sci. Technol.* 62: 277-283.
- Kitchell, A.G., Shaw, B.G. 1975. Lactic acid bacteria in fresh and cured meat. In: *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. eds. Carr, J.G., Cutting, C.V., Whiting, C.C. p: 209-220. Academic Press, London, New York, San Francisco.
- Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B. 2009. Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells. *Microbiol.* 155: 2949-2961.
- Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I.F., Diep, D.B. 2010. An extracellular loop of the mannose phosphotransferase 1 system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J. Bacteriol.* 192: 5906-5913.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B. 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiol.* 157: 3256-3267.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 337-349.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-85.
- Kodani, S., Hudson, M.E., Durrant, M.C., Buttner, M.J., Nodwell, J.R., Willey, J.M. 2004. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 11448-11453.
- Kodani, S., Lodato, M.A., Durrant, M.C., Picart, F., Willey, J.M. 2005. SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes. *Mol. Microbiol.* 58: 1368-1380.
- Kojic, M., Fira, D., Banina, A., Topisirovic, L. 1991a. Characterization of the Cell Wall-Bound Proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1753-1757.
- Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A., Topisirovic, L. 1991b. Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1835-1837.

- Kojic, M., Strahinic, I., Fira, D., Jovcic, B., 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.
- Kojic, M., Lozo, J., Jovcic, B., Strahinic, I., Fira, D., Topisirovic, L. 2010. Construction of a new shuttle vector and its use for cloning and expression of two plasmid-encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. *Int. J. Food Microbiol.* 140: 117-124.
- Kojic, M., Jovcic, B., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Veljovic, K., Topisirovic, L. 2011. Cloning and expression of a novel lactococcal aggregation factor from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1. *BMC Microbiol.* 11: 265.
- Kong, S., Davison, A.J. 1980. The role of interactions between O₂, H₂, OH⁻, e⁻ and O²⁻ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 13-29.
- Lamothe, G.T., Jolly, L., Mollet, B., Stingle, F. 2002. Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Arch Microbiol.* 178: 218-228.
- Lawrence, J.G. 1999. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 519-523.
- Leer, R.J., van der Vossen, J.M.B.M., van Giezen, M., van Noort, J.M., Pouwels, P.H. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol.* 141: 1629-1635.
- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-164.
- Litopoulou-Tzanetaki, E. 1990. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *J. Food Sci.* 55: 111-113.
- Lozo, J., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Topisirovic, L. 2004. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *J. Food Prot.* 67: 2727-2734.
- Lozo, J., Jovcic, B., Kojic, M., Dalgarrondo, M., Chobert, J.M., Haertlé, T., Topisirovic, L. 2007. Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. *Curr. Microbiol.* 55: 266-271.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchin, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 15611-15616.
- Makarova, K.S., Koonin, E.V. 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 189: 1199-1208.

- Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L., Floriano, B., Jimenez-Diaz, R. 2002. The locus responsible for production of plantaricin S, a class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, is widely distributed among wild-type *Lact. plantarum* strains isolated from olive fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 77: 117-124.
- Mama, V., Hatzikamari, M., Lombardi, A., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 2002. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* heterogeneity: me diversity among strains isolated from traditional Greek cheeses. *Ital. J. Food Sd.* 14: 351-362.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Martínez, B., Fernández, M., Suárez, J.E., Rodríguez, A. 1999. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiol.* 145: 3155-3161.
- Martin-Visscher, L.A., Sprules, T., Gursky, L.J., Vederas, J. 2008. Nuclear magnetic resonance solution structure of PisL, a group B immunity protein that provides protection against the type IIa bacteriocin piscicolin 126, PisA. *Biochemistry* 47: 6427-6436.
- Martin-Visscher, L.A., Gong, X., Duszyk, M., Vederas, J.C. 2009. The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *J. Biol. Chem.* 284: 28674-28681.
- Marugg, J.D., Gonzalez, C.F., Kunka, B.S., Ledebor, A.T., Pucci, M.J., Toonen, M.Y., Walker, S.A., Zoetmulder, L., Vandenberg, P.A. 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2360-2367.
- Marx, R., Stein, T., Entian, K.D., Glaser, S.J. 2001. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by ¹H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Protein Chem.* 20: 501-506.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., Berkeley, R.C.W. 1972. Methods for studying-bacteriocins. In: *Methods in microbiology*. eds. Norris, J.R., Ribbons, D.W. Vol. 7A. p: 315-422. Academic Press Inc. New York.
- McCormick, J.K., Poon, A., Sailer, M., Gao, Y., Roy, K.L., McMullen, L.M., Vederas, J.C., Stiles, M.E., Van Belkum, M.J. 1998. Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, an antibotulinum, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 475-4766.
- McCormick, J.K., Worobo, R.W., Stiles, M.E. 1996. Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4095-4099.
- Meindl, K., Schmiederer T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, D., Keller, S., Guhring, H., Vertesy, L., Wink, J., Hoffmann, H., Bronstrup, M., Sheldrick, G.M., Sussmuth, R.D. 2010. Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49: 1151-1154.

- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R., Manicardi, G. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 193-198.
- Messi, P., Guerrieri, E., Bondi, M. 2003. Bacteriocin-like substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 220: 121-125.
- Métivier, A., Pilet, M.F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Picard, J.C., Marion, D., Cenatiemp, Y., Frémaux, C. 1998. Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiol.* 144: 2837-2844.
- Miladinov, N., Kuipers, O.P., Topisirovic, L. 2001. Casitone-mediated expression of the prtP and prtM genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29. *Arch. Microbiol.* 177: 54-61.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Miller, M., Bassler, B. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 165-199.
- Miller, K.W., Ray, P., Steinmetz, T., Hanekamp, T., Ray, B. 2005. Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1, production operons in *Pediococcus* and *Lactococcus* plasmids. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 52-62.
- Mirkin, B.G., Fenner, T.I., Galperin, M.Y., Koonin, E.V. 2003. Algorithms for computing parsimonious evolutionary scenarios for genome evolution, the last universal common ancestor and dominance of horizontal gene transfer in the evolution of prokaryotes. *BMC Evol. Biol.* 3: 2.
- Morency, H., Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., Lavoie, M.C. 2001. Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can. J. Microbiol.* 47: 322-331.
- Moretro, T., Naterstad, K., Wang, E., Aasen, I.M., Chaillou, S., Zagorec, M., Axelsson, L. 2005. Sakacin P non-producing *Lactobacillus sakei* strains contain homologues of the sakacin P gene cluster. *Res. Microbiol.* 156: 949-960.
- Mortvedt, C.I., Nissen-Mayer, J., Sletten, K., Nes, I.F. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* L45. *Appl Environ. Microbiol.* 57: 1829-1834.
- Moschetti, G., Villani, F., Blaiotta, G., Baldinelli, A., Coppola, S. 1996. Presence of non-functional nisin genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from natural starters. *FEMS Microbiol. Lett.* 145: 27-32.
- Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., Lavoie, M.C. 2000. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 24-29.
- Mota-Meira, M., Morency, H., Lavoie, M.C. 2005. In vivo activity of mutacin B-Ny266. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 869-871.
- Mucchetti, G., Locci, F., Massara, P., Vitale, R., Neviani, E. 2002. Production of pyroglutamic acid by thermophilic lactic acid bacteria in hard-cooked mini-cheeses. *J. Dairy Sci.* 85: 2489-2496.
- Mundt, J.O., Hammer, J.L. 1968. Lactobacilli on plants. *Appl. Microbiol.* 16: 1326-1330.

- Muriana, P.M., Klaenhammer, T.R. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 114-121.
- Naghmouchi, K., Drider, D., Baah, J., Teather, R. 2010. Nisin A and polymyxin B as synergistic inhibitors of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Probiotics Antimicro. Prot.* 2: 98-103.
- Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Baah, J., Ron, T., Drider, D. 2011. Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 162: 99-107.
- Nakajima, H., Hirota, T., Toba, T., Itoh, T., Adachi, S. 1992. Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydr. Res.* 224: 245-253.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antoine Van Leeuwenhoek* 70: 113-128.
- Nes, I.F., Eijsink, V.G.H. 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. In: *Cell-cell signalling in bacteria*. eds. Dunny, G.M., Winans, S.C. p: 175-192. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Nes, I.F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J. 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (Class II) produced by lactic acid bacteria. In: *Peptide antibiotics: discovery, modes of action and applications*. eds. Dutton, C.J., Haxell, M.A., McArthur, H.A.I. p: 81-115. Wax, R.G. Marcel Dekker, New York.
- Nes, I.F., Johnsberg, O. 2004. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 100-104.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Holo, H. 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189: 1189-1198.
- Netz, D.J., Sahl, H.G., Marcelino, R., dos Santos, N.J., de Oliveira, S.S., Soares, M.B., do Carmo de Freire Bastos, M. 2001. Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 311: 939-949.
- Neve, H., Geis, A., Teuber, M. 1987. Conjugation, a common plasmid transfer mechanism in lactic acid streptococci of dairy starter cultures. *Syst. Appl. Microbiol.* 9: 151-157.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., Nes, I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 5686-5692.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H.S., Kristiansen, P.E. 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10: 19-37.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304.
- Ohta, T. 2003. Evolution by gene duplication revisited: differentiation of regulatory elements versus proteins. *Genetica* 118: 209-216.

- Onda, T., Yanagida, F., Tsuji, M., Shinohara, T., Yokotsuka, K. 2003. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 153-159.
- Oppegard, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 210-219.
- Ortu, S., Felis, G.E., Marzotto, M., Deriu, A., Mollicotti, P., Sechi, L.A., Dellaglio, F., Zanetti, S. 2007. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *Int. Dairy J.* 17: 1312-1320.
- Ostlie, H.M., Eliassen, L., Florvaag, A., Skeie, S. 2005. Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Prast cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 15: 911-920.
- O'Sullivan, D.J., Klaenhammer, T.R. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2730-2733.
- Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2nd Ed. eds. Salminen, S., von Wright, A. p: 139-159. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Pag, U., Sahl, H.G. 2002. Multiple activities in lantibiotics-models for the design of novel antibiotics? *Curr. Pharm. Des.* 8: 815-833.
- Palmer, B.R., Marinus M.G. 1994. The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli* - a review. *Gene* 143: 1-12.
- Pangsomboon, K., Kaewnopparat, S., Pitakpornpreecha, T., Srichana, T. 2006. Antibacterial activity of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* HL32 against *Porphyromonas gingivalis*. *Arch. Oral Biol.* 51: 784-793.
- Parente, E., Riccardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 628-638.
- Piard, J.C., Desmazeaud, M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* 71: 525-541.
- Pigeon, R.M., Cuesta, E.P., Gilliland, S.E.G. 2002. Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. *J. Dairy Sci.* 85: 2705-2710.
- Podolak, P.K., Zayas, J.F., Kastner, C.L., Fung, D.Y.C. 1996. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373.
- Postma, P.W., Langelier, J.W., Jacobson, G.R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 543-594.
- Quadri, L.E., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E., 1997. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 179: 6163-6171.
- Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P.C., Klinder, A., O'Riordan, M., O'Sullivan, G.C., Pool-Zobel, B., Reckemmer, G., Roller, M., Rowland, I., Salvadori, M., Thijs, H., Van Loo, J., Watzl, B., Collins, J.K. 2007. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 85: 488-496.

- Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J.W., Héchard, Y. 2004. Expression of mptC of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiol.* 150: 2663-2668.
- Rao, D.R., Reddy, J.C. 1984. Effect of lactic fermentation of milk on milk lipids. *J. Food Sci.* 49: 748-750.
- Rea, M.C., Sit, C.S., Clayton, E., O'Connor, P.M., Whittal, R.M., Zheng, J., Vederas, J.C., Ross, R.P., Hill, C. 2010. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 9352-9357.
- Rea, M.C., Ross, R.P., Cotter, P.D., Hill, C. 2011. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In: *Prokaryotic antimicrobial peptides from genes to applications* eds. Drider, D., Rebuffat, S. p: 29-53. Springer New York Dordrecht Heidelberg London.
- Reid, G., Burton, J. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.* 4: 319-324.
- Rihakova, J., Cappelier, J.M., Hue, I., Demnerova, K., Fédérighi, M., Prévost, H., Drider, D. 2010. In vivo activities of recombinant divercin V41 and its structural variants against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 563-564.
- Riley, M.A., Wertz, J.E. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 117-137.
- Ringo, E., Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160: 177-203.
- Roberts, I.S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 285-315.
- Robichon, D., Gouin, E., De'barbouille, M., Cossart, P., Cenatiempo, Y., Héchard, Y. 1997. The *rpoN* (s54) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 179: 7591-7594.
- Rodriguez, J.M., Martinez, M.I., Kok, J. 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42: 91-121.
- Rogne, P., Haugen, C., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., Kristiansen, P.E. 2009. Three-dimensional structure of the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. *Peptides* 30:1613-1621.
- Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130: 396-402.
- Rosenow, E.C. 1919. Studies on elective localization. *J. Dent. Research* 1: 205-249.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 12: 163-171.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Salminen, S. 2006. Short communication: effect of exopolysaccharide isolated from "viili" on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *J. Dairy Sci.* 89: 2355-2358.
- Saito, A., Fujii, T., Miyashita, K. 2003. Distribution and evolution of chitinase genes in *Streptomyces* species: involvement of gene-duplication and domain-deletion. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 84: 7-15.

- Sakala, R.M., Kato, Y., Hayashidani, H., Murakami, M., Kaneuchi, C., Ogawa, M. 2002. *Lactobacillus fuchuensis* sp. nov., isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1151-1154.
- Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 347-358.
- Samelis, J., Kakouri, A., Pappa, E.C., Matijasić, B.B., Georgalaki, M.D., Tsakalidou, E., Rogelj, A. 2010. Microbial stability and safety of traditional Greek Graviera cheese: characterization of the lactic acid bacterial flora and culture-independent detection of bacteriocin genes in the ripened cheeses and their microbial consortia. *J. Food Prot.* 73: 1294-1303.
- Sánchez, J., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cinitas, L.M., Hernández, P.E. 2007. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 227-236.
- Sanz, B., Selgas, D., Parejo, I., Ordonez, J.A. 1988. Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 199-205.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., Black, R.E. 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet. Infect. Dis.* 6: 374-382.
- Schägger, H., Jagow, G. 1987. Tricin-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Schleifer, K.H., Ludwig, V. 1995. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, p: 7-17. Edited by B. J. B. Wood & W. H. Holzappel. Glasgow, UK: Chapman & Hall.
- Schneider, D., Lenski, R.E. 2004. Dynamics of insertion sequence elements during experimental evolution of bacteria. *Res. Microbiol.* 155: 319-327.
- Schröder, K., Clausen, E., Sandbreg, A.M., Raa, J. 1980. Psychrotrophic *Lactobacillus plantarum* from fish and its ability to produce antibiotic substances. In Connell (Editor), *Control of Fish Quality*. Fishing News Books Ltd., Farnham, Surrey
- Senes, A., Engel, D.E., DeGrado, W.F. 2004. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 465-479.
- Servin, A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 405-440.
- Settanni, L., Franciosi, E., Cavazza, A., Cocconcelli, P.S., Poznanski, E. 2011. Extension of Tosèla cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 28: 883-890.
- Sharpe, M.E. 1979. Identification of Lactic Acid Bacteria. Identification methods for microbiologists-second edition, p: 233-259. Academic Press.
- Sharpe, M.E. 1981. The genus *Lactobacillus*. In: *The Prokaryotes*. Vol. 2. eds. Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows A., Schegel, G.H. A Handbook on Habits, Isolation and Identification of Bacteria. 1653-1679. Springer-Verlag, New York.

- Simmonds, R.S., Simpson, W.J., Tagg, J.R. 1997. Cloning and sequence analysis of *zooA*, a *Streptococcus zooepidemicus* gene encoding a bacteriocin-like inhibitory substance having a domain structure similar to that of lysostaphin. *Gene* 189: 255-261.
- Simon, L., Fremaux, C., Cenatiempo, Y., Berjeaud, J.M. 2002. Sakacin g, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6416-6420.
- Skaugen, M., Cintas, L.M., Nes, I.F. 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: *Genetics of lactic acid bacteria*. eds. Wood, B.J.B., Warner, P.J. p: 225-260. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Smulders, F.J.M., Barendsen, P., van Logtestijn, J.G., Mossel, D.A.A., van Der Marel, G.M. 1986. Review: Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. *J. Food Technol.* 21: 419-436.
- Sokurenko, E.V., Chesnokova, V., Dykhuizen, D.E., Ofek, I., Wu, X.R., Krogfelt, K.A., Struve, C., Schembri, M.A., Hasty, D.L. 1998. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 8922-8926.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Springael, D., Top, E.M. 2004. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends Microbiol.* 12: 53-58.
- Sprules, T., Kawulka, K.E., Gibbs, A.C., Wishart, D.S., Vederas, J.C. 2004. NMR solution structure of the precursor for carnobacteriocin B2, an antimicrobial peptide from *Carnobacterium piscicola*. *Eur. J. Biochem.* 271: 1748-1756.
- Straume, D., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B. 2007. Quorum-sensing based bacteriocin production is down-regulated by N-terminally truncated species of gene activators. *Mol. Genet. Genomics* 278: 283-293.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bact. Rev.* 40: 722-756.
- Tagg, J.R., Wong, H.K. 1983. Inhibitor production by group G streptococci of human and of animal origin. *J. Med. Microbiol.* 16: 409-415.
- Tahara, T., Kanatani, K., Yoshida, K., Miura, H., Sakamoto, M., Oshimura, M. 1992. Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1212-1215.
- Talarico, T.L., Dobrogosz, W.J. 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 674-679.
- Tatsadjieu, N.L., Njintang, Y.N., Kemgang, S.T., Daoudou, B., Mbofung, C. 2009. Characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocins against chicken *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3: 220-227.
- Tenaillon, O., Taddei, F., Radmian, M., Matic, I. 2001. Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res. Microbiol.* 152: 11-16.

- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., Fraser, C.M., 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293: 498-506.
- Todorov, S.D., Botes, M., Danova, S.T., Dicks, L.M.T. 2007. Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. *J. Appl. Microbiol.* 103: 629-639.
- Tolinački, M., Kojić, M., Lozo, J., Terzić-Vidojević, A., Topisirović, L., Fira, D. 2010. Characterization of the bacteriocin-producing strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9. *Arch. Biol. Sci.* 62: 889-899.
- Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y. 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.* 178: 3585-3593.
- Top, E.M., Springael, D. 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 262-269.
- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I., Lozo, J. 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 112: 230-235.
- Ueda, K., Oinuma, K., Ikeda, G., Hosono, K., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., Beppu, T. 2002. AmfS, an extracellular peptidic morphogen in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 184: 1488-1492.
- Uteng, M., Hauge, H.H., Markwick, P.R., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J., Muhle-Goll, C. 2003. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* 42: 11417-11426.
- Vadyvaloo, V., Hastings, J.W., Van der Merwe, M.J., Rautenbach, M. 2002. Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5223-5230.
- Vadyvaloo, V., Arous, S., Gravesen, A., Héchar, Y., Chauhan-Haubrock, R., Hastings, J.W., Rautenbach, M. 2004. Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiol.* 150: 3025-3033.
- Valdes-Stauber, N., Scherer, S. 1994. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3809-3814.
- van Belkum, M.J., Stiles, M.E. 1995. Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3573-3579.

- Van Belkum, M.J., Worobo, R.W., Stiles M.E. 1997. Double- glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 23: 1293-1301.
- van der Meer, Jr., Polman, J., Beerthuizen, M.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P., de Vos, W.M. 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 2578-2588.
- van Kranenburg, R., Boels, I.C., Kleerebezem, M., de Vos, W.M. 1999. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 498-504.
- van Wely, K.H.M., Swaving, J., Freudl, R., Driessen, A.J.M. 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 437-454.
- Vandenbergh, P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 221-238.
- Varcamonti, M., Nicastro, G., Venema, G., Kok, J. 2001. Proteins of the lactococcin A secretion system: *lcnD* encodes two in-frame proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 259-263.
- Vasquez, A., Jakobsson, T., Ahrne, S., Forsum, U., Molin, G. 2002. Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2746-2749.
- Vásquez, A., Molin, G., Pettersson, B., Antonsson, M., Ahrné, S. 2005. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 430-441.
- Vaughan, A., Eijsink, V.G., O'Sullivan, T.F., O'Hanlon, K., van Sinderen, D. 2001. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.* 91: 131-138.
- Vaughan, A., Eijsink, V.G., Van Sinderen, D. 2003. Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7194-7203.
- Venema, K., Kok, J., Marugg, J.D., Toonen, M.Y., Ledebøer, A.M., Venema, G., Chikindas, M.L. 1995. Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol.* 17: 515-522.
- Venema, K., Dost, M.H., Beun, P.A., Haandrikman, A.J., Venema, G., Kok, J. 1996. The genes for secretion and maturation of lactococcins are located on the chromosome of *Lactococcus lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1689-1692.
- Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G.F., Gupta, R.S., van Sinderen, D. 2007. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 91: 351-372.
- Venugopal, H., Edwards, P.J., Schwalbe, M., Claridge, J.K., Libich, D.S., Stepper, J., Loo, T., Patchett, M.L., Norris, G.E., Pascal, S.M. 2011. Structural, dynamic, and chemical characterization of a novel S-glycosylated bacteriocin. *Biochemistry* 50: 2748-2755.

- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40.
- Vollenweider, S., Lacroix, C. 2004. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 16-27.
- Vujčić, M., Topisirović, L. 1993. Molecular analysis of the rolling-circle replicating plasmid pA1 of *Lactobacillus plantarum* A112. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 274-280.
- Wachsmann, M.B., Farias, M.E., Takeda, E., Sesma, F., de Ruiz Holgado, A.P., de Torres, R.A., Coto, C.E. 1999. Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpes viruses. *Int. J. Antimicrob. Agents* 12: 293-299.
- Wachsmann, M.B., Castilla, V., de Ruiz Holgado, A.P., de Torres, R.A., Sesma, F., Coto, C.E. 2003. Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro. *Antivir. Res.* 58: 17-24.
- Walker, D.C., Aoyama, K., Klaenhammer, T.R. 1996. Electrotransformation of *Lactobacillus acidophilus* A1. *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 233-237.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K., Hammes, W.P. 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2578-2585.
- Willey, J.M., van der Donk, W.A. 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 477-501.
- Worobo, R.W., van Belkum, M.J., Saier, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E. 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* 177: 3143-3149.
- Yang, R., Johnson, M.C., Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3355-3359.
- Zendo, T., Nakayama, J., Fujita, K., Sonomoto, K. 2008. Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. *J. Appl. Microbiol.* 104: 499-507.
- Zhou, X., Bent, S.J., Schneider, M.G., Davis, C.C., Islam, M.R., Forney, L.J. 2004. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiol.* 150: 2565-2573.
- Zhu, Y., Zhang, Y., Li, Y. 2009. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83: 597-610.

BIOGRAFIJA

Maja Tolinački je rođena 23. aprila 1979. godine u Beogradu. Diplomirala je 2003. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,64. Iste godine je upisala poslediplomske studije na Biološkom fakultetu, smer Molekularna genetika i genetičko inženjerstvo i te godine je angažovana u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, kao istraživač-stipendista Ministarstva nauke i zaštite životne sredine, a od 2005. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik. U istoj laboratoriji je uradila i magistarski rad, a magistarsku tezu pod naslovom: “Konstrukcija mobilizacionog sistema za transfer heterologih gena u bakterijama mlečne kiseline” odbranila je 16. novembra 2006. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Za magistarsku tezu je dobila nagradu fondacije „Goran Ljubijankić“. Od 2008. godine radi kao istraživač saradnik u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Ima 12 objavljenih radova u časopisima međunarodnog značaja, jedan rad u časopisu domaćeg značaja, kao i devet kongresnih saopštenja. Objavila je i jedan rad iz doktorske teze: Tolinacki, M., Kojic, M., Lozo, J., Terzic-Vidojevic, A., Topisirovic, L., Fira, D. 2010. Characterization of bacteriocin-producing strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGUB9. Arch. Biol. Sci. 62: 889-899. Tokom svog rada bila je uključena u tri nacionalna projekta kao i dva međunarodna projekta. Bila je na stručnom usavršavanju u Laboratoire d’Etude des Interactions des Molécules Alimentaires, Institut National de la Recherche Agronomique, Nant, Francuska, boravak je bio u okviru međuvladinog programa naučno-tehnološke saradnje između Republike Srbije i Francuske, „Pavle Savić“, 2010-2012. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije.

Изјава о ауторству

Потписани-а Маја С. Толиначки

број уписа _____

Изјављујем

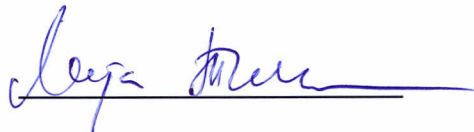
да је докторска дисертација под насловом

**Карактеризација површинских молекула бактеријских ћелија одговорних
за потенцијалну пробиотичку активност природних изолата лактобацила**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 23.04.2012. godine.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Маја Толиначки _____

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада **Карактеризација површинских молекула бактеријских
ћелија одговорних за потенцијалну пробиотичку активност природних
изолата лактобацила**

Ментори Редовни професор и научни саветник др Љубиша Тописировић

Ванредни професор др Ђорђе Фира

Потписани _____ Маја С. Толиначки _____

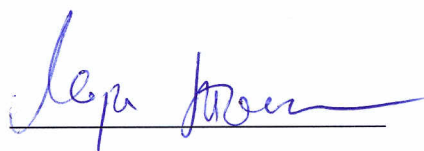
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 23.04.2012. godine.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеризација површинских молекула бактеријских ћелија одговорних за потенцијалну пробиотичку активност природних изолата лактобацила

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

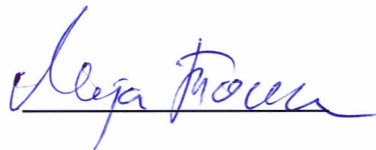
5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 23.04.2012. godine.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.