

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Nemanja L. Mirković

**KARAKTERIZACIJA I  
DETERMINACIJA BAKTERIOCINA  
AUTOHTONIH LAKTOKOKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Nemanja L. Mirković

**CHARACTERIZATION AND  
DETERMINATION OF BACTERIOCINS  
PRODUCED BY AUTOCHTHONOUS  
LACTOCOCCI**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

**Komisija za ocenu i odbranu:**

***Mentor:***

**dr Zorica Radulović**, vanredni profesor  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

***Članovi komisije:***

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

**dr Miomir Nikšić**, redovni profesor  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Jelena Lozo**, vanredni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Dragoslava Radin**, redovni profesor  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

***Datum odbrane doktorske disertacije*** \_\_\_\_\_

**Ovom prilikom bih želeo da se zahvalim:**

*Prof. dr Zorici Radulović, mom mentoru, koja me je uvela u svet nauke na bezgraničnom strpljenju i vremenu koje smo proveli diskutujući o rezultatima i budućim planovima, ali i velikoj slobodi u toku izrade ovog rada i bezgraničnoj podršci u kompletnom profesionalnom životu;*

*dr Milanu Kojiću, na znanju i eksperimentalnim iskustvima koje mi je preneo, na nesebičnom angažovanju u izradi i tumačenju rezultata, kao i na bezrezervnoj podršci i pruženoj šansi;*

*Prof. dr Jeleni Lozo, na najiskrenijoj pomoći od samog početka izrade teze, na trudu i vremenu, kao i na brojnim stručnim savetima i sugestijama;*

*Prof. dr Miomiru Nikšiću, na korisnim sugestijama tokom izrade i pisanja ove teze, kao i na kritičnoj oceni teze;*

*Prof. dr Dragoslavi Radin, na uloženom trudu tokom izrade i pisanja teze.*

*Prof. dr Nataliji Polović, na pomoći u eksperimentalnom radu i sugestijama tokom rešavanja svih problema iz oblasti biohemije na koje sam nailazio tokom izrade i pisanja ove teze.*

*Prof. dr Dragojlu Obradoviću, za pomoć prilikom aplikacije i realizacije FEMS Research Fellowship, zahvaljujući kojoj sam proveo 3 meseca na ULS fakultetu Univerziteta u As, Norveška;*

*Svim kolegama iz Laboratorije za Molekularnu mikrobiologiju, na ogromnoj podršci, poverenju i kvalitetno provedenom vremenu, kako profesionalno, tako i privatno. Posebnu zahvalnost dugujem Branku i Jeleni, za inspiraciju, iskrenost, smeh, prijateljstvo, što su bili uz mene i u mojim dobrim a i lošim danima;*

*Kolegama sa Katedre za tehnološku mikrobiologiju. Naravno, veliko hvala i mojoj snaji i kolegatici Milici na svom trudu, radu, pomoći, priči, podršci i velikom prijateljstvu;*

*Posebnu želim da se zahvalim svojoj porodici za безусловnu podršku, razumevanje i ljubav koji su bili neophodni da se ovaj rad dovede do kraja.*

# KARAKTERIZACIJA I DETERMINACIJA BAKTERIOCINA AUTOHTONIH LAKTOKOKA

Doktorska disertacija

Nemanja Mirković

## **REZIME**

Bakterije mlečne kiseline (BMK), sintetišu veliki broj antimikrobnih jedinjenja, među kojima značajno mesto zauzimaju bakteriocini. Bakteriocini, s obzirom na GRAS (Generalno Prepoznati Kao Sigurni) status koje imaju BMK, mogu se primenjivati kao konzervansi hrane, ali i u farmaceutskoj industriji kao alternativa ili dodatak antibiotskoj terapiji. Veliki broj vrsta roda *Lactococcus* sp., pored toga što zauzima ključnu ulogu u proizvodnji fermentisane hrane gde doprinose specifičnoj aromi i strukturi fermentisanih proizvoda, ima i sposobnost sinteze različitih bakteriocina. Bakteriocini su mali, ribozomalno sintetisani peptidi ili proteini koji imaju relativno uzak spektar antimikrobne aktivnosti koja je ograničena na blisko srodne vrste i prema kojoj soj proizvođač ima mehanizam specifične samozaštite.

Cilj ove teze, bio je da se odaberu prirodni izolati laktokoka koji imaju sposobnost produkcije bakteriocina. Zatim, da se odabrani bakteriocini okarakterišu, da se utvrdi njihov antimikrobni potencijal i analizira potencijalna primena u prehrambenoj industriji.

Sojevi *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50, LMG2081 i BGBU1-4, čiji su bakteriocini analizirani u ovom radu, determinisani su korišćenjem klasičnih mikrobiološko-biohemijskih metoda, kao i metoda molekularne determinacije (sekvenciranjem gena za 16S rRNK).

Testiranje laktokoka na sposobnost produkcije bakteriocina, urađeno je primenom bakteriocinskih testova sa senzitivnim sojem laktokoka, laktobacila i patogenih bakterija kao indikatorima. Determinacija bakteriocina je određena testovima unakrsne inhibicije između sojeva bakteriocin proizvođača, korišćenjem PCR metoda sa specifičnim prajmerima za gene koji kodiraju različite bakteriocine i analizom sekvence genoma.

Utvrđeno je da soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 sintetiše bakteriocin, prvo nazvan BacBM50. Metodom čišćenja plazmida, ustanovljeno je da se genetički elementi za sintezu bakteriocina nalaze na velikom plazmidu od 145,5 kb. Korišćenjem specifičnih prajmera za veliki broj bakteriocina, pokazano je da soj BGBM50 sintetiše bakteriocin laktokokcin G. Utvrđeno je da je bakteriocin, ovog soja, termostabilan, aktivan u širokom opsegu pH vrednosti, osetljiv na proteolitičke enzime i ima uzak spektar delovanja.

Unakrsnim bakteriocinskim testovima sojeva *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 i LMG2081(laktokokcin G producent), ustanovljeno je da soj LMG2081 inhibira rast soja BGBM50. Uporednom analizom genoma sojeva BGBM50 i LMG2081, utvrđeno je da oba soja poseduju kompletan operon za sintezu laktokokcina G. Konstrukcijom „knock out“ mutanata, utvrđeno je da soj LMG2081 poseduje operon (lctLMG) koji kodira sintezu još jednog bakteriocina. Metodom inverznog PCR i analizom genoma, utvrđeno je da se operon lctLMG nalazi na fragmentu od 8 kb, čijom daljom analizom je ustanovljeno je da se sastoji od gena, nazvani *lmgA*, *lmgM*, *lmgT*, *lmgF*, *lmgE*, *lmgG*, koji su odgovorni za sintezu, eksport i imunost na bakteriocin lakticin LMG. Posle pričišćavanja bakteriocina, korišćenjem RP-HPLC i analizom mase, korišćenjem MS/HPLC, utvrđeno je da je molekulska masa bakteriocina lakticin LMG iznosila 2759 Da. Kao i slučaju laktokokcina G, bakteriocin lakticin LMG je termostabilan, sa aktivnošću u širokom opsegu delovanja pH vrednosti, osetljiv na delovanje proteolitičkih enzima i uskog spektra delovanja. Bakteriocin lakticin LMG pripada Klasi I bakteriocina i pokazuje najviše sličnosti sa bakteriocinima lakticin-481 grupe.

Kombinacijom metoda „Pulse Field Gel Electrophoresis“ (PFGE) i „Southern blot hibridizacije“, pokazano je da se genetički materijal za sintezu bakteriocina lakticin LMG nalazi na plazmidu od 115 kb, a genetički materijal za sintezu bakteriocina laktokokcin G na hromozomu.

Ispitivanjem antimikrobnog delovanja soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4, ustanovljeno je da ima sposobnost inhibicije laktokoka, laktobacila i *Listeria monocytogenes*. Metodom čišćenja plazmida, pokazano je da ovaj soj sintetiše najmanje dva bakteriocina i da su genetički elementi za sintezu bakteriocina smešteni na plazmidima. Jedan od ta dva bakteriocina, koji je pokazivao antilisterijski efekat,

nazvan laktolisterin BU1-4, je termostabilan, osetljiv na delovanje proteolitičkih enzima i aktivan u širokom opsegu pH vrednosti.

Bakteriocin laktolisterin BU1-4, testiran je na delovanje *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u model sistemu proizvodnje sira, pri čemu je kao pozitivna kontrola korišćen bakteriocin nizin, a kao negativna kontrola preparat očišćenog derivata soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 (BGBU1-4/29I Bak<sup>-</sup>, Bak<sup>s</sup>). Bacteriocini laktolisterin BU1-4 i nizin su pokazali bakteriostatički efekat na *L. monocytogenes* ATCC19111 u proizvodnji model sistema sira.

U ovom radu, pokazano je da sirevi, proizvedeni na tradicionalan način, mogu biti bogat izvor prirodnih izolata laktokoka sa sposobnošću da sintetišu bakteriocine. Njihovom determinacijom i karakterizacijom dobijaju se osnove za dalja istraživanja koja mogu biti usmerena na ispitivanje njihovog mehanizma delovanja na senzitivne ćelije, kao i na ispitivanje njihove primene u prehrambenoj industriji u kontroli patogenih mikroorganizama.

*Ključne reči: bakteriocin, laktokokcin G, lakticin LMG, PCR, RP-HPLC, MS/HPLC, Listeria monocytogenes ATCC19111*

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Tehnološka mikrobiologija

**UDK:** 637.336 : 579.864 (043.3)

# CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF BACTERIOCINS PRODUCED BY AUTOCHTHONOUS LACTOCOCCI

Doctoral Dissertation

Nemanja Mirković

## ***ABSTRACT***

Lactic acid bacteria (LAB), synthesized a number of different antimicrobial substances among which bacteriocins are the most important. Bacteriocins of LAB, with regard to the GRAS (Generally Recognized As Safe) status of LAB, can be used as food preservatives, but also in pharmaceutical industry as an alternative or supplement to antibiotic therapy. A large number of species of the genus *Lactococcus* sp., not only play a key role in the production of fermented food where they contribute to specific aroma and structure of fermented products, but also they have ability to synthesize different bacteriocins. Bacteriocins are small, ribosomally synthesized peptides or proteins with relatively narrow spectrum of antimicrobial activity which is limited to closely related species, and producer has specific mechanism of self-protection.

The aim of this thesis was to select natural isolates of lactococci which have ability to produce bacteriocins. Then, to characterize the selected bacteriocins, to determine their antimicrobial potential and analyze potential applications in the food industry.

The strains *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBM50, LMG2081 and BGBU1-4, whose bacteriocins were analyzed in this paper, were determined using conventional microbiological-biochemical tests and molecular methods of determination (sequencing of gene for 16S rRNA).

Testing ability of lactococci to produce bacteriocins, was performed using bacteriocin activity assay in which as sensitive strains were used lactococci, lactobacilli and pathogenic bacteria. Determinations of bacteriocins were performed using cross-resistance test between bacteriocin producer strains and by using PCR method with specific primers for the known genes coding for different bacteriocins.

It was found that the strain *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 synthesizes bacteriocin named BacBM50. Plasmid curing experiments showed that genes for bacteriocin production are located on the big plasmid of 145,5 kb. Using specific primers for a



large number of bacteriocins, it was shown that strain BGBM50 synthesizes bacteriocin lactococcin G. Moreover, it was found, that this bacteriocin is thermostable, active in wide range of pH values, sensitive on proteolytic enzymes and has narrow spectrum of activity.

Cross-resistance tests of strains BGBM50 and LMG2081 (lactococcin G producer), showed that strain LMG2081 inhibits growth of strain BGBM50. The comparative analysis of genomes of strains BGBM50 and LMG2081, showed that both strains possess complete operons for synthesis of lactococcin G. With construction of „knock-out“ mutants we found that strain LMG2081 possesses operon (lctLMG) which encoded synthesis of additional bacteriocin. After applying the inverse PCR and analyzing of complete genome, it was established that operon lctLMG contains six open reading frames (ORFs) named *lmgA*, *lmgM*, *lmgT*, *lmgF*, *lmgE*, *lmgG*, which are involved in the biosynthesis, export and immunity on lactocin LMG. After purification of bacteriocins using RP-HPLC and mass spectrometry analysis using MS / HPLC, it was found that the molecular weight of the bacteriocin lactocin LMG is 2759 Da. Lactocin LMG is thermostable, active in wide range of pH values, sensitive on proteolytic enzymes and has narrow spectrum of action. Bacteriocin lactocin LMG is classified in the Class I of bacteriocins and shows the most similarities with bacteriocins from lactocin 481 group.

By combination of methods Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Southern blot hybridization, was shown that genetic elements for production of lactocin LMG are located on plasmid of 115 kb, while genetic elements for production of lactococcin G are located on chromosome in LMG2081 strain.

The study of antimicrobial effect of *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4, showed that it has ability to inhibit growth of lactococci, lactobacilli and *Listeria monocytogenes*. Plasmid curing experiments showed that strain BGBU1-4 produces at least two bacteriocins and that all genetic elements for synthesis of bacteriocins are located on plasmids. Bacteriocin with antilisteria effect, named lactolisterin BU1-4, is thermostable, active in wide range of pH values, sensitive on proteolytic enzymes.

Activity of bacteriocin lactolisterin BU1-4 on *Listeria monocytogenes* was tested in cheese model system, bacteriocin nisin was used as positive control, while crude extract from plasmid cured derivative of strain *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4

(BGBU1-4/29I Bac<sup>-</sup>, Bac<sup>s</sup>) was used as a negative control. Bacteriocins lactolisterin BU1-4 and nisin showed bacteriostatic effect on *L. monocytogenes* ATCC19111 in cheese model system.

In this work, it was shown that cheeses produced in the traditional way, could be a rich source of natural isolates of lactococci with the ability to synthesize bacteriocins. Their determination and characterization provides a basis for further research that could be focused on testing their mechanism of action on sensitive cells, as well as the examination of their application in the food industry in the control of pathogenic microorganisms.

*Key words: bacteriocin, lactococcin G, lacticin LMG, PCR, RP-HPLC, MS/HPLC, Listeria monocytogenes ATCC19111*

**Academic Expertise:** Biotechnology

**Field of Academic Expertise:** Food and Industrial Microbiology

**UDK:** 637.336 : 579.864 (043.3)

## SKRAĆENICE

BLAST - Basic Local Alignment Search Tools

BMK - bakterije mlečne kiseline

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

GRAS - Generally Regarded As Safe

man-PTS – manozna-fosfotransferazni sistem

MOPS – 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid

MRSA – meticilin rezistentne *Staphylococcus aureus*

NaPi – Natrijum fosfatni pufer

OD – Optimal Density

ORF – Open Reading Frame

PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis

PMSF – phenylmethanesulfonylfluoride

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

VRE – vankomicin rezistentne enterokoke

X-gal - 5-bromo-4-hloro-3-indolil-b-d-galaktopiranozid

RP-HPLC – Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography

MS – masena spektrometrija

LMM – Laboratorija za Molekularnu Mikrobiologiju

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	5
2.1 Bakterije mlečne kiseline – opšte karakteristike .....	6
2.1.1 Rod <i>Lactococcus</i> sp. ....	6
2.1.2. Genetičke karakteristike laktokoka.....	10
2.2 Antimikrobna jedinjenja bakterija mlečne kiseline.....	11
2.3 Bakteriocini .....	13
2.3.1 Bakteriocini bakterija mlečne kiseline.....	14
2.3.2 Klasifikacija bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija.....	14
2.4. Bakteriocini Klase I.....	15
2.4.1. Modifikacije bakteriocina Klase I.....	17
2.4.2 Imunost bakteriocina Klase I.....	18
2.4.3. Transport bakteriocina klase I.....	19
2.4.4. Mehanizam delovanja bakteriocina klase I.....	19
2.5. Bakteriocini II klase .....	21
2.5.1. Imunost bakteriocina II klase.....	23
2.5.2. Transport bakteriocina klase II .....	23
2.6. Bakteriolizini .....	24
2.7. Izolacija i prečišćavanje bakteriocina.....	25
2.8. Primena bakteriocina .....	26
2.8.1. Bakteriocini i antibiotici .....	26
2.8.2. Primena bakteriocina u industriji hrane .....	27
2.9. Antilisterijski efekat bakteriocina.....	29
3. CILJEVI RADA.....	32
4. MATERIJAL I METODE.....	34
4.1. Medijumi korišćeni za kultivisanje i izolaciju bakterija .....	35
4.2. Izolacija i determinacija laktokoka.....	35
4.3. Bakterijski sojevi.....	37
4.4. Plazmidi.....	42
4.5. Metode rada sa bakteriocinima.....	42

4.5.1. Bakteriocinska aktivnost laktokoka .....	42
4.5.2. Čišćenje plazmida iz laktokoka .....	43
4.5.3. Ispitivanje biohemijskih karakteristika bakteriocina .....	43
4.5.3.1. Testiranje uticaja različitih temperatura na stabilnost bakteriocinskog preparata .....	44
4.5.3.2. Ispitivanje različitih pH vrednosti na stabilnost bakteriocinskih preparata .....	44
4.5.3.3. Efekat delovanja različitih enzima na bakteriocinske preparate .....	44
4.6. Metode izolacije DNK.....	45
4.6.1. Izolacija totalne DNK iz laktokoka .....	45
4.6.2. Izolacija plazmidne DNK iz laktokoka.....	46
4.6.3. Izolacija plazmidne DNK iz <i>Escherichia coli</i> (DH5 $\alpha$ i EC101).....	46
4.7. Sekvenciranje genoma <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBM50 i LMG2081 ....	47
4.8. Enzimske reakcije sa DNK.....	47
4.8.1. Umožavanje DNK fragmenata – PCR („polymerase chain reaction“).....	47
4.8.2. Digestija i ligacija DNK .....	49
4.9. Transformacija ćelija sa DNK .....	50
4.9.1. Transformacija <i>Escherichia coli</i> .....	50
4.9.2. Transformacija laktokoka .....	51
4.10. Konstrukcija „knock-out“ mutanata soja <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LMG2081 .....	52
4.11. Elektroforeza i elucija DNK.....	52
4.11.1. Horizontalna elektroforeza na agaroznom gelu .....	52
4.11.2. Elektroforeza u pulsirajućem električnom polju („Pulsed Field Gel Electrophoresis“ - PFGE) .....	53
4.11.3. Elucija DNK fragmenata .....	54
4.12. DNK-DNK hibridizacija („Southern blot“).....	54
4.12.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane .....	54
4.12.2. Obeležavanje probe sa dioksigenin-dUTP-om .....	55
4.12.3. Neradiokativna DNK/DNK hibridizacija .....	56
4.13. Prečišćavanje i masena spektrometrija bakteriocina lakticin LMG .....	56
4.13.1. Prečišćavanje bakteriocina lakticin LMG .....	56
4.13.2. Masena spektrometrija .....	57

4.14. Antilisterijsko ispitivanje bakteriocina soja <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBU1-4.....	57
4.14.1 Priprema bakteriocinskog preparata .....	58
4.14.2. Dejstvo bakteriocinskog preparata soja <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBU1-4 na rast <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111 u bujonu.....	58
4.14.3. Dejstvo bakteriocinskog preparata soja <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBU1-4 na rast <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111 u model sistemu proizvodnje sira.....	59
5. REZULTATI.....	60
5.1. Izolacija i determinacija laktokoka.....	61
5.1.2. Morfološke i fiziološke karakteristike odbranih izolata .....	62
5.1.3. Identifikacija odabranih izolata laktokoka.....	62
5.2. Karakterizacija bakteriocina ispitivanih sojeva.....	63
5.2.1. Karakterizacija bakteriocina soja <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBM50..	64
5.2.1.1. Lokalizacija gena za sintezu bakteriocina BacBM50 .....	65
5.2.1.2. Biohemijska karakterizacija bakteriocina BacBM50.....	67
5.2.1.3. Antimikrobni spektar delovanja bakteriocina BacBM50.....	70
5.2.1.4. Ispitivanje prisustva specifičnih gena za sintezu bakteriocina PCR metodom u soju <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBM50 .....	72
5.2.2. Karakterizacija bakteriocina soja <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LMG2081	73
5.2.2.1. Uporedna analiza sekvence genoma sojeva <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LMG2081 i BGBM50 .....	74
5.2.2.2. Inverzni PCR.....	74
5.2.2.3. Kompjuterska analiza sekvence operona lctLMG .....	75
5.2.2.4. Konstrukcija „knock-out“ mutanata soja <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LMG2081 .....	78
5.2.2.5. Lokalizacija gena za sintezu bakteriocina lakticina LMG i laktokokcin G u soju <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LMG2081 .....	79
5.2.2.6. Prečišćavanje i masena spektrometrija bakteriocina lakticin LMG.....	80
5.2.2.7. Biohemijska karakterizacija bakteriocin lakticin LMG .....	83
5.2.3. Karakterizacija bakteriocina soja <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBU1-4.	86
5.2.3.1. Lokalizacija gena za sintezu bakteriocina soja <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBU1-4.....	88
5.2.3.2. Biohemijska karakterizacija bakteriocina laktolisterin BU1-4 .....	91

5.2.3.3. Antilisterijsko ispitivanje bakteriocina laktolisterin BU1-4 .....	93
5.2.3.3.1. Rast <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111 u prisustvu bakteriocinskog preparata laktolisterin BU1-4 u GM17 bujonu .....	93
5.2.3.3.2. Rast <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111 u prisustvu bakteriocinskog preparata laktolisterin BU1-4 u modelu sira .....	96
6. DISKUSIJA .....	100
6.1. Bakteriocin BacBM50 .....	102
6.2. Bakteriocin lakticin LMG .....	105
6.3. Bakteriocin laktolisterin BU1-4 .....	109
7. ZAKLJUČCI .....	112
8. LITERATURA .....	116

## **1. UVOD**



Bakterije mlečne kiseline (BMK) su heterogena grupa Gram-pozitivnih, asporogenih, katalaza negativnih, fakultativno anaerobnih ili anaerobnih mikroorganizama. BMK su veoma rasprostranjene u prirodi i zahvaljujući njihovim osobinama, mogu naseljavati različite ekološke niše. Kao glavni proizvod metabolizma, fermentacijom šećera, BMK proizvode mlečnu kiselinu. Prema putevima i krajnjim proizvodima fermentacije šećera, mogu se podeliti na homo- i heterofermentativne. Kod homofermentativnih BMK, krajnji proizvod fermentacije šećera je mlečna kiselina, dok se kod heterofermentativnih BMK kao proizvodi fermentacije, pored mlečne kiseline, pojavljuju i sirćetna kiselina, etanol, ugljen dioksid i drugo. Zahvaljujući specifičnom metabolizmu, BMK imaju neprocenjivu ulogu u proizvodnji mlečnih i mesnih fermentisanih proizvoda, zatim u pekarstvu, proizvodnji kiselog povrća i silaže. Najznačajniji i najbolje proučeni rodovi ove grupe bakterija su: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* i *Carnobacterium*.

Neki od produkata BMK, kao što su mlečna kiselina, ugljen dioksid, vodonik peroksid, diacetil, masne kiseline i organske mogu imati inhibitorni efekat na okolne bakterije (Lindgren i Bobrogosz, 1990). Mnoge BMK, imaju sposobnost sinteze antimikrobnih jedinjenja proteinske prirode, koja se zovu bakteriocini. Bakteriocini su definisani kao mali, ribozomalno sintetisani peptidi ili proteini, koji najčešće ispoljavaju uzak spektar antimikrobnog delovanja ograničen na srodne bakterije, a prema kojima soj proizvođač poseduje specifičan mehanizam samozaštite (Jack et al., 1995; Cotter et al., 2005).

Bakteriocini BMK se grubo mogu podeliti na dve klase: Klasa I – modifikovani bakteriocini; Klasa II – nemodifikovani bakteriocini.

Bakteriocini Klase I poseduju atipične aminokiseline, kao što je lantionin i dehidrirane aminokiseline, koje se javljaju kao rezultat posttranslacionih modifikacija serina i treonina. Klasi I pripadaju bakteriocini koji nose zajednički naziv lantibiotici. Lantibiotici se dele na četiri podklase, od kojih poklasa I i podklasa II najzastupljenije i najviše istražene. Lantibiotici podklase I formiraju strukturu dugačkog lanca i predstavnik im je nizin, dok lantibiotici podklase II formiraju strukturu dugačkog »repa« i »prstena«, predstavnici su lakticin 481, nukacin ISK-1 i drugi.

Bakteriocini Klase II su nemodifikovani peptidi ili peptidi sa jako malim modifikacijama (kao što je formiranje disulfidnih mostova ili ciklizacija). Klasa II bakteriocina podeljena je na četiri podklase: pediocinu-slični bakteriocini (podklasa IIa); dvopeptidni bakteriocini (podklasa IIb); ciklični bakteriocini (podklasa IIc); linearni bakteriocini koji ne liče na pediocinu-slične bakteriocine (podklasa IId) (Rea et al., 2011).

Bakterijske vrste roda *Lactococcus* sp., su kao i ostale BMK široko rasprostranjene u prirodi. U tradicionalno proizvedenim sirevima, nestarterske laktokoke su veoma zastupljene i imaju važnu ulogu formiranju specifičnog ukusa, mirisa i teksture sira. Iz tog razloga, ovi sirevi predstavljaju rezervoar prirodnih izolata laktokoka, koje mogu biti izvor novih, do sada neokarakterisanih, bakteriocina sa različitim spektrom delovanja.

Neki bakteriocini izolovani iz laktokoka, mogu ispoljiti i delovanje na različite patogene koji se mogu naći u hrani, kao što su *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tyrobutyricum* (Galvez et al., 2008). S obzirom na svoju specifičnost delovanja, kao i činjenicu da BMK imaju GRAS (Generally Recognized As Safe) status, veliki broj istraživanja je usmeren na korišćenje sojeva, bakteriocin-proizvođača, kao protektivnih kultura, ali i na testiranja samih bakteriocina kao prirodnih konzervanasa (de Vuyst i Leroy, 2007).

Jedan od najvećih problema sirarske proizvodnje predstavlja *L. monocytogenes*, koji je poznat kao oportunistički patogen koji izaziva listeriozu. *L. monocytogenes* pokazuje sposobnost rasta na niskim temperaturama (4°C), toleriše niske pH vrednost (<5.0) sredine i visoke koncentracije NaCl (do 10%) (Farber i Peterkin, 1991). S obzirom na osobine i sposobnost preživljavanja nepovoljnih uslova, može se naći u različitim vrstama sireva, kao što su sirevi sa dugim zrenjem, meki sirevi, kamember, zatim u sirevima od ultrafiltriranog mleka u salamuri (Ryser, 1985; Morgan et al., 2001; Back et al., 1993). Do sada je okarakterisan veliki broj bakteriocina koji imaju antilisterijski efekat. Neki od njih, kao što su nizin, pediocin AcH/PA-1, lakticin 3147, enterocini su pokazali izuzetne rezultate u kontroli *L. monocytogenes* tokom proizvodnje sira (Dal Bello et al., 2012; Pingitore et al., 2012). Međutim i pored toga, uvek postoji težnja za otkrivanjem novih bakteriocina koji će pokazivati drugačiji mehanizam ili širi spektar inhibitornog delovanja.

U ovom radu je ispitan veliki broj prirodnih izolata laktokoka na sposobnost sinteze bakteriocina. Laktokoke su izolovane iz tradicionalnih sireva i različitog voća na teritoriji Srbije. Na osnovu aktivnosti i spektra delovanja, odabrani i okarakterisani su bakteriocini tri prirodna izolata koji pripadaju vrsti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

## **2. PREGLED LITERATURE**

## 2.1 Bakterije mlečne kiseline – opšte karakteristike

Kada je reč o opštim karakteristikama bakterija mlečne kiseline (BMK), najbitnije je reći da su Gram-pozitivne, asporogene, katalaza negativne, bez citohroma, a da kao glavni produkt fermentativnog metabolizma proizvode mlečnu kiselinu. U zavisnosti od metabolizma, BMK se mogu podeliti na one kojima je krajnji produkt metabolizma mlečna kiselina (homofermentativne) i one koje pored mlečne kiseline proizvode i druge proizvode fermentacije (heterofermentativne) (Klerrebezem and Hugenholtz, 2003). BMK su anaerobne i fakultativno anaerobne bakterije, što im omogućava da naseljavaju različite ekološke niše (Michaela et al., 2009). Obično se nalaze u hrani, najčešće u mleku, mesu, voću, povrću, žitaricama, u fermentisanim proizvodima. Svojim metaboličkim aktivnostima tokom procesa fermentacije, BMK snižavaju pH vrednost sredine, što može imati značajnu ulogu u sprečavanju rasta patogenih bakterija. Pored mlečne kiseline i ostalih komponentni koje mogu nastati kao proizvodi homofermentativnog ili heterofermentativnog metabolizma, neke BMK proizvode antimikrobne komponente neproteinske prirode: organske kiseline (Earnshaw, 1992), diacetil i acetaldehid (Jay, 1982), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kandler i Weiss, 1986), masne kiseline (Sanz et al., 1988), piroglutaminska kiselina (Huttunen et al., 1995), rojterin (Axelsson et al., 1989); kao i komponente proteinske prirode, bakteriocine. Spekter delovanja bakteriocina je najčešće usmeren na srodne vrste bakterija ali mogu delovati i na različite vrste patogenih bakterija. BMK su široko rasprostranjena grupa bakterija, pored toga što su prisutne u hrani, prisutne su i u usnoj duplji, gastrointestinalnom traktu i urogenitalnom traktu čoveka. Veliki značaj ove grupe bakterija, kako sa fundamentalnog tako i sa aplikativnog stanovišta, doveo je do ekspanzije u proučavanju njihovih karakteristika. Najznačajniji i najbolje proučeni rodovi ove grupe bakterija su: *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp. i *Carnobacterium* sp.

### 2.1.1 Rod *Lactococcus* sp.

Bakterije mlečne kiseline koje pripadaju rodu *Lactococcus* sp. su najčešće okruglastog ili ovalnog oblika, javljaju se pojedinačno, u parovima ili u lancima, često izdužene u pravcu lanca. Pripadaju grupi fakultativno anaerobnih bakterija, katalaza

negativne, nepokretne i nisu  $\beta$ -hemolitične. Optimalna temperatura za rast im je 30°C, a mogu da rastu na temperaturi od 10°C. Što se tiče tolerancije prema NaCl, dolazi do odstupanja u odnosu na neke sojeve, generalno sve vrste ovog roda obično rastu u prisustvu 4% NaCl. Njihov metabolizam je fermentativan, a glavni produkt fermentacije glukoze je L(+)-mlečna kiselina. Većina sojeva ovog roda reaguju sa N-grupom antitela, što ih svrstava u serološku grupu N (Schleifer et al., 1985).

Poslednjih godina došlo je do velike ekspanzije u razvoju molekularno bioloških metoda za indentifikaciju i klasifikaciju bakterija koje su u velikoj meri povećale tačnost i kvalitet identifikacije. Za molekularno biološke metode kao što su DNK-DNK hibridizacija, PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) je pokazano da su korisne za identifikaciju bakterija do nivoa vrste. Umnožavanjem gena za 16S rRNK pomoću PCR-a, sekvenciranje dobijenog proizvoda i pretraživanje baze podataka još uvek je najčešći način za identifikaciju bakterijskog soja do nivoa vrste. Ova metoda se i dalje smatra najpreciznijom u identifikaciji bakterija, iako i ona ponekad nije potpuno diskriminativna kada je u pitanju razlikovanje sojeva laktokoka. Poslednjih godina je broj potpuno sekvenciranih bakterijskih genoma u porastu, što omogućava kompletnu taksonomsku i funkcionalnu analizu. Na osnovu sekvence za 16S rRNK, rod *Lactococcus* pripada porodici *Streptococcaceae*, zajedno sa *Streptococcus* i *Lactovum*, u red *Lactobacillales* (Stackebrandt i Teuber, 1988). U okviru roda *Lactococcus*, do nedavno je bilo okarakterisano samo pet vrsta: *Lactococcus lactis* (uključujući i podvrste *cremoris*, *lactis* i *hordinae*), *Lactococcus garviae*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus piscium* i *Lactococcus raffinolactis* (Kilpper-Balz et al., 1982), ali u poslednjih desetak godina okarakterisane su još dve vrste *Lactococcus chungangensis* (Cho et al., 2008) i *Lactococcus fujiensis* (Cai, 2010). Laktokoke se mogu naći na biljnom materijalu (voću, povrću), u mleku i drugim životinjskim proizvodima, u čovečijem gastrointestinalnom traktu, zemljištu i drugo (Kubota et al., 2010). U Tabeli 1., prikazane su neke osnovne karakteristike i međusobne razlike svih sedam vrsta roda *Lactococcus* sp.

**Tabela 1.** Karakteristike vrsta roda *Lactococcus* sp. (Atte von Wright, 2011)

	<i>L. lactis</i>	<i>L. garviae</i>	<i>L. piscium</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. raffinolactis</i>	<i>L. chungangensis</i>	<i>L. fujiensis</i>
Rast na 4°C	-	-	+	-	-	+	Ne
Rast na 40°C	Neki sojevi	+	-	-	-	-	+
Rast na 4% NaCl	+	Neki sojevi	Ne	+	-	-	-
Fermentacija laktoze	+	+	+	-	-	-	-
Fermentacija manitola	-	Neki sojevi	+	+	Ne	Ne	+
Fermentacija rafinoze	-	-	+	-	+	-	Ne
Fermentacija skroba	±	-	-	-	±	Ne	+
Hidroliza askulina	-	+	+	+	-	+	Ne

+ = konstatovan rast; - = nije konstatovan rast; ± = konstatovan slab rast

Zbog široke rasprostranjenosti u prirodi, kao i čestog korišćenja u industriji mleka i fermentisanih mlečnih proizvoda, najviše pažnje posvećeno je izučavanju vrste *Lactococcus lactis*. Razlikuju se dve podvrste *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* i *L. lactis* ssp. *cremoris*, koje se često koriste u kao starter kulture proizvodnji različitih fermentisanih proizvoda od mleka. Pored ove dve podvrste, izdvaja se *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, koji je fenotipski vrlo sličan *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, a kao jedina razlika izdvaja se njegova sposobnost korišćenja citrata kao izvora ugljenika, iz kog sintetiše diacetil i CO<sub>2</sub>. Zbog te osobine, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* često ulazi u sastav starter kultura za proizvodnju pavlake, maslaca i nekih vrsta sireva. S obzirom da se geni odgovorni za korišćenje citrata kao izvora ugljenika nalaze na plazmidu, ta osobina je varijabilna, pa se *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ne može posmatrati kao posebna podvrsta već se navodi kao biovarijetet podvrste *L. lactis* ssp. *lactis*. Tradicionalno, *L. lactis* ssp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris* se mogu razlikovati na osnovu fenotipskih karakteristika: *L. lactis* ssp. *lactis* proizvodi amonijak iz arginina i može da raste na 40°C, u prisustvu NaCl u koncentraciji od 4%, mogućnost, dok *L. lactis* ssp. *cremoris* ne poseduje navedene sposobnosti. Međutim, korišćenjem metode DNK-DNK hibridizacije, pokazano je da može doći do grešaka prilikom razdvajanja ove dve podvrste. Takođe, nova istraživanja ukazuju da neki sojevi podvrste *L. lactis* ssp. *cremoris* imaju sposobnost hidrolize arginina, mogućnost rasta na 39,5°C, kao i sposobnost preživljavanja koncentracija soli od 4% (Salama et al., 1995). Kao jedno od objašnjenja za ove promene, može biti razmena genetičkog materijala između ćelija bakterija ove dve podvrste putem konjugacije ili transdukcijom pomoću bakteriofaga, ali postoji i mogućnost da je došlo do transformacije DNK nakon autolize. Kao drugo objašnjenje može biti i indukovana tolerantnost na nepovoljne uslove sredine, kao što je kisela sredina (izlaganje ćelija sniženoj pH vrednosti). Kao odgovor ćelije na sniženu pH vrednost, povlači i povećanu tolerantnost na druge nepovoljne uslove kao što su povišena temperature, koncentracija NaCl, etanola i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (O'Sullivan i Condon, 1997).



### 2.1.2. Genetičke karakteristike laktokoka

**Plazmidi** - Jedna od karakteristika sojeva koji pripadaju ovom rodu je da mogu da poseduju plazmide (različit broj plazmida, različitih veličina), a mnogi od njih imaju veoma važne uloge prilikom korišćenja laktokoka u prehrambenoj industriji. Proučavanju plazmida kod laktokoka posvećena je velika pažnja još od izolovanja i okarakterisanja prve laktokoke. Gotovo sve pozitivne osobine koje ispoljavaju laktokoke, a bitne su prilikom njihovog korišćenja kao startera u prehrambenoj industriji, kodirane su na genima koji se nalaze na plazmidima. Neke od osnovnih osobina laktokoka je mehanizam fermentacije laktoze, kao i aktivnost njihovih proteinaza. Oba ova sistema su skoro uvek povezani sa velikim plazmidima (od 17 kb do 50 kb) (McKay, 1983).

Neki sojevi laktokoka imaju mogućnost produkcije ekstraćelijskih polisaharida, i one se tradicionalno koriste za proizvodnju određenih tipova Skandinavskog fermentisanog mleka (Macura i Townsley, 1984). Operon koji se sastoji od 14 gena koji omogućavaju ovu specifičnu sposobnost laktokoka, nalazi se na plazmidima.

Takođe, još jedna od bitnih karakteristika laktokoka je mogućnost produkovanja bakteriocina. Kako su bakteriocini, jednostavnije, bakterijski proteini ili peptidi koji inhibiraju rast drugih bakterijskih vrsta ili sojeva, ova osobina omogućava korišćenje laktokoka kao protektivnih kultura u proizvodnji prehrambenih proizvoda. Geni za sintezu bakteriocina kod laktokoka, mogu biti locirani, kako na hromozomu (Diep et al., 1996; Jimenez-Diaz et al., 1995), tako i na plazmidima (Qadri et al., 1995; Kanatani et al., 1995; Gajic et al., 1999)

Veoma važna sposobnost laktokoka da razviju rezistenciju na bakteriofage je takođe povezana sa plazmidima, što je od velikog značaja kad je u pitanju primena laktokoka u industriji mleka. Do sada su poznata tri mehanizma rezistencije na bakteriofage: inhibicija adsorpcije faga, restrikciono-modifikacioni (R/M) sistemi i inhibicija razvijanja faga. Do sada je pronađeno deset plazmida koji kodiraju ove mehanizme (Hill, 1993; Daly et al., 1996; Chopin et al., 2005).

**Sekvenca genoma laktokoka** - Do danas su sekvencirani genomi velikog broja laktokoka (*L. lactis* ssp. *lactis* IL1403, *L. lactis* ssp. *cremoris* SK11, *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, *L. lactis* ssp. *lactis* KF147 i drugi). Ono što je primećeno kao

glavna karakteristika laktokoka je posedovanje velikog broja insercionih sekvenci (IS elemenata) i transpozona (Bolotin et al., 2001). Ova karakteristika laktokoka ukazuje na njihove česte promene, u zavisnosti od sredine u kojoj se nalaze. Na primer, soj *L. lactis* ssp. *lactis* KF147 je izolovan iz biljnog materijala, i u njemu je detektovano nekoliko gena koji kodiraju enzime za degradaciju ksilana, fruktana, glukana, koji su mu neophodni za normalno funkcionisanje na biljnom materijalu. Kako ovi geni nisu nađeni u laktokokama koje su izolovane iz sireva ili drugih sredina, to ukazuje na mogućnost adaptacije laktokoka na specifičnu ekološku nišu (Siezen et al., 2010).

**Genetske modifikacije laktokoka** - Kako su *in vitro* metode transformacije i veliki broj vektora za kloniranje dostupni još od ranih 80-ih godina, tehnike rekombinacije DNK su postale standardan alat za molekularnu karakterizaciju laktokoka. Međutim, iako je veliki broj sistema (rezistencija na bakteriocine, metabolizam šećera, rezistencija na kadmijum i mnogi drugi) do sada kloniran, genetski modifikovane laktokoke nisu korišćene u proizvodnjih hrane (Mills et al., 2006). Njihova upotreba za produkciju terapijskih proteina i oralnih vakcina, može biti vrlo obećavajuća opcija.

## 2.2 Antimikrobna jedinjenja bakterija mlečne kiseline

U proizvodnji fermentisanih proizvoda od mleka, mesa, zatim u proizvodnji kiselog povrća, silaže, BMK imaju ključnu ulogu. Tokom fermentacije, njihova osnovna metabolička funkcija utiče na kvalitet i trajnost proizvoda. Naime, snižavanje pH sredine, nagomilavanjem organskih kiselina kao posledica metabolizma BMK, može imati ulogu u konzervisanju hrane. Pored organskih kiselina, BMK mogu putem homofermentativnog i heterofermentativnog metabolizma sintetisati i druga jedinjenja, kao što su: ugljen dioksid, sirćetna kiselina, mravlja kiselina, etanol (Kleerebezem and Hugenholtz, 2003). Osim toga, ne tako mali broj BMK ima sposobnost produkcije inhibitornih supstanci proteinske prirode koje se nazivaju bakteriocini, čija je antimikrobna aktivnost najčešće usmerena prema srodnim vrstama bakterija, kako prema BMK tako i prema Gram-pozitivnim bakterijama koje uzrokuju kvarenje hrane i patogene bakterije prisutne u hrani kao što su *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Clostridium* sp., *Listeria* sp i druge.

**Organske kiseline** – koje nastaju tokom fermentacije zavise od vrste BMK, medijuma za rast (različiti šećeri, aminokiseline), prisustva kiseonika (Kandler and Weiss, 1986). Primarna inhibitorna aktivnost BMK leži u snižavanju pH vrednosti usled sinteze organskih kiselina, kao i u aktivnosti nedisosovane forme organske kiseline (Gould, 1991; Podolak et al., 1996). Pored BMK, ne postoji veliki broj bakterija koje mogu preživljavati i razmnožavati se na niskim pH vrednostima sredine. Nizak pH utiče na održavanje membranskog potencijala ćelije, inhibira aktivni transport, smanjuje intracelularni pH i inhibira različite metaboličke funkcije (Ouwehand, 1998). Pojedine organske kiseline, kao što su sirćetna i propionska kiselina, ispoljavaju mnogo bolju sposobnost inhibicije kvasaca i plesni nego što to ima mlečna kiselina. Pretpostavlja se da je procenat sirćetne i propionske kiseline na niskim pH vrednostima znatno veći u nedisosovanom obliku nego što je to slučaj sa mlečnom kiselinom.

**Diacetil** je antimikrobno jedinjenje koje može biti sintetisano tokom metabolizma pojedinih sojeva koji pripadaju rodovima *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Streptococcus* sp. Diacetil deluje na Gram-negativne bakterije tako što interferira sa arginin-vezujućim proteinima i na taj način onemogućava iskorišćenost arginina (Jay, 1986). Takođe može delovati i sinergistički u kombinaciji sa drugim jedinjenjima čime doprinosi očuvanju fermentisanih proizvoda.

U metabolizmu heterofermentativnih BMK, pored organskih kiselina može nastati i **ugljen dioksid (CO<sub>2</sub>)**. Sposobnost inhibicije mikroorganizama zasniva se na zameni prisutnog kiseonika. Ugljen dioksid ima antifungalni efekat, međutim taj mehanizam delovanja nije do sad razjašnjen. Postoje dve teorije, po prvoj CO<sub>2</sub> dovodi do inhibicije dekarboksilacije, a po drugoj teoriji CO<sub>2</sub> se akumulira u dvosloju membrane ciljnih ćelija i dovodi do promene njene propustljivosti (Ouwehand, 1998).

Kod nekih BMK u prisustvu kiseonika, uz pomoć nekih od enzima (flavinskih oksidaza, NADH oksidaza ili superoksid dismutase), nastaje **vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**. BMK ga sintetišu tokom rasta, a kako ne poseduju katalazu kojom bi redukovali H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, on se nakuplja u medijumu i samim tim je omogućen antimikrobni efekat. Sam mehanizam antimikrobnog delovanja vodonik peroksida je poznat i nastaje usled snažnog oksidujućeg efekta na bakterijske ćelije, destrukcije osnovnih molekularnih struktura, ćelijskih proteina i membranskih lipida (Ouwehand, 1998).

Pojedini sojevi koji pripadaju rodu *Lactobacillus* i *Lactococcus*, pod određenim uslovima mogu da proizvedu značajne količine **masnih kiselina** tj. pokazuju lipolitičku aktivnost (Rao i Reddy, 1984; Sanz et al., 1988). Nezasićene masne kiseline deluju inhibitorno na Gram-pozitivne bakterije, a njihova antifungalna aktivnost zavisi od dužine lanca, koncentracije i pH medijuma (Gould, 1991).

## 2.3 Bakteriocini

Termin *bakteriocini* prvi put je predložen od strane Tagg i sar. (1976), i definisani su kao proteinska jedinjenja sposobna da inhibiraju rast bliskih bakterija, ili bakterija iste ekološke niše. Prvi podaci o bakteriocinima zabeleženi su u radu sa Gram-negativnim bakterijama, tačnije sa *Eshcherichia coli* i nazvani su *kolicini* (Gratia, 1925). Od tog perioda, bakteriocini su definisani na osnovu osobina kolicina koji su plazmidno kodirani, veliki proteini koji imaju bakteriocidni efekat kroz interakciju sa specifičnim receptorima i letalni su izazivajući SOS-inducibilnu biosintezu. Pored bakteriocina koji se uklapaju u ovu definiciju, veliki broj bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija odstupa od ove definicije. Osnovna razlika bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija i Gram-negativnih bakterija je u mehanizmu transporta bakteriocina iz bakterijske ćelije. Takođe, u Gram-pozitivnim bakterijama sinteza i ekspresija bakteriocina je pod regulacijom specifičnih gena, dok su bakteriocini Gram-negativnih bakterija pod uticajem ćelije domaćina (Riley i Chavan, 2006).

Do danas, bakteriocini su pronađeni skoro u svakoj bakterijskoj vrsti, tako da je stotine različitih vrsta bakteriocina okarakterisano. „Gotovo 99% svih bakterija mogu sintetisati makar jedan bakteriocin, jedini razlog zašto ga nismo našli je zato što ga nismo ni tražili“ (Klaenhammer, 1988). Diverzitet i broj bakteriocina ukazuju na njihovu ozbiljnu ulogu kao antimikrobnih jedinjenja.

Bakteriocini se sve češće pominju kao zamena za antibiotike ili dopuna antibiotskoj terapiji. Antibiotici i bakteriocini se razlikuju u tri ključne karakteristike: i) bakteriocini su ribozomalno sintetisani, dok antibiotici nisu, ii) bakteriocini imaju relativno uzak spektar delovanja, dok većina antibiotika poseduje širok spektar delovanja, iii) bakteriocini ispoljavaju dejstvo u mnogo manjim koncentracijama od antibiotika. Bakteriocini podrazumevaju veliki broj proteina koji se razlikuju u veličini,

spektru delovanja, načinu delovanja na senzitivne ćelije, mehanizmu sinteze i imunosti i mogu biti podeljeni na dve glavne grupe, produkovani od strane Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

Poslednjih dvadeset godina, studije o bakteriocinima Gram-pozitivnih bakterija su u velikom porastu, sa posebnim fokusom na bakterije mlečne kiseline (BMK), kako iz fundamentalnih razloga, tako i zbog njihove moguće primene u prehrambenoj industriji i zaštiti od bakterijskih infekcija.

### 2.3.1 Bakteriocini bakterija mlečne kiseline

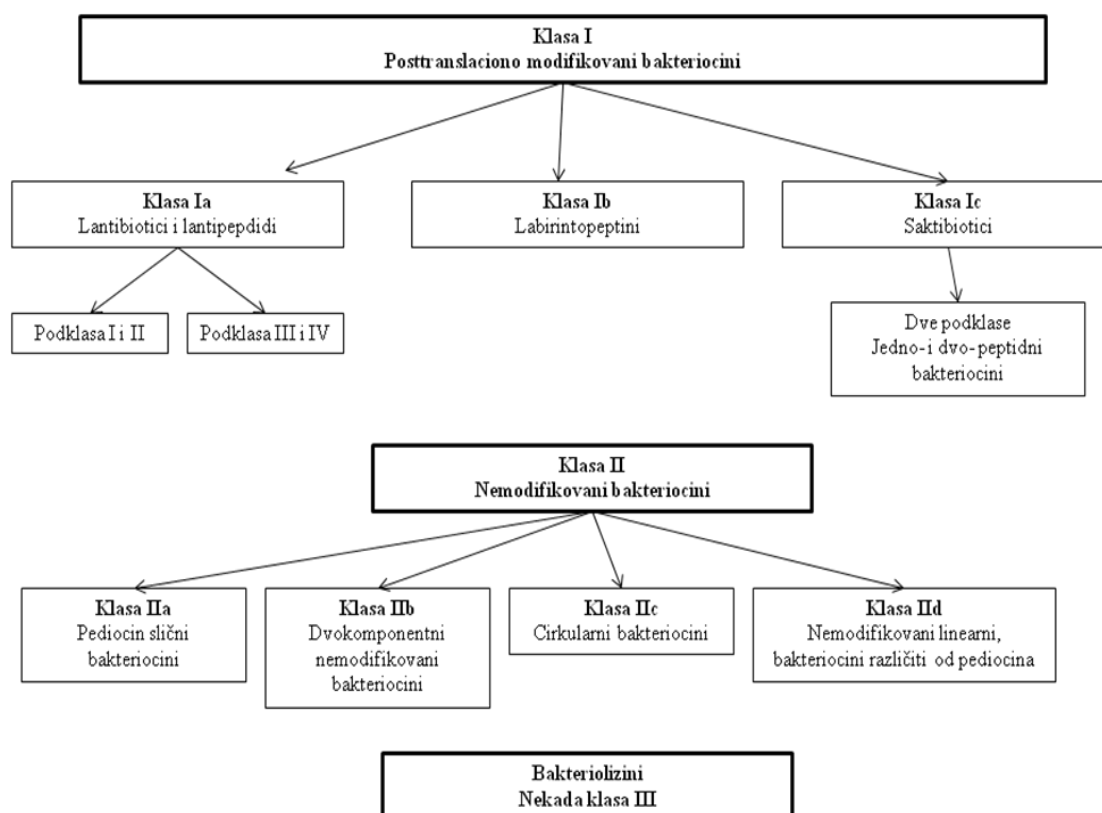
Definicija bakteriocina bakterija mlečne kiseline (BMK) se tokom vremena menjala. Na samom početku se smatralo da su bakteriocini „*protein-like*“ supstance koje mogu da izazovu smrt producenta (Jacob et al., 1953). Kasnije, definicija je proširena, pokazano je da bakteriocin proizvođači poseduju specifičan mehanizam koji ih štiti od delovanja bakteriocina (Tagg, 1976). Danas je opšte prihvaćena definicija bakteriocina BMK koja glasi: “Bakteriocini koje sintetišu bakterije mlečne kiseline su mali, ribozomalno sintetisani peptidi ili proteini koji imaju relativno uzak spektar antimikrobne aktivnosti koja je ograničena na blisko srodne vrste i prema kojoj soj proizvođač ima mehanizam specifične samozaštite“ (Jack et al., 1995). Bakteriocini BMK su najčešće termostabilni, tolerantni na niske i visoke pH vrednosti, razgrađuju se enzimima digestivnog trakta, što ih čini dobrim kandidatima za primenu u prehrambenoj industriji.

### 2.3.2 Klasifikacija bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija

Klasifikacija bakteriocina je dugi vremenski period predmet neslaganja i rasprave. Prva klasifikacija bakteriocina predložena je 1993 (Klaenhammer, 1993):

- Klasa I – bakteriocini koji poseduju lantionin – Lantibiotici;
- Klasa II – mali, termostabilni, koji ne poseduju lantionin
- Klasa III- veliki, termostabilni protein;
- Klasa IV – kompleksni bakteriocini, sastoje se od proteina plus još jedne ili više hemijskih komponenti (masti, ugljeni-hidrati) neophodnih za aktivnost.

Kasnije, predložena je dosta drugačija i jednostavnija šema klasifikovanja bakteriocina BMK. U novijoj klasifikaciji, bakteriocini su podeljeni u dve klase, Klasa I – lantibiotici i klasa II – bakteriocini koji ne poseduju lantionin. Prethodna Klasa III je preimenovana u bakteriolizine, i izdvaja se kao posebna grupa bakteriocina, a Klasa IV je izbačena (Cotter et al., 2005). Međutim, Heng i Tagg (2006) smatraju da se takvom klasifikacijom kolicini, kao prototip bakteriocina ne mogu svrstati ni u jednu od predloženih klasa. Isto bi se dogodilo i sa helveticinom J i još nekim bakteriocinima. Zbog toga ovi naučnici predlažu novu, univerzalnu klasifikaciju koja bi obuhvatala sva do sada okarakterisana antimikrobna jedinjenja koja spadaju u bakteriocine. Ipak mnogo više korišćena i citirana klasifikacija, kojom se rukovalo i u ovom radu, prikazana je na Slici 1 (Rea et al., 2011).



**Slika 1.** Predložena univerzalna klasifikacija koja bi obuhvatila sve do sada okarakterisane bakteriocine (Rea et al., 2011).

## 2.4. Bakteriocini Klase I

Generalno, Klasi I bakteriocina pripadaju svi bakteriocini koji prolaze kroz posttranslacione modifikacije. Prvom klasifikacijom, svi bakteriocini ove klase su

podeljeni na Tip A i Tip B. Međutim, kako ova klasifikacija nije bila održiva, ona je modifikovana i predloženo je da se Tip A lantibiotika podeli na dve podgrupe (AI i AII). Takođe, ovom klasifikacijom, uvedena je još jedna posebna grupa lantibiotika, a to su dvo-peptidni lantibiotici. Kako se broj lantibiotika tokom vremena povećavao, predložene su nove klasifikacije, međutim, ni jednom od predloženih klasifikacijama nisu mogli da se obuhvate svi bakteriocini ove grupe sve do predloga koji su dali su Rea et al. (2011), gde predlažu da se ova klasa bakteriocina podeli na podklase Ia (lantibiotici), Ib (labirintopeptini) i Ic (saktibiotici).

**Klasa Ia** – lantibiotici - to su mali peptidi (19-28 aminokiselina). Lantibiotici trpe posttranslacione modifikacije i dobili su ime jer sadrže lantionin/metilantionin residue u svojim polipeptidnim lancima. Ove modifikacije se događaju usled dehidratacije serina ili treonina do dehidroalanina odnosno dehidrobutirina. Neke od modifikacija se događaju usled kondezacije serina i treonina sa cisteinom, pri čemu se formiraju lantionin i metil-lantionin. Lantibiotici su prvi put podeljeni u dve subklase: tip A i tip B (Jung, 1991). Tip A lantibiotika, u koji spada i nizin, su dugački, pozitivno naelektrisani peptidi (do 34 aminokiselina), koji deluju na ciljnu ćeliju tako što vrše depolarizaciju membrane izazivajući curenje malih molekula, što dovodi do eventualne smrti ćelije. Struktura metilantionin mostova je slična među svim lantibioticima ove grupe. Tip B lantibiotici su kraći (do 19 aminokiselina), imaju globularnu strukturu i neki deluju na ciljnu ćeliju tako što inhibiraju enzim koji ima ulogu u sintezi ćelijskog zida. Međutim, na primeru delovanja nizina, koji pored toga što formira pore na ćelijskoj membrani senzitivne ćelije, što ga svrstava u tip A, on inhibira i sintezu peptidoglukana vezujući se za prekursor peptidoglukana lipid II što ga klasifikuje kao tip B (Breukink et al., 1999). Postojala je težnja da se ova klasa podeli na četiri podklase, na osnovu načina dobijanja zrelog peptida, kao i na osnovu odsustva/prisustva antimikrobne aktivnosti (Wiley i van Donl, 2007).

**Podklasa I** – linearni peptidi kod kojih je pre-peptid modifikovan delovanjem dva enzima LanB i LanC. Najbolje okarakterisan bakteriocin ove grupe je nizin.

**Podklasa II** – bakteriocini sa više globularnom strukturom nego predhodna grupa. Pre-peptidi bakteriocina ove podklase su modifikovani pod uticajem jednog proteina, LanM. Najbolje okarakterisani bakteriocini ove podklase su lakticin 481 i

njemu slični bakteriocini (lakticin-481 grupe) i dvokomponentni lantibiotici, kao što je lakticin 3147.

**Podklasa III** – peptidi koji su slični lantibioticima na osnovu srodnosti modifikacionih enzima, ali za koje nije pokazano da imaju antimikrobno delovanje. Tri okarakterisana predstavnika ove podklase su SapB, AmfS i SapT, a uključeni su u formiranje vazdušnog micelijuma kod *Streptomyces* sp. (Ueda et al., 2002; Kodani et al., 2004; Kodani et al., 2005).

**Podklasa IV** – bakteriocini ove podklase su grupisani na osnovu još jedne nove klase lantionin sintetaze, LanL. Bakteriocini ove i podklase III mogu se svrstati u “lantipeptide”, koji opisuju jedinjenja koja po strukturi pokazuju povezanost sa lantibioticima, a koji ne ispoljavaju antimikrobno delovanje.

**Klasa Ib – Labirintopeptini** su relativno novooktriveni posttranslaciono modifikovani peptidi. Po strukturi se razlikuju od lantibiotika jer kod njih se nakon posttranslacione modifikacije formira labionin, karbociklična aminokiselina (Meindl et al., 2010). Bakteriocini ove klase su se pokazali izuzetno potentni u borbi protiv virusa *Herpes simplex*.

**Klasa Ic** – Saktibiotici su ciklični bakteriocini koji trpe neobične posttranslacione modifikacije sa formiranim vezama između sumpora iz tri cisteinska ostatka i  $\alpha$ -ugljenika iz dva fenilalanina i jednog trenonina (Marx et al., 2001; Kawulka et al., 2003). Predstavnik ove grupe je Subtilozin A.

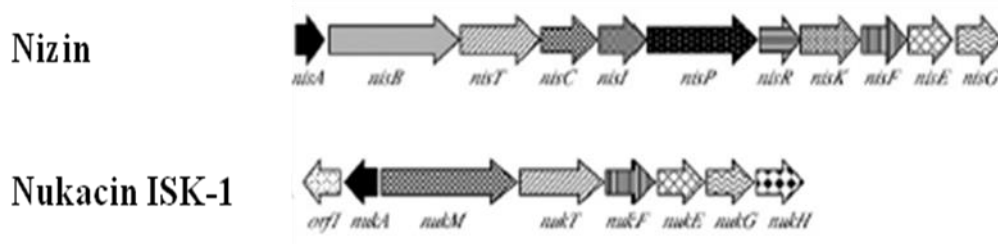
#### 2.4.1. Modifikacije bakteriocina Klase I

Geni koji su uključeni u sintezu lantibiotika obično su označeni sa prefiksom *lan*, sa nekim izuzecima kod kao što su nizin (*nis*), nukacin ISK-1 (*nuk*), mutacin (*mut*), lakticin 481 (*lct*). Genski klasteri koji učestvuju u biosintezi lantibiotika su predstavljeni na Slici 2. Među pojedinim bakteriocinima ove klase, razlikuju se redosledi gena i transkripcione organizacione jedinice. Na primer, kod nekih bakteriocina podklase II, za biosintezu bakteriocina odgovorna su tri gena (*lanAMT*), dok je u slučaju bakteriocina podklase I, četiri gena (*lanABCT*) koji su uključeni u biosintezu bakteriocina. Gen *lanA* kodira prekursor peptid koji podleže posttranslacionim modifikacijama (prepeptid). Kod lantibiotika subtilina, ovaj gen se



naziva *spaS*. Prepeptid zajedno sa lider peptidom na svom N-terminalnom kraju (23-59 aminokiselina) čini propeptid. Funkcija lider peptida nije još uvek najjasnija, ali pretpostavlja se da ima funkciju u signalizaciji za eksportovanje bakteriocina, zaštiti ćelije producenta bakteriocina tako što održava peptid u neaktivnom stanju i pružanju potpore za posttranslacione modifikacije. U podklasi I, enzim dehidrataza (LanB) prevodi aminokiseline serin i treonin u dehidroalanin (Dha), odnosno dehidrobutirin (Dhb). Ova reakcija je praćena vezivanjem cisteina za Dha/Dhb i formiranjem tioetarskih mostova, a katalizovana je enzimom ciklazom (LanC). Finalne modifikovane aminokiseline su lantionin (Dha-cis) i metilalntionin (Dhb-cis) (van der Donk et al., 2005; Chatterjee et al., 2006). U slučaju podklase II, do modifikacija dolazi pod uticajem bifunkcionalnog LanM-modifikacionog enzima, koji je odgovoran i za dehidrataciju i za ciklizaciju (Xie et al., 2004). Ono što je posebno interesantno je da je sekvenca C-terminusa LanM proteina pokazala homologiju sa LanC proteinom (20-27%), ali LanM nije pokazao nikakvu homologiju sa LanB enzimom. Direktni dokaz dvostruke uloge LanM enzima u dehidrataciji i ciklizaciji pokazana je u *in vitro* rekonstrukciji *lanM* gena u sintezi lakticina 481 (Xie et al., 2004).

Neki lantibiotici, pored procesa dehidratacije i ciklizacije, podležu daljim procesima modifikacija. Neki od slučajeva su epidermin i mersacidin kod kojih se na C-terminus nakon dekarboksilacije formiraju *S*-[(*Z*)-2-aminovinil]-*D*-cistein (AviCys) odnosno *S*-[(*Z*)-2-aminovinil]-(*3S*)-3-metil-*D*-cistein (AviMeCys). Za ove modifikacije je odgovoran enzim kodiran *lanD* genom (Majer et al., 2002; Schmid et al., 2002).



**Slika 2.** Genski klasteri koji učestvuju u sintezi lantibiotika

#### 2.4.2 Imunost bakteriocina Klase I

Ćelija koja produkuje bakteriocin, mora da poseduje mehanizam kojim će se odbraniti od svog bakteriocina. Takav sistem samoočuvanja je nazvan imunost. Do

sada je najviše rađeno na mehanizmu imunosti na nizin ali najnovija istraživanja daju dosta informacija i o ostalim lantibioticima. LanEFG je veoma čest imuni sistem kod lantibiotika (Xie i van der Donk, 2004; Chatterjee et al., 2005). LanF, LanE i LanG su u odnosu 2:1:1 i formiraju ABC-transporter like sistem. *lanEF* geni su odgovorni za komponente ugrađene u membranu, dok je *lanG* kodira entitet ABC-transportera. U slučaju nizina javlja se dodatni lipoprotein za imunost (NisI) koji je lociran na spoljašnjoj strani membrane (Qiao et al., 1996). Istraživanja su pokazala da su potrebna oba sistema za imunost kako bi se obezbedila maksimalna zaštita. U slučaju lantibiotika podklase II (nukacin ISK-1), javlja se dodatni (NukH) protein, koji kao i u slučaju nizina ima ulogu da pruži jaču zaštitu ćeliji. Pretpostavlja se da veći deo imunosti pruža sistem NukEFG, a da se NukH javlja kao dodatni protein koji omogućava bolju zaštitu ćelije (Aso et al., 2005).

#### **2.4.3. Transport bakteriocina klase I**

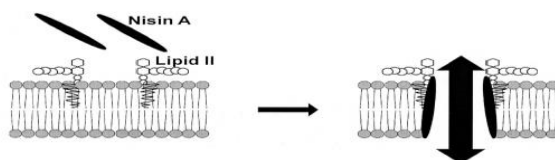
Transport lantibiotika iz ćelije proizvođača se događa isecanjem N-terminalnog lider peptida, a zatim se aktivni peptid pomera iz ćelije. Kod lantibiotika koji pripadaju podklasi I, isecanje lider peptida se vrši pod uticajem serin proteaze, LanP, a izbacivanje peptida je pod kontrolom ATP-vezujuće kasete, transportera LanT. Kod lantibiotika koji pripadaju podklasi II, protein LanT ima dvostruku funkciju, iseca lider peptid i eksportuje peptid iz ćelije. Ako se uporedi LanT protein lantibiotika podklasa I i II, primećuje se da LanT protein podklase I poseduje dodatnu N-terminalnu cistein peptidazu, čime se verovatno objašnjava ova dvostruka funkcija (Havarstein et al., 1995). Neki genski klasteri poseduju i dodatni sistem za transport koji se obično sastoji od tri gena (*lanEFG*), a ima ulogu i u imunosti producenta.

#### **2.4.4. Mehanizam delovanja bakteriocina klase I**

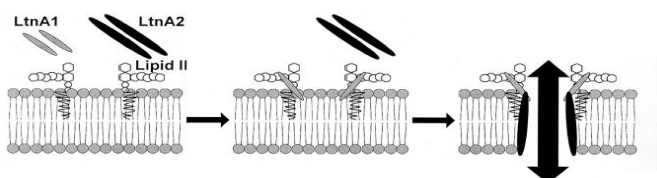
Delovanje lantibiotika najviše je usmereno na Gram-pozitivne bakterije, među njima su i patogene bakterije koje nose rezistencije na antibiotike, patogene bakterije prisutne u hrani kao i bakterije koje izazivaju kvarenje namirnica (Wiedemann et al., 2001). Delovanje na senzitivnu ćeliju lantibiotici vrše vezivanjem za lipid II (prekursor peptidoglukana) čime dovode do inhibiranja sinteze ćelijskog zida i formiranjem pora

na ćelijskoj membrani. Formiranjem pora na ćelijskoj membrani ometa se potencijal membrane, stopira se formiranje ATP-a i na kraju dolazi do smrti ćelije. Kombinovanje dva različita mehanizma delovanja bakteriocina u kojima je ciljani molekul isti, predstavlja ove molekule moćnim antimikrobnim sredstvom, što rezultira delovanjem u nanomolarnim koncentracijama. Lantibiotik, nizin A, deluje na senzitivnu ćeliju korišćenjem oba mehanizma i time predstavlja jedan od najpotentnijih bakteriocina (Slika 3A). Neki lantibiotici, kao što su nukacin ISK-1 i lakticin 481, koriste lipid kao ciljani molekul za vezivanje za ćeliju, ali mehanizam delovanja na senzitivnu ćeliju im se zasniva samo u inhibiranju sinteze ćelijskog zida. Ipak, bakteriocini ove podgrupe se međusobno razlikuju u tome što se neki vezuju za cviterjonske lipide, a neki za anjonske lipide, po čemu su dosta slični nizinu. Neki bakteriocini, kao što je mutacin II, energetski potpuno osiromašuju ćelije. Sam mehanizam delovanja ovog bakteriocina nije u potpunosti shvaćen, ali pretpostavlja se da na neki način inhibira metaboličke procese proizvodnje energije u ćeliji (Chikindas et al., 1995). Primećeno je da ovaj bakteriocin ne formira stabilne pore na ćelijskoj membrani, ali je nejasno kako i da li formira privremene pore. U slučaju dvopeptidnih lantibiotika (lakticin 3147), prvi peptid, LtnA1 komponenta, vezuje se za lipid II, a drugi peptid, LtnA2 komponentu, vezuje se za kompleks LtnA1/lipid II, gde nastanak trokomponentnog kompleksa dovodi do formiranja pora u membrani ćelije (Slika 3B) (Morgan et al., 2005).

A)



B)



**Slika 3.** Mehanizam delovanja lantibiotika: (A) Mehanizam delovanja nizina na ćelijsku membranu (B) Mehanizam delovanja dvo-peptidnog lantibiotika lakticina 3147 na ćelijsku membranu (Nishie et al., 2012).

## 2.5. Bakteriocini II klase

Bakteriocini ove grupe su uglavnom mali, termostabilni, katjonski i hidrofobni peptidi. Klasa II bakteriocina predstavlja veliku i raznovrsnu grupu antimikrobnih peptida koji su podeljeni u nekoliko podgrupa, a dalje na podklase: IIa – „pediocin-like“ bakteriocini; IIb – dvopeptidni bakteriocini; IIc – cirkularni bakteriocini; IId – bakteriocini bez lider peptida. Zajednička osobina bakteriocina klase II je mehanizam njihovog delovanja na senzitivne ćelije. Na osnovu većeg broja studija, pokazano je da bakteriocini ove klase deluju tako što permeabilizuju ćelijske membrane, nakon čega dolazi do curenja malih molekula iz ćelije, što izaziva smrt ćelije. Međutim, pored toga što je mehanizam njihovog delovanja isti, receptori na senzitivnim ćelijama za koje se vezuju bakteriocini se mogu razlikovati.

**Podklasu IIa** čine bakteriocini koji su slični pediocinu, „pediocin-like“. Oni vrlo često imaju uzak spektar delovanja, ali su jako značajni jer inhibiraju rast *Listeria monocytogenes*. Oni se vezuju za senzitivnu ćeliju koristeći komponente manoza-fosfotransferaznog sistema (man-PTS), svoju antimikrobnu aktivnost ostvaruju, kao što je već pomenuto, narušavanjem membranskog potencijala senzitivne ćelije (Diep et al., 2007; Kjos et al., 2010). Ono što je karakteristično za bakteriocine ove podklase je da imaju konzerviranu N-terminalnu sekvencu YGNGVXCXXXXVXV (gde je X bilo koja aminokiselina) i formiraju jedan ili dva disulfidna mosta u N-terminalnom delu peptida. U ćeliji se sintetišu sa lider peptidom koji se, pre izbacivanja bakteriocina iz ćelije, iseca proteolitičkim enzimima. Obično se isecanje odvija posle dva glicina (GG). Prvi i najbolje okarakterisan bakteriocin ove podklase je Pediocin PA-1/AcH koji sintetiše *Pediococcus acidalactici* (Motlagh et al., 1992), ali se može naći i u laktokokama, streptokokama kao i laktobacilima.

**Podklasu IIb** čine bakteriocini koji su sastavljeni od dva nemodifikovana peptida. Jedinstvenost ovih bakteriocina predstavlja to što je optimalna antimikrobna aktivnosti uslovljena delovanjem oba peptida, koji se nalaze u međusobnom odnosu 1:1. U nekim slučajevima, pojedinačni peptidi mogu ispoljavati antimikrobnu aktivnost, ali je ta aktivnost dosta slabija od one kad oba peptida deluju. Međutim, u slučaju bakteriocina laktokokcin G (Nissen-Meyer et al., 1992) i lakticin 705 (Cuozzo et al., 2000), potvrđeno je da pojedinačni peptidi nemaju antimikrobnu aktivnost. Svi

dvopeptidni bakteriocini poseduju lider peptid koji se iseca posle dva glicina (GG-) i eksportuju se van ćelije koristeći ABC-transporter (Havarstein et al., 1995). Do sada je okarakterisano 15 bakteriocina koji pripadaju ovoj podklasi. Laktokocin G je prvi i najbolje okarakterisan bakteriocin ove grupe i njegova aktivnost zavisi od oba peptida, odnosno komponenata  $\alpha$  i  $\beta$ , koji su prisutni u odnosu 1:1. Receptor za vezivanje laktokocina G za senzitivnu ćeliju je undekaprenil pirofosfatna fosfataza (Upp protein), koja je uključena u sintezu peptidoglukana (Kjos et al., 2014). Sam mehanizam delovanja ova dva peptida na senzitivnu ćeliju nije do kraja objašnjen, ali verovatno dolazi do vezivanja oba peptida za površinu ćelijske membrane, čime menja njen potencijal, što dovodi do curenja jona i smanjenja koncentracije ATP-a u ćeliji, a rezultat je smrt ćelije (Garneau et al., 2002).

**Podklasu IIc** čine bakteriocini kod kojih su terminalni C i N krajevi kovalentno povezani, što rezultira cirkularnoj formi ovih bakteriocina (Maqueda et al., 2004). Dugi niz godina, enterocin AS-48 je bio jedini poznati cirkularni bakteriocin (Galvez et al., 1991), ali danas je poznato još nekoliko bakteriocina ove podklase: gasericin A i cirkularin, karnociklin A, subtilozin, uberolizin, leukocilizin i laktociklicin Q. Strukturu ovih cirkularnih peptida čini 58-70 aminokiselina, koje su katjonske i sadrže veliki broj hidrofobnih aminokiselina (Maqueda et al., 2008). Oni pokazuju izuzetnu stabilnost na različitim temperaturama i širokom pH opsegu. Takođe, bakteriocini ove podklase su otporni na delovanje pronaze ali su osetljivi na delovanje endoproteaza. Neki od cirkularnih bakteriocina ispoljavaju širok spektar antimikrobnog delovanja, takođe mogu delovati na patogene kao što su, stafilokoke, enterokoke, listerije i klostridije. Ono što je karakteristično za bakteriocine ove grupe kao što su enterocin AS-48, gasericin A, subtilozin A i karnocilin A jeste da mogu ispoljiti svoju aktivnost bez prisustva bilo kakvog receptora. Enterocin AS-48 formira ne-selektivne pore, što uzrokuje curenje malih molekula, dok karnocilin A formira anjon-selektivne pore što izaziva depolarizaciju membrane (Gong et al., 2009).

**IId podklasu** bakteriocina čine neklasifikovani, jednopeptidni bakteriocini koji se razlikuju od pediocina. Među bakteriocinima podklase IId mogu se razlikovati: 1. *sec*-zavisni bakteriocini; 2. bakteriocini bez lider peptida ("leaderless bacteriocins") i 3. ostali bakteriocini klase IId. Bakteriocine bez lider peptida uglavnom sintetišu bakterije koje nisu BMK, stafilokoke i bakterije propionske kiseline (Watson et al.,

1988; Faye et al., 2011). Prvi bakteriocini ovog tipa su bakteriocini L50 i enterocin Q izolovani iz BMK, *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* (Cintas et al., 1998). Bakteriocini ove podklase svoju antimikrobnu aktivnost ostvaruju permeabilizacijom membrane, a potom curenjem ćelijskog sadržaja dolazi do smrti ćelije. Pojedini bakteriocini ove podklase (laktokokcin A i B), kao i bakteriocini podklase IIa, koriste man-PTS komponente kao receptore za vezivanje za senzitivnu ćeliju. Pored ovih sličnosti, bakteriocini ove podklase ne pokazuju nikakvu homologiju sa bakteriocinima podklase IIa. Laktokcin A i B koriste dva membranska proteina iz man-PTS sistema, IIC i IID, što ukazuje da postoji opšti mehanizam koji uključuje interakciju man-PTS i jednopeptidnih bakteriocina. Jedan od bakteriocina u ovoj podklasi koji koristi različit mehanizam delovanja je lakticin Q koji za vezivanje za senzitivnu ćeliju ne zahteva receptor, a mehanizam antimikrobnog delovanja se zasniva na depolarizaciji membrane (Yoneyama et al., 2009).

### **2.5.1. Imunost bakteriocina II klase**

Imuni proteini klase IIa bakteriocina pokazuju visok nivo specifičnosti obezbeđujući imunost samo na određeni bakteriocin ili eventualno na blisko srodne bakteriocine klase IIa (Fimland et al., 2005). Proteini koji obezbeđuju imunost se vezuju za receptor man-PTS sistema, formirajući kompleks koji onemogućava delovanje bakteriocina. Ovakvi kompleksi se formiraju samo u prisustvu bakteriocina (Diep et al., 2007).

Kad su u pitanju bakteriocini podklase IIb, najviše istraživanja je urađeno na laktokokcinu G i enterocinu 1071. Pretpostavlja se da se imuni protein vezuje za receptor laktokocina G ili enterocina 1071 (Upp protein) i time blokira antimikrobnu aktivnost (Nissen-Mejer et al., 2010).

### **2.5.2. Transport bakteriocina klase II**

Transport bakteriocina klase II se odvija kroz membranu koristeći ABC-transportere, koji su deo ATP-vezujućih kaseti, i pomoćnog proteina. ABC-transporteri poseduju N-terminalni proteolitički domen, hidrofobni transmembranski domen i ATP-vezujući domen na C-terminusu (Havarstein et al., 1995). Kao i kod lantibiotika, dolazi

do isecanja lider peptida sa N-terminusa prekursora bakteriocina nakon čega se obrađen bakteriocin transportuje kroz membranu. Kod većine bakteriocina, svi geni koji kodiraju proteine za sintezu bakteriocina, kao i za ABC-transportere, deo su jednog operona. Postoje i slučajevi gde su ABC-transporteri deo zasebnog operona ali se nalaze u blizini strukturnog gena za bakteriocin. Geni koji kodiraju pomoćne proteine koji učestvuju u transportu bakteriocina najčešće su lokalizovani u blizini ABC-transportera. Bakteriocini koji zavise od ABC-transportera mogu se podeliti u dve grupe: a) bakteriocini sa lider peptidom dvoglicinskog tipa koji je nađen kod bakteriocina II klase i kod nekih lantibiotika (Håvarstein et al., 1995); b) bakteriocini sa drugačijim lider peptidom koji nije *sec*-zavisna. Proteolitički domen, koji spada u familiju cisteinskih proteinaza, vezuje bakteriocinski prepeptid što dovodi do hidrolize ATP-a, koja izaziva konformacionu promenu transportera i omogućava proteinaznom delu da vrši isecanje lider peptida, a obrađeni molekul bakteriocina se transportuje kroz ćelijsku membranu. Pokazano je da je aminokiselina Gly<sup>2</sup>, u dvoglicinskom lider peptidu, u potpunosti konzervirana i da mutacija u tom regionu sprečava sintezu aktivne forme bakteriocina (Håvarstein et al., 1995).

Za razliku od prethodnih, postoji mali broj bakteriocina klase II koji se eksportuju iz ćelije preko *sec*-zavisnog sekretornog sistema. U ovom sistemu učestvuje kompleks *Sec* proteina, a ključnu ulogu ima N-terminalna signalna sekvenca. *Sec*-zavisna transport identifikovan je kod klase II bakteriocina kao što su acidocin B, divergicin A, bakteriocin 31, enterocin P, laktokocin 972, listeriocin 743A, propionicin T1, bakteriocin T8 i hiracin JM79.

## 2.6. Bakteriolizini

Ovoj grupi pripadaju veliki bakteriocini (>30kDa) i termolabilni bakteriocini. Ranije su bili svrstani u klasu III bakteriocina. Na osnovu mehanizma delovanja, razlikuju se u odnosu na ostale bakteriocine, jer oni deluju na senzitivnu ćeliju izazivajući njeno liziranje. Ono što je jedna od najinteresantnijih razlika u odnosu na ostale bakteriocine je to što bakteriolizini ne sintetišu uvek imuni protein, nego se njihova imunost zasniva na modifikaciji ćelijskog zida bakterijske ćelije, producenta bakteriocina. Predstavnici ove grupe bakteriocina su helveticin J (Joerger i

Klaenhammer, 1986), helveticin V-1829 (Vaughan et al., 1992), acidofilucin A (Toba et al., 1991).

## **2.7. Izolacija i prečišćavanje bakteriocina**

S obzirom da bakteriocini čine jako heterogenu grupu jedinjenja, međusobno se razlikuju, a te razlike se ogledaju u različitoj rastvorljivosti u organskim rastvaračima, veličini, izoelektričnoj tački, afinitetu prema ligandima itd. Bakteriocini su proteini ili mali peptidi, a ono što im je zajedničko to je da su najčešće pozitivno naelektrisani. Zbog svih ovih karakteristika bakteriocina, genetička karakterizacija bakteriocina je nadmašila biohemijski pristup proučavanja njihovih karakteristika. Poslednjih nekoliko godina, kako dolazi do razvijanja biohemijskih metoda i upoznavanja karakteristika bakteriocina, biohemijski pristup karakterizacije bakteriocina je u porastu. Metode za izolaciju bakteriocina se mogu podeliti u tri grupe (Saavedra et al., 2004). Prva grupa podrazumeva metodu taloženja proteina korišćenjem amonijum-sulfata, a nastavlja se nekim tipom hromatografije (jonoizmenjivačka, gel filtracija) i na kraju se završava reverzno-faznom tečnom hromatografijom visokih performansi (RP-HPLC). Druga grupa predstavlja modifikaciju prve, metoda se zasniva na taloženju proteina amonijum-sulfatom, a zatim sledi ekstrakcija proteina hloformom ili metanolom i na kraju, kao dodatno prečišćavanje, koristi se HPLC. Poslednji način na koji se mogu izolovati bakteriocini, koji se u današnje vreme najređe koristi, zasniva se na podešavanju pH vrednosti medijuma u kojem je rasla bakterijska kultura, a koncentracija bakteriocina se dovodi do maksimuma, a nakon toga se koristi hidrofobna hromatografija (Callewaert i de Vuyst., 1999).

Koja od navedenih metoda će biti korišćena, u mnogome zavisi od vrste bakteriocina, i uglavnom se odabir metoda određuje empirijski. Jedan od problema koji se javljaju prilikom izolacije bakteriocina je koncentracija bakteriocina u medijumu koja je jako niska, a vrlo retko postoji način da se indukuje povećana proizvodnja. Ovaj problem se često rešava time što se priprema velika količina polaznog materijala. Veći problem prilikom izolacije bakteriocina predstavlja to što se BMK gaje u složenim medijumima kao što su MRS i GM17, koji u sebi već sadrže značajnu količinu peptida kao i šećera, aminokiselina, koji mogu da ometaju izolaciju željenog bakteriocina. Zbog



prethodno navedenih problema koji se mogu javiti, pre procesa izolacije i prečišćavanja bakteriocina, potrebno je ustanoviti optimalne uslove za produkciju maksimalne koncentracije bakteriocina (vremenski period rasta bakterijske kulture, medijum).

Biohemijski put dobijanja čistih bakteriocina sve češće se koristi u utvrđivanju njihove potencijalne primene u konzervisanju hrane. Upotreba nizina i pediocina, kao konzervanasa hrane, dovela je do potrebe da se razviju brze metode za izolaciju dovoljne količine čistih bakteriocina. Najčešći vid izolacije bakteriocina je njegovo taloženje amonijum-sulfatom. Ovaj metod ne zahteva složenu aparaturu i prilično je jeftina metoda, međutim problem je što je potrebna izuzetno velika količina početnog materijala i veoma je dug i zahtevan proces. Iz tog razloga, poslednjih godina je se ova metoda zamenjuje hromatografijom.

## **2.8. Primena bakteriocina**

### **2.8.1. Bakteriocini i antibiotici**

Iako istraživanja na antimikrobnim jedinjenjima datiraju još od 1877 godine, kada su Paster i Joubert primetili da neke bakterije mogu sprečavati rast *Bacillus anthracis*, interesovanje za ovu oblast je i dalje veliko. Od tada se ulažu konstantni naponi da se pronađu nepatogene bakterije koje će sprečavati rast drugih bakterija. Takođe, poslednjih decenija, usled intezivne upotrebe antibiotika, došlo je do porasta broja rezistentnih bakterija na antibiotike. Među bakterijama koje nose rezistencije na antibiotike, najrasprostranjenije i najveće probleme izazivaju sojevi rezistentni na metacilin vrste *Staphylococcus aureus* (MRSA) i vankomicin rezistentne enterokoke (VRE) koje izazivaju sistemske infekcije u bolnicama (Cotter et al., 2005). Prvi veliki pomak u istraživanju, kao odgovor problemu bakterijskih rezistencija, bilo je otkrivanje nizina. Nizin svoju antimikrobnu aktivnost ostvaruje vezivanjem za molekul lipida II, koji je inače i ciljni molekul za delovanje antibiotika vankomicina. Na osnovu ovog mehanizma delovanja nizina, mogu se napraviti novi antibiotici koji će se vezivati za ciljni molekul i ispoljavati svoju antimikrobnu aktivnost (Sit i Vederas, 2008).

Pored toga što su mehanizmi delovanja bakteriocina iskorišćeni za pravljenje novih antibiotika, bakteriocini se mogu koristiti i kao alternativa za antibiotike. Iako bakteriocini poseduju antibiotske karakteristike, oni se ne nazivaju antibioticima.

Razlozi su, sa jedne strane da bi se izbegla konfuzija, a sa druge zato što imaju uzak spektar delovanja, za razliku od antibiotika (Cleveland et al., 2001). I pored toga, činjenica da mogu delovati na specifične patogene vrste, kao i da se mogu naći svuda u prirodi, čini ih dobrim kandidatima za alternativu ili dopunu antibioticima.

Do sada je ispitivano delovanje nizina i lakticina 3147 na patogene bakterije koje nose rezistencije na antibiotike. Nizin je pokazao izuzetne rezultate na vankomicin i oksacilin rezistentne *Helicobacter pylori* i *Neisseria* sp., dok je lakticin 3147 u *in vitro* uslovima pokazao aktivnost protiv *Staphylococcus aureus* (uključujući MRSA), enterokoka (uključujući i VRE) i streptokoka.

Kombinovanjem rezultata dobijenih proučavanjem odnosa između strukture i funkcije bakteriocina i njihove ekspresije u homologim ili heterologim domaćinima teži se dobijanju novih pristupa u izučavanju bakteriocina koji će omogućiti dobijanje derivata sa većim antimikrobnim potencijalom i širim spektrom delovanja.

### **2.8.2. Primena bakteriocina u industriji hrane**

Dugi niz godina, ispitivanja bakteriocina su imala samo fundamentalni karakter (karakterizacija, mehanizmi delovanja), međutim kako poslednjih godina postoji sve veća težnja korišćenja bakteriocina kao prirodnih konzervanasa u prehrambenoj industriji, teži se ka ispitivanju njihove primene. Ipak, i pored stalnih težnji, korišćenje bakteriocina u prehrambenoj industriji je limitirano iz više razloga, a neki od njih su cena pripreme bakteriocina kao i nedovoljna efikasnost bakteriocina. Iz tog razloga, potreba za otkrivanjem novih i efikasnijih bakteriocina je uvek prisutna. Sve ovo je uticalo da se istraživanje bakteriocina pojača, sa ciljem da se pronađu molekuli koji će sprečavati rast i razmnožavanje patogenih bakterija kao što su *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* sp., a da pri tom mogu bezbedno da se koriste u prehrambenoj industriji.

Najviše istraživanja je posvećeno bakteriocinima bakterija mlečne kiseline (BMK). S obzirom da se BMK i njihovi metaboliti konzumiraju u ogromnim količinama već generacijama bez ikakvog štetnog uticaja na zdravlje korisnika, oni predstavljaju odličan potencijalni izvor bakteriocina. U dosadašnjim istraživanjima, otkriveni su bakteriocini BMK koji su veoma potentni protiv Gram-pozitivnih patogena, uključujući i *L. monocytogenes* (Chen i Hoover, 2003).

Bakteriocini se u proizvodnji prehrambenih proizvoda mogu upotrebiti na dva načina: a) dodatak bakterija bakteriocin-proizvođača u proizvod i b) priprema preparata bakteriocina (supernatant kulture, amonijum sulfatni precipitati, prečišćen molekul-HPLC).

Jedan od načina korišćenja bakteriocina u prehrambenoj industriji je njihova inkorporacija u ambalažu pakovanja (filmove). Pakovanjem hrane u antimikrobnu ambalažu dolazi do prevencije rasta bakterija zbog direktnog kontakta površine proizvoda sa ambalažom. Ovaj vid korišćenja bakteriocina u prehrambenoj industriji može imati prednost u odnosu na dubinsko dodavanje bakteriocina ili prskanjem bakteriocina po proizvodu (Appendini i Hotchkiss, 2002). Do sada je okarakterisan veliki broj bakteriocina, međutim malo je bakteriocina koji se koriste komercijalno u industriji hrane. Razlog za to je povezan sa nekoliko važnih kriterijuma koje treba uzeti u obzir u toku testiranja bakteriocina za upotrebu u hrani: i) bakterija-bakteriocin proizvođač mora imati status „GRAS“ ii) bakteriocin bi trebalo da ima širok spektar delovanja, uključujući i patogene bakterije, ili da ima aktivnost na jednu, specifičnu, patogenu bakteriju, iii) bakteriocini treba da budu temperaturno stabilni i da nemaju nikakvog uticaja na zdravlje korisnika, iv) bakteriocini ne smeju uticati na senzorna svojstva i kvalitet proizvoda (Cotter et al., 2005).

Bakteriocini su sami ili u kombinaciji sa drugim metodama pokazali potencijal u očuvanju mesnih i mlečnih proizvoda, ribe, hrane u konzervama, alkoholnih pića, salata, pekarskih proizvoda i fermentisanog povrća (Chen i Hoover., 2003). Pored toga što se dodaju kako bi sprečili rast i razmnožavanje patogenih bakterija, bakteriocini se mogu dodavati da bi kontrolisali razvoj nestarter bakterija mlečne kiseline (NSBMK), koje mogu izazvati velike ekonomske gubitke u proizvodnji sira i vina jer dovode do promene svojstava proizvoda. Takođe, bakteriocini su našli primenu u proizvodnji tvrdih ili polutvrdih sireva gde imaju ulogu da kontrolišu lizu startera. Delovanje bakteriocina dovodi do ubrzane lize starter kulture, oslobađaju se intracelularni enzimi, što rezultira ubrzanim zrenjem kao i poboljšanju ukusa sira (Cotter et al., 2005).

Pored intenzivnog ispitivanja bakteriocina i njihovog potencijala za korišćenje u prehrambenoj industriji, do sada su samo dva bakteriocina komercijalno dostupna i sa velikom uspešnošću se koriste kao prirodni konzervansi hrane, nizin, komercijalno

dostupan kao Nisaplin (*Danisco*, Danish) i pediocin AcH/PA1 komercijalno dostupan kao ALTA2431 (*Quest International*, Sarasota, Florida).

## 2.9. Antilisterijski efekat bakteriocina

*Listeria monocytogenes* je Gram-pozitivna bakterija, štapićastog oblika, raste u aerobnim ili fakultativno anaerobnim uslovima. Ima sposobnost da raste na niskim temperaturama (4°C), toleriše niske pH vrednost (<5.0) i visoke koncentracije NaCl (do 10%), ona se može naći u različitim sredinama i njena kontrola je jako teška (Farber i Peterkin, 1991). Pripada grupi patogenih bakterija koja napada imunokompromitovane osobe, decu, stare i trudnice. Izaziva akutnu bolest, listeriozu, jednu od najtežih bolesti zastupljenih u industrijski razvijenim zemljama (Schlech, 2000) sa smrtnim ishodom u preko 20-25% slučajeva. S obzirom na sveprisutnost *L. monocytogenes*, u mnogim zemljama Evropske Unije (EU), u poslednjih 15 godina je zabeležen veliki broj slučajeva listerioze (Tabela 2) (Allerbeger i Wagner, 2009; Goulet et al., 2008).

**Tabela 2.** Godišnji izveštaji zabeleženih slučajeva listerioze u zemljama EU

Zemlja	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Belgija	4,7	5,6	4,3	7,3	8,6	5,9	6,4
Danska	7,5	7,1	5,2	5,4	7,6	8,5	10,3
Vels	1,9	2,8	2,6	4,5	4,0	3,5	3,5
Finska	3,5	5,4	3,8	7,9	6,7	6,8	8,5
Nemačka		2,6	2,9	3,1	3,6	6,2	6,2
Holandija			2	3	3	5,6	3,9
Švedska	5,9	7,5	4,4	5,3	4,7	4,4	4,6
Švajcarska		5,1	3,8	6,1	7,8	9,8	9,1

- broj prikazan odnosi se na broj zabeleženih slučajeva na milion stanovnika

Najveći rizik predstavlja u gotovim mlečnim proizvodima, proizvedeni od nepasterizovanog ili pasterizovanog mleka, zatim u gotovim ribljim proizvodima i sirovom voću i povrću (EFSA, 2013; Ferreira et al., 2014). Najčešći način kontaminacije gotovih proizvoda dešava se kolonizacijom perzistentnih sojeva *L.*

*monocytogenes*, koji imaju sposobnost preživljavanja čišćenja i dezinfekcije pogona u kojima se izvodi proizvodnja (Lomonaco et al., 2009). Generalno, perzistencija je definisana kao sposobnost ćelija da opstanu u nepovoljnim uslovima sredine usled promene u metabolizmu, do koje dolazi usled stohastičkih promena u profilu genske eksresije. Sam mehanizam nastajanja perzistentnih ćelija do danas nije razjašnjen jer zavisi od mnogo faktora. Perzistentni sojevi *L. monocytogenes*, detektovani su, kako u malim, tako i velikim pogonima za proizvodnju mlečnih proizvoda (Lomonaco et al., 2009; Fox et al., 2011), zatim u pogonima za proizvodnju lososa (Rorvik et al., 2001) i u pogonima za proizvodnju mesa (Giovannaci et al., 1995), takođe i u pogonima za proizvodnju živinskog mesa (Ojeniyi et al., 2000).

U toku proizvodnje prehrambenih proizvoda, gotovi proizvodi dolaze u kontakt sa perzistentnim sojevima *L. monocytogenes* u pogonu, čime se izaziva kontaminacija gotovih prehrambenih proizvoda, a njihovo dalje preživljavanje zavisi od uslova koji se dešavaju u proizvodu (hranljive materije, procenat soli, pH, temperatura). Generalno, mlečni proizvodi predstavljaju veoma pogodnu sredinu za rast i razmnožavanje *L. monocytogenes* (Terplan et al., 1986). Najčešće se može naći na površini sireva sa dugim zrenjem, kod kojih se na površini pH vrednost povećava tokom zrenja, što pruža mnogo povoljnije uslove za rast *L. monocytogenes*. Pored ovih sireva, *L. monocytogenes* je detektovana u sirevima tipa „cottage“ (Ryser, 1985), mekim sirevima (Morgan et al., 2001), zatim kamemberu (Back et al., 1993). Takođe, može se naći i u belim sirevima u salamuri i belim sirevima od ultrafiltriranog mleka tipa „FETA“, i pored toga što te sireve odlikuje visoka koncentracija soli, nizak pH (Papageorgiou i Marth, 1989).

Zbog ovih karakteristika *L. monocytogenes*, usled obima proizvodnje, industrija mleka, kao i ostatak prehrambene industrije, se susreće sa stalnim problemima. Iz tog razloga, porasla je potreba za ispitivanjem novih načina za kontrolu *L. monocytogenes* u gotovom proizvodu. Jedan od načina, koji se u poslednjih deset godina izuzetno ispituje, je korišćenje bakteriocin proizvođača BMK kao starter kultura ili korišćenje samog izolovanog i prečišćenog bakteriocina u kontroli *L. monocytogenes*. Dosadašnja, intenzivna ispitivanja biosinteze bakteriocina, mehanizma njihovog delovanja, strukture, omogućilo je da se ispitivanja usmere i ka njihovoj primeni u prehrambenoj industriji. Prilikom kontrole *L. monocytogenes*, korišćenjem BMK, nizin proizvođača, u proizvodnji „cottage sira“, dobijen je bakteriostatički efekat (Dal Bello et al., 2012),

dok je u proizvodnji kamembera dobijen bakteriocidni efekat u prvih nedelju dana zrenja, a nakon toga nije više uticao na rast *L. monocytogenes* (Maisnier-Patin et al., 1992). Mnogo bolji rezultati kontrole *L. monocytogenes* u siru, dobijeni su prilikom kombinacije nizina sa još jednim bakteriocinom (Pimentel-Filho et al., 2014), zatim kombinacijom nizina i organske kiseline (Gadotti et al., 2014), ili kombinacijom visokog pritiska i nizina (Arques et al., 2005). Pored nizina, kao biokonzervansi hrane u kontroli *L. monocytogenes*, ispitivani su i mnogi drugi bakteriocini, ali se izdvajaju pediocin AcH/PA-1 i lakticin 3147, koji su pokazali najbolje rezultate. Pediocin AcH/PA-1 je pokazivao najbolje rezultate prilikom korišćenja u kontroli *L. monocytogenes* u proizvodnji čedar sira (Buyong et al., 1998), dok je lakticin 3174 pokazao izuzetne rezultate prilikom kontrole *L. monocytogenes* u proizvodnji „cottage“ sira, pri čemu je zabeležen pad broja ćelija *L. monocytogenes* za 99%, u odnosu na kontrolnu varijantu (McAuliffe et al., 1999).

I pored intenzivnog izučavanja bakteriocina kao biokonzervansa hrane, samo se nizin i pediocin AcH/PA1 koriste komercijalno kao prirodni konzervansi hrane u preko 50 zemalja širom sveta. Razlozi za to su različiti, a neki od njih su relativno uski spektri delovanja mnogih bakteriocina ili stalne promene zakonskih regulativa za korišćenje dodataka u prehrambenoj industriji. Pored toga, potencijalni problem predstavlja brza adaptacija patogenih bakterija na bakteriocine koji se dodaju. Iz tog razloga, istraživanja su sve više usmerena ka konstrukciji mutanant sojeva koji će proizvoditi dva ili više bakteriocina istovremeno (Martinez et al., 2000; Horn et al., 1999). Međutim, kako je korišćenje rekombinantnih mutanata u prehrambenoj industriji ograničeno, prirodni izolati su i dalje najveći izvor novih bakteriocina sa širokim spektrom delovanja.

### **3. CILJEVI RADA**

Iako su istraživanja bakteriocina intenzivirana poslednjih nekoliko decenija, potreba za novim bakteriocinima i njihovom karakterizacijom je i dalje neophodna. Kao potencijalni izvor novih bakteriocina mogu biti prirodni izolati bakterija mlečne kiseline (BMK) koje zahvaljujući specifičnim ekološkim nišama iz kojih su izolovani pokazuju brojne karakteristike koje su se kod industrijskih sojeva zbog dugogodišnje upotrebe najverovatnije izgubile. Izolacija autohtonih sojeva laktokoka iz tradicionalnih sireva i dokazivanje posedovanja bakteriocinske aktivnosti, a potom determinacija i karakterizacija samih bakteriocina bi predstavljao poseban doprinos u fundamentalnom i aplikativnom smislu, kako u samom postupku definisanja bakteriocina, tako i njihove eventualne primene u prevenciji kontaminacije hrane. Zbog toga je postavljen globalni cilj ovog rada, da se ispituju autohtoni sojevi sa bakteriocinskom aktivnošću, odredi lokacija gena koji determinišu njihovu produkciju, da se biohemijski okarakterišu i utvrdi njihovo antimikrobno dejstvo na *Listeria monocytogenes* u model sistemu proizvodnje sira.

Imajući u vidu sve navedeno, pojedinačni ciljevi ovog rada su bili:

- Izolacija i karakterizacija sojeva laktokoka sa antimikrobnim potencijalom, korišćenjem klasičnih i molekularnih metoda determinacije do nivoa vrste;
- Utvrđivanje prisustva bakteriocina kod testiranih sojeva;
- Određivanje lokacije gena za odgovornog za sintezu bakteriocina kod sojeva koji su bakteriocin pozitivni;
- Biohemijska karakterizacija bakteriocina i utvrđivanje spektra antimikrobnog delovanja;
- Izolacija i prečišćavanje bakteriocina iz bakteriocin pozitivnih sojeva;
- Ispitivanje antilisterijskog delovanja bakteriocina soja *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 u sistem modelu sira



## **4. MATERIJAL I METODE**

#### 4.1. Medijumi korišćeni za kultivisanje i izolaciju bakterija

Za kultivisanje i izolaciju laktokoka, kao i kultivisanje *Listeria monocytogenes*, korišćen je tečni GM17 medijum (M17 (Merck, GmbH, Dermštad, Nemačka) sa dodatkom 0,5% w/v glukoze). Za enumeraciju *Listeria monocytogenes*, korišćen je selektivni Oxford agar (Difco<sup>tm</sup>, Oxford Medium Base, Francuska). Za rast laktobacila, korišćen je MRS medijum (Merck, GmbH Dermštad, Nemačka). Čvrste podloge su dobijene dodavanjem 1,5% w/v agara u medijum. Soft agari su dobijeni dodavanjem 0,7% w/v agara u medijum. Sojevi laktokoka i *Listeria monocytogenes* su gajeni aerobno, dok je za gajenje laktobacila korišćen Gas-pak sistem (Merck, GmbH Dermštad, Nemačka), na temperaturama inkubacije 30°C i 37°C, u toku 48 h. Konstrukti laktokoka sa vektorom su gajeni u GM17 medijumu sa odgovarajućom koncentracijom antibiotika (eritromicin 10 µg/mL).

Za rast *Escherichia coli* korišćen je LB (Lauria broth) medijum po sledećoj recepturi: tripton (10 g/L), ekstrakt kvasca (5 g/L), NaCl (5 g/L). Čvrsta podloga je dobijena dodavanjem 1,5% w/v agara. Temperatura kultivacije je bila 37°C uz aeraciju (180 rpm/min). Transformanti *E. coli* koji su posedovali određene vektore koji su nosili antibiotsku rezistenciju, gajeni su u LB medijumu sa dodatkom antibiotika (eritromicin 300 µg/mL, ampicilin 100 µg/mL). Za plavo/belu selekciju kolonija sa kloniranim fragmentom, korišćen je LA agar uz dodatak 5-brom-4-hlor-3-indol-D-Galaktozide (X-gal) u finalnoj koncentraciji 50 µg/mL.

Za rast ostalih patogenih sojeva, korišćen je takode LB medijum, a temperatura inkubacije je bila 37°C. Svi medijumi su sterilisani u autoklavu na temperaturi 121°C tokom 15 minuta. Svi sojevi i transformanti su čuvani u odgovarajućem medijumu za rast sa dodatkom 15% glicerola, na temperaturi -80°C.

#### 4.2. Izolacija i determinacija laktokoka

Za izolaciju laktokoka, bakteriocin proizvođača, korišćene su različite vrste sireva (tvrdi, polutvrđi, meki) i voća. Svi sirevi su proizvedeni na tradicionalan način, bez dodatka startera, na teritoriji Srbije. Uzorci (20 g) su homogenizovani u 180 mL 2% Na-citrata u blender aparatu Stomacher 400 (Seward, Engleska). Nakon toga je

urađena izolacija laktokoka na metodom razređenje zasejavanjem na GM17 čvrstu podlogu i inkubacijom na 30°C tokom 48 h.

Oko 50 izraslih kolonija, iz svakog uzorka, je pikirano kako bi se smanjio rizik izdvanja istih sojeva. Nakon toga, standardnom metodom iscrpljenja, izolovane bakterije su trostruko prečišćene, do dobijanja čistih kultura.

U cilju selekcije laktokoka, urađeni su sledeći mikrobiološko-biohemijski testovi:

- **Difuzioni test sa bunarčićima** – ispitivanje je rađeno radi određivanja bakteriocinske aktivnosti izolovanih laktokoka. Petri šolje sa čvrstom podlogom prelivane su sa odgovarajućim soft agarom. Soft agar je inokulisan sa  $10^5$ - $10^6$  ćelija indikator soja/mL medijuma. Za ispitivanje bakteriocinske aktivnosti i antimikrobnog spektra delovanja izolata laktokoka, upotrebljeni indikator sojevi laktokoka, laktobacila i patogenih bakterija, navedeni su u Tabeli 3. U soft agaru su napravljeni bunarčići (Ø5mm) u koje je sipano 50 µL bakteriocinskog preparata ispitivane kulture. U testu su korišćene kulture ispitivanih laktokoka nakon 16 h inkubacije na 30°C ili supernatant kulture (16 h), oslobođenog od ćelija filtriranjem kroz sterilne filtere 0,45 µm (Sartorius). Uz ivicu bunarčića, nanošen je kristal pronaze. Inkubacija se odvija na temperaturama optimalnim za rast indikator soja. Prisustvo bakteriocina je detektovano na osnovu pojave svetle zone oko bunarčića, osim na mestu gde je nanesen kristal pronaze.
- **Katalaza test** – ispitano je prisustvo enzima katalaze, unošenjem male biomase ispitivane kolonije na kap 3% rastvora vodonik-peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Penušanje u kapi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ukazivalo je prisustvo enzima katalaza, i takvi izolati su eliminisani.
- **Morfološke karakteristike** – bojenjem po Gramu i mikroskopskim pregledom je provereno da li su izolati okruglastog oblika, Gram-pozitivni, a ujedno je proverena i čistoća kultura.
- **Tip fermentacije šećera** – za selekcionisane laktokoke, utvrđeno je da li fermentaciju šećera obavljaju homo- ili heterofermentativnim putem. Kulture su zasejavane u GM17 bujon sa dodatkom 1% laktoze i indikatora. Kulture su inkubirane na 30°C u toku 24-48 h. Utvrđena je promena boje bujona i prisustvo ili odsustvo gasa u Durham cevčicama.

- **Sposobnost rasta na različitim temperaturama** – Ispitivana je sposobnost rasta izolovanih laktokoka na temperaturama 15°C i 45°C. Izolati su zasejani u GM17 bujon i inkubirani na ispitivanim temperaturama u toku 24-48 h.
- **Sposobnost rasta pri različitim koncentracijama soli** – Izolati laktokoka su zasejani u GM17 bujon sa 2, 4, 6,5% w/v NaCl, a zatim su inkubirane na temperaturi 30°C u toku 24-48 h.
- **API test** – sposobnost fermentacije ugljenih hidrata je testirana korišćenjem RAPID ID 32 Strep Sistema (bio Merieux). Za očitavanje rezultata korišćen je API Lab plus softver.
- **Molekularna determinacija** – nakon API testa, dalja determinacija je vršena korišćenjem metode molekularne determinacije sekvenciranjem gena za 16S rRNK.

### 4.3. Bakterijski sojevi

Korišćenjem klasičnih mikrobioloških metoda izolacije na selektivne podloge, izolovano je 52 izolata laktokoka iz uzoraka sireva i voća sa teritorije Srbije. Na osnovu mikrobiološko-biohemijских testova, odabrano je 10 izolata, a na osnovu izuzetne bakteriocinske aktivnosti, za dalji rad je odabrano tri izolata: BGBM50, LMG2081, BGBU1-4.

Soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBMN1-596, je očišćen od plazmida i korišćen je kao indikator soj za testiranje bakteriocinske aktivnosti bakteriocina iz laktokoka. Soj *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* HN14, takođe očišćen od plazmida, korišćen je kao indikator soj prilikom testiranja bakteriocina iz laktobacila, ali se može iskoristiti i kao indikator soj za testiranje spektra antimikrobnog delovanja bakteriocina iz laktokoka. Patogeni sojevi navedeni u Tabeli 3 su odabrani na osnovu učestalosti javljanja prilikom kontaminacije hrane i opasnosti koje izazivaju. Delovanjem bakteriocina testiranih laktokoka na navedene patogene, određivan je njihov antimikrobni spektar delovanja. Takođe, unakrsnim bakteriocinskim testovima, testiranih sojeva sa drugim bakteriocin proizvođačima, mogu se dobiti informacije o bakteriocinima koje proizvode testirani sojevi. Bakteriocin proizvođači koji su korišćeni za unakrsni test bakteriocinske aktivnosti su prikazani u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Bakterijski sojevi korišćeni kao indikatori i kao bakteriocin proizvođači za određivanje bakteriocinske aktivnosti i antimikrobnog spektra delovanja

<b>Bakterijski soj</b>	<b>Karakteristike soja</b>	<b>Izvor ili referenca</b>
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>		
BGMN1-596	Bak <sup>-</sup> , Bak <sup>s</sup> , Agg <sup>-</sup> , Prt <sup>-</sup>	(Gajić et al., 1999)
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>		
BGHN14	Bak <sup>-</sup> , Bak <sup>s</sup> , Agg <sup>-</sup> , Prt <sup>-</sup>	(Kojić et al., 1991)
<i>Listeria monocytogenes</i>		ATCC19111
<i>Yersinia enterocolitica</i>		ATCC 27729
<i>Proteus mirabilis</i>		ATCC 12453
<i>Escherichia coli</i> H7:O157		ATCC 35150
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 27853
<i>Salmonella typhimurium</i>		ATCC14028
<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC 25923
<i>Bacillus cereus</i>		ATCC 11778
<i>Shigella sonnei</i>		ATCC 29930
<i>Listeria innocua</i>		ATCC 33090
<i>Clostridium botulinum</i>		
BGŠM1-19	Bac <sup>+</sup> (lactin RM, laktokokcin B producent), Bac <sup>Im</sup>	(Strahinic et al., 2007)
BGŠM1-191	Derivat ŠM1-191 (Bak <sup>-</sup> , Bak <sup>s</sup> )	(Strahinic et al., 2007)
BGVL2-8	Bak <sup>+</sup> , izolat iz sira	Laboratorijska kolekcija-LMM
BGVL2-8/9	Derivat VL2-8/9 (Bak <sup>-</sup> , Bak <sup>s</sup> )	Laboratorijska kolekcija-LMM
BGJAV1	Bak <sup>+</sup> , izolat iz sira	Laboratorijska kolekcija-LMM
BGDK1-22	Bak <sup>+</sup> , izolat iz kajmaka	Laboratorijska

		kolekcija-LMM
BGMN1-5	Bak <sup>+</sup> (laktokokcin B, LsbB producent) Bak <sup>Im</sup> , Agg <sup>+</sup>	(Gajić et al., 1999)
BGMN1-501	Derivat BGBM1-5, Bak <sup>+</sup> (laktokokcin B producent) lcnB <sup>Im</sup>	(Gajić et al., 1999)
BGMN1-596T	Derivat BGBM1-5, Bac <sup>+</sup> (LsbB producent), Bac <sup>Im</sup> , Agg <sup>-</sup>	(Gajić et al., 1999)
MG7284/pAZIL-LsbB	Derivat MG7284 sa pAZIL-LsbB, (LsbB producent), LsbB <sup>Im</sup>	(Uzelac et al., 2013)

Bak<sup>+</sup> - bakteriocin producent; Bak<sup>-</sup> - ne produkuje bakteriocin; Bac<sup>S</sup> – senzitiv na bakteriocin; Agg<sup>-</sup> - nema agregacija; Prt<sup>-</sup> - nema proteinazu; ATCC – American Type Culture Collection

U cilju lokalizacije gena odgovornih za sintezu bakteriocina kod testiranih laktokoka, metodom čišćenja plazmida, dobijeni su derivati koji su izgubili mogućnost produkcije bakteriocina (Tabela 4).

**Tabela 4.** Derivati testiranih sojeva dobijenih nakon čišćenja plazmida

Derivat	Karakteristike derivate	Izvor ili referenca
<i>Lactococcus lactis</i> ssp.		
<i>Lactis</i>		
BGBM50-8	Bak <sup>+</sup> , Bak <sup>Im</sup> , Agg <sup>+/-</sup>	Derivat soja BGBM50
BGBM50-34	Bak <sup>+</sup> , Bak <sup>Im</sup> , Agg <sup>+</sup>	Derivat BGBM50-8
BGBM50-11	Bak <sup>+</sup> , Bak <sup>Im</sup> , Agg <sup>+/-</sup>	Derivat BGBM50-8
BGBM50-13	Bak <sup>+</sup> , Bak <sup>Im</sup> , Agg <sup>+/-</sup>	Derivat BGBM50-11
BGBM50-14	Bak <sup>-</sup> , Bak <sup>S</sup> , Agg <sup>+/-</sup>	Derivat BGBM50-11
BGBM50-25	Bak <sup>+</sup> , Bak <sup>Im</sup> , Agg <sup>+/-</sup>	Derivat BGBM50-11
BGBM50-62	Bak <sup>+</sup> , Bak <sup>Im</sup> , Agg <sup>+/-</sup>	Derivat BGBM50-11
BGBU1-4/8	Bak <sup>+/-</sup> , Bak <sup>Im/s</sup>	Derivat BGBU1-4
BGBU1-4/29I	Bak <sup>-/-</sup> Bak <sup>S</sup>	Derivat BGBU1-4

Bak<sup>+</sup> - bakteriocinska aktivnost; Bak<sup>+/-</sup> - slabija bakteriocinska aktivnost; Bak<sup>-</sup> - nema bakteriocinske aktivnosti; Bac<sup>S</sup> – senzitivnost na bakteriocin; Bac<sup>Im</sup> - imununost na bakteriocin; Agg<sup>+</sup> - jaka agegacija; Agg<sup>+/-</sup> - slaba agegacija.

Konstrukti soja *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081, kojima su nokautirani geni za sintezu bakteriocina, su navedeni u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Konstrukti korišćeni za konstrukciju „knock out“ mutanata

<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	$\Delta$ $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 i A1 hsdR17(rk <sup>-</sup> mk <sup>-</sup> ) supE44thi-1gyrA relA1	(Hanahan, 1983)
EC101	JM101 sadrži repA gen u pWV01	(Law et al., 1995)
DH5 $\alpha$ / pGem-T-easylcnG		Ovaj rad
DH5 $\alpha$ / pGem-T-easylctLMG		Ovaj rad
DH5 $\alpha$ / pGem-T-easyLL/LD		Ovaj rad
EC101/ pG <sup>+</sup> host9lcnG		Ovaj rad
EC101/ pG <sup>+</sup> host9lctLMG		Ovaj rad
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Lactis</i>		
LMG2081/pG <sup>+</sup> host9lcnG	LcnG <sup>-</sup> , LctLMG <sup>+</sup> , LctLMG <sup>lm</sup>	Ovaj rad
LMG2081/ pG <sup>+</sup> host9lctLMG	LcnG <sup>+</sup> , LctLMG <sup>-</sup> , LcnG <sup>lm</sup>	Ovaj rad



## 4.4. Plazmidi

U delu rada u kojem je rađena konstrukcija „knock out“ mutanata soja *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081, kojem su tom prilikom atenuirani geni za sintezu bakteriocina, korišćeni su plazmidi i konstrukti plazmida prikazani u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Spisak korišćenih plazmida i konstrukata plazmida

Plazmid	Karakteristike plazmida	Izvor ili referenca
pG <sup>+</sup> host9	Em <sup>r</sup> , termosenzitivan vektor	(Maguin et al., 1996)
pG <sup>+</sup> host9lcnG	pG <sup>+</sup> host9 nosi fragment <i>lcnG</i> gena	Ovaj rad
pG <sup>+</sup> host9lctLMG	pG <sup>+</sup> host9 nosi fragment <i>lctLMG</i> gena	Ovaj rad
pGem-T-Easy	3015 bp; Amp <sup>r</sup> ; vektor za kloniranje PCR fragmenata	Promega
pGem-T-easylcnG		Ovaj rad
pGem-T-easylctSN		Ovaj rad
pGem-T-easyLL/LD		Ovaj rad

Em<sup>r</sup> – rezistencija na eritromicin; Amp<sup>r</sup> – rezistencija na ampicilin

## 4.5. Metode rada sa bakteriocinima

### 4.5.1. Bakteriocinska aktivnost laktokoka

Ispitivanje bakteriocinske aktivnosti selekcionisanih laktokoka je rađeno sledećim metodama: difuzioni test sa bunarčićima (opisana metod a poglavlju Materijal i Metode, na strani 42), metod iskapavanja i testiranje bakterijskih kolonija.

**Metod iskapavanja** – ispitivanje bakteriocinske aktivnosti koje rađeno tako što su petri šolje sa čvrstom podlogom prelivane sa soft agarom koji je inokulisan sa 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> ćelija indikatorskog soja/mL medijuma, kao i prethodni metod. Površinski sloj soft agara je sušen na vazduhu pod sterilnim uslovima, a zatim je bakteriocinski preparat

ukapavan na jedno obeleženo mesto. Inkubacija se odvijala na temperaturama optimalnim za indikator soj. Prosvetljene zone na mestima gde je ukapan bakteriocinski preparat svedočile su o aktivnosti bakteriocina.

**Testiranje bakterijskih kolonija** – u nekim slučajevima potrebno je testirati samo bakterijsku koloniju na bakteriocinsku aktivnost. Izrasle kolonije ispitivanog soja se sterilnim čačkalicama su presejavane na nov agar povlačeći kratke linije, a zatim je, nakon sušenja na vazduhu pod sterilnim uslovima, agar sa presejanim sojem, prelivan soft agarom koji sadrži  $10^3$ - $10^4$  ćelija indikator soja/mL medijuma. Inkubacija se odvijala na temperaturama optimalnim za indikator soja, a prosvetljene zone oko presejanih testiranih sojeva su ukazivale na bakteriocinsku aktivnost.

#### **4.5.2. Čišćenje plazmida iz laktokoka**

Čišćenje plazmida iz laktokoka je rađeno istovremenim delovanjem subletalne temperature ( $41^{\circ}\text{C}$ ) i subletalne koncentracije novobiocina ( $8\ \mu\text{g/mL}$ ). Ovim procesom vršen je proces izbacivanja plazmida koji nosi gene za sintezu bakteriocina i imunost. Da bi se izbegao letalni efekat sintetisanog bakteriocina na ćelije koje su izgubile plazmid, prekonoćna kultura soja je razblažena svežim medijumom (GM17) koji je sadržao subletalnu koncentraciju novobiocina ( $8\ \mu\text{g/mL}$ ), tako da se postigne  $10^3$  ćelija/mL medijuma. Ćelije su na svaka dva sata inkubacije na temperaturi od  $41^{\circ}\text{C}$ , centrifugirane 15 min na 4000 rpm na sobnoj temperaturi. Talog bakterijskih ćelija je resuspendovan u svežem medijumu sa subletalnom koncentracijom novobiocina. Ovaj postupak je ponovljen 6 puta, a zatim su kulture ( $100\ \mu\text{L}$ ) razmazivani na petri šolje sa razlivenim GM17 agarom i inkubirane na  $30^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.5.3. Ispitivanje biohemijskih karakteristika bakteriocina**

U cilju testiranja biohemijskih karakteristika bakteriocina ispitivanih izolata laktokoka, pripremljen je bakteriocinski preparat. Ćelijske kulture ispitivanih izolata laktokoka su inkubirane na temperaturi od  $30^{\circ}\text{C}$ , tokom 16 h. Ćelije su taložene centrifugiranjem na 4500 rpm, tokom 5 min. Nakon toga, supernatant je prebacivan u čiste epruvete i oslobođen od ćelija filtriranjem kroz sterilne filtere  $0,45\ \mu\text{m}$ . Kako bi se

otklonila mogućnost delovanja kiseline, supernatanti su, nakon filtriranja, neutralisani do pH vrednosti 7, korišćenjem 1 M NaOH.

#### **4.5.3.1. Testiranje uticaja različitih temperatura na stabilnost bakteriocinskog preparata**

Bakteriocinski preparat testiranih laktokoka, koji je pripremljen na način opisan u prethodnom odeljku, je testiran na delovanje različitih temperatura u opsegu od 40°C-100°C sa razmakom od 10°C u toku 10, 30 i 60 min. Pored testiranja aktivnosti bakteriocinskih preparata testiranih laktokoka na visokim temperaturama, testirana je njihova aktivnost i nakon tretmana na niskim temperaturama. Bakteriocinski preparati su čuvani na +4°C i -20°C tokom 30 dana, a testiranje bakteriocinske aktivnosti je rađena svakih 7 dana. Nakon temperiranja bakteriocinskih preparata na sobnoj temperaturi, difuzionim testom sa bunarčićima, ispitivana je aktivnost bakteriocina, rezultati su očitani merenjem zona inhibicije od ivice bunarčića.

#### **4.5.3.2. Ispitivanje različitih pH vrednosti na stabilnost bakteriocinskih preparata**

Aktivnost bakteriocinskih preparata na različitim pH vrednostima je testirana tako što je im je podešavana pH vrednost u opsegu od 1-12 (1M HCl i 1M NaOH) sa razmakom od jedne pH jedinice. Nakon podešavanja pH vrednosti, preparati su inkubirani na 30°C tokom 1 h, a zatim je testirana bakteriocinska aktivnost na već opisan način. U ovom testiranju kao kontrola, korišćen je soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGMN1-596 (Tabela 3) bez bakteriocinske aktivnosti, kako bi se eliminisao uticaj pH na indikator soj. Ispitivanje aktivnosti bakteriocina korišćenjem difuzione metode sa bunarčićima, a rezultati su očitani merenjem zona inhibicije od ivice bunarčića.

#### **4.5.3.3. Efekat delovanja različitih enzima na bakteriocinske preparate**

Za ispitivanje delovanja različitih enzima na bakteriocine, korišćeni su: pronaza E, proteinaza K, pepsin, tripsin, lizozim, lipaza, DNKaza, RNKaza. Pronaza E i proteinaza K su rastvorene u 0,01 M Tris-HCl puferu, pH 8; tripsin i lizozim u 0,05 M Tris-HCl puferu, pH 8; pepsin u 0,02 M HCl, pH 2; lipaza, DNKaza, RNKaza su

rastvoreni u 0,05 M Na-fosfatnom puferu, pH 6,5. Bakteriocinski preparati su upareni 2x, a enzimi su rastvarani u odgovarajućim puferima. Bakteriocinski preparat i rastvor enzima su pomešani u odnosu 1:1 i inkubirani na 37°C tokom 1 h. Nakon toga je, na već opisan način, korišćenjem difuzionog metoda sa bunarčićima, testirana bakteriocinska aktivnost. Kao kontrole su korišćeni: bakteriocinski preparat sa odgovarajućim puferom u odnosu 1:1; samo enzim sa puferom; samo pufer.

## **4.6. Metode izolacije DNK**

### **4.6.1. Izolacija totalne DNK iz laktokoka**

Za izolaciju totalne DNK iz laktokoka, korišćena je modifikovana metoda (Hopwood et al., 1985). Bakterijske kulture su rasle u odgovarajućem medijumu na optimalnim temperaturama do logaritamske faze rasta ( $A_{600}=0,6-0,8$ ). Talog ćelija je dobijen centrifugiranjem na 4500 rpm tokom 10 min, opran u 500  $\mu$ L TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH 8; 10mM EDTA pH 8; 50 mM NaCl), a zatim resuspendovan u 500  $\mu$ L PP pufera (0,5 M saharoze; 40 mM  $\text{NH}_4$ -acetata; 10 mM Mg-acetata; pH 7) sa dodatkom lizozima u koncentraciji 4 mg/mL. Ćelije su inkubirane na 37°C tokom 30 min. Nakon toga, dodato je 250  $\mu$ L 2% natrijum dodecil-sulfata (SDS) i suspenzija je intezivno mešana na vorteksu u trajanju od 1 min. Posle ovog koraka, vršeno je odstranjivanje proteina dodavanjem 250  $\mu$ L neutralnog fenol-hloroforma, rastvor je intezivno mešan na vorteksu u trajanju od 30 sekundi, a zatim je centrifugiran na 13000 rpm tokom 2 min (5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Supernatant je pažljivo skupljan, ukoliko je sadržao nečistoće, proces fenolne ekstrakcije je ponavljan sve dok nije dobijen potpuno čist uzorak. Supernatantu je dodat 3M Na-acetat, pH 4,8 (1/10 volumena) i izopropanol (1 volumen), a zatim nakon laganog mešanja, inkubiran je na sobnoj temperaturi tokom 5 min. Ukupna DNK je istaložena centrifugiranjem na 13000 rpm tokom 2 min. Talog je ispran hladnim etanolom (75%), a nakon centrifugiranja na 13000 rpm tokom 2 min, talog je osušen i resuspendovan u 50  $\mu$ L rastvora RNKaze (10 mg/mL). Rastvor je na kraju inkubiran na 37°C tokom 30 min, kako bi bila odstranjena RNK. Ovako izolovana DNK je stabilna i pogodna za digestiju restrikcionim enzimima.

#### 4.6.2. Izolacija plazmidne DNK iz laktokoka

Metoda izolacije plazmidne DNK iz laktokoka je rađena po modifikovanoj metodi O'Sullivan i Klaenhammer (1993). Prekonoćna kultura je razblažena 10 puta u GM17 medijumu, a zatim inkubirana na 30°C do postizanja logaritamske faze rasta  $A_{600}=0,6-0,8$ . Kultura je centrifugirana na 4500 rpm tokom 5 min, a zatim talog ćelija opran u 500  $\mu$ L TEN pufera pH 8 (50 mM Tris-HCl pH 8; 10mM EDTA pH 8; 50 mM NaCl). Suspenzija ćelija je centrifugirana (13000 rpm tokom 1 min) i talog resuspendovan u 200  $\mu$ L PP pufera (pufera (0,5 M saharoze; 40 mM  $\text{NH}_4$ -acetata; 10 mM Mg-acetata; pH 7) sa dodatkom lizozima u koncentraciji 4 mg/mL. Ćelije su inkubirane na 37°C tokom 30 min. Nakon toga, dodato je 400  $\mu$ L alkalnog rastvora SDS-a, koji se pravi neposredno pre dodavanja liziranim ćelijama (3% SDS, 0,2 M NaOH). Smeša je blago promešana i inkubirana na sobnoj temperaturi od 5-10 min. Zatim je dodato 300  $\mu$ L ohlađenog 3M Na-acetata (pH 4,8), smeša je blago promešana i inkubirana na -20°C tokom 20 min. Nakon inkubacije, sledilo je centrifugiranje 13000 rpm tokom 20 min, supernatant je prebačen u nove mikro tube i dodat mu je izopropanol u odnosu 1:1. Nakon centrifugiranja rastvora, 13000 rpm tokom 15 min, supernatant je odbačen, talog je prosušen na vazduhu i resuspendovan u 320  $\mu$ L vode sa dodatkom 200  $\mu$ L etidijumskog rastvora (7,5 M  $\text{NH}_4$ -acetata; 0,5 mg/mL etidijumbromida) i 350  $\mu$ L fenol hloroforma. Suspenzija je intezivno promešana (vorteks), pa centrifugirana (13000 rpm tokom 10 min). Odvajaju se dve faze, gornja faza je prabačena u nove mikro tube, i dodato je 1 mL 96% etil-alkohola (-20°C). Rastvor je centrifugiran (13000 rpm tokom 20 min), a zatim je na kraju talog ispran u 75% etil alkoholu, osušen na vazduhu i rastvoren u 20-40  $\mu$ L rastvora RNKaze.

#### 4.6.3. Izolacija plazmidne DNK iz *Escherichia coli* (DH5a i EC101)

Izolacije plazmidne DNK iz ćelija *E. coli* nakon transformacija rađena je po modifikovanoj metodi „JET star“ protokola (*JET star*, GENOMED GmbH, Lohne, Nemačka). Ćelije *E. coli* su rasle u 3 mL medijuma do logaritamske faze rasta ( $A_{600}=0,6-0,8$ ). Nakon toga su ćelije su istaložene centrifugiranjem na 13000 rpm tokom 2 min. Talog ćelija je resuspendovan u 200  $\mu$ L E1 pufera (50 mM Tris-HCl pH

8, 10 mM EDTA pH 8), intezivnim mešanjem na vorteksu. U rastvor je dodato 200 µL E2 pufera (200 mM NaOH, 1% SDS) uz vrlo oprezno i lagano mešanje do homogenizacije lizata. Nakon toga, dodato je 200 µL rastvora E3 (3 M K-acetat pH 5.5), radi neutralizacije. Smeša je centrifugirana na 13000 rpm tokom 10 min. Supernatant je pažljivo prebačen u nove mikrotube i dodato je 200 µL smeše fenol-hlorofoma uz intezivno mešanje na vorteksu u trajanju od 1 min. Smeša je centrifugirana, a gornja faza je prenetu u nove mikrotube i dodat je izopropanol (0,7 volumena) radi precipitacije DNK. Nakon centrifugiranja na 13000 rpm tokom 20 min, talog DNK je opran hladnim etanolom (75%). Talog je opet izdvojen centrifugiranjem na 13000 rpm tokom 2 min i nakon sušenja, rastvoren u rastvoru RNKaze (1 mg/mL). Kako bi se otklonila sva RNK, DNK je inkubirana na 37°C tokom 30 min.

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

#### **4.7. Sekvenciranje genoma *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBM50 i LMG2081**

U cilju poređenja sekvence operona odgovornih za sintezu bakteriocina kao i u cilju u pronalaženja operona za sintezu dodatnog bakteriocina, sekvencirani su genomi sojeva *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 i LMG2081. Iz sojeva BGBM50 i LMG2081, izolovane su genomske DNK i sekvencirane su u centru „Norwegian Sequencing Centre“ (sequencing.uio.no) korišćenjem „Illumina MiSeq Sequencing Centre“. Za svaki soj urađeno je po 1,5 milion čitanja (2-250 bp). Preliminarno sklapanje genoma urađeno je pomoću AbySS softvera (Simpson et al., 2009).

#### **4.8. Enzimske reakcije sa DNK**

##### **4.8.1. Umožavanje DNK fragmenata – PCR („polymerase chain reaction“)**

U cilju molekularne determinacije testiranih laktokoka, kao i radi determinacije bakteriocina izolata laktokoka, metodom PCR su umnožavani fragmenti korišćenjem

specifičnih prajmera (Tabela 7). Procedura je rađena tako što je totalna ili plazmidna DNK (0,1-1 µg) dodata reakcionoj smeši koja je sadržala sledeće: reakcioni pufer (1x) sa 1,5 mL MgCl<sub>2</sub> (*Kapa Biosystems, Inc.*, Boston, MA, USA); dNTP smeša (svaki dNTP po 200µM); prajmere (svaki po 2,5 µM); DNK polimeraza (1U) (*Kapa Biosystems, Inc.*, Boston, MA, USA).

Za sve PCR reakcije, dizajnirani su prajmeri na osnovu sekvence određenih gena. PCR reakcije su rađene po sledećem programu: početna denaturacija 5 min na 94°C, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 30 sek na 94 °C; vezivanje prajmera 30 sek na različitim temperaturama; polimerizacija lanaca, 60 sek na svakih 1000 bp umnožene DNK na 72 °C; poslednji ciklus, polimerizacija 7 min na 72 °C. Temperature vezivanja specifičnih prajmera, date su u Tabeli 7.

Svi PCR produkti proveravani su sekvenciranjem nakon prečišćavanja, pri čemu je korišćen kit za prečišćavanje PCR produkata (QIAquick PCR Purification KIT/250 (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka). Uzorci su sekvencirani u centru za sekvenciranje Microgen sequencing service, Holandija. Sekvence su analizirane koristeći NCBI bazu podataka, BLAST programom (Altschul et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

**Tabela 7.** Sekvence prajmera korišćenih u ovom radu

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5`-3`)	Gen i temperatura vezivanja	Izvor ili referenca
LcnG-Fw	GAAAGAATTATCAGA AAAAG	Laktokokcin G 52°C	(Alegria et al., 2010)
LcnG-Rev	CCACTTATCTTTATTT CCCTCT	Laktokokcin G 52°C	(Alegria et al., 2010)
LctSN-Fw	TGCAGAAGTGGTTAC GG	Lakticin LMG 47°C	Ovaj rad
LctSN-Rev	GGTTGAATAAGCAGG AG	Lakticin LMG 47°C	Ovaj rad
LL	CCATTTTGCTAGTACA	62°C	Ovaj rad

GTC			
LD	GAACATAGTATGCAA AGGGG	62°C	Ovaj rad
Lact481-F	CCAATGTCATTGCATC TGCAC	Lakticin 481 50°C	(Alegria et al., 2010)
Lact481-R	GTCCTTATGTTGCTAT TCATC	Lakticin 481 50°C	(Alegria et al., 2010)
Lcn972-F	TTGTAGCTCCTGCAG AAGGAACATGG	Laktokokcin 972 50°C	(Martínez et al., 1999)
Lcn972-R	GCCTTAGCTTTGAATT CTTACCAAAAG	Laktokokcin 972 50°C	(Martínez et al., 1999)
LactGQ-F	GAAAGAATTATCAGA AAAAG	Laktokokcin Q 50°C	(Alegria et al., 2010)
LactGQ-R	CCACTTATCTTTATTT CCCTCT	Laktokokcin Q 50°C	(Alegria et al., 2010)
Lact3147-F	GTCTTTGTGTTGTTTG GAGATG	Lakticin 3147 50°C	(Alegria et al., 2010)
Lact3147-R	CAACTCCCGAAATAA ATCATCG	Lakticin 3147 50°C	(Alegria et al., 2010)
LactM – F	GAAGAGGCAATCAGT AGAG	Laktokokcin M 50°C	(Alegria et al., 2010)
LactM -R	GTGTACTGGTCTAGC ATAAG	Laktokokcin M 50°C	(Alegria et al., 2010)
P1 <sub>16S</sub>	GAGAGTTTGATCCTG GC	16S rDNK 55°C	(Jovcic et al., 2009)
P2 <sub>16S</sub>	AGGAGGTGATCCAGC CG	16S rDNK 55°C	(Jovcic et al., 2009)

#### 4.8.2. Digestija i ligacija DNK

U postupku kloniranja, kad je bilo potrebno dobiti odgovarajuće DNK fragmente, korišćen je proces digestije DNK molekula. Takođe, procesi digestije DNK



molekula su rađeni prilikom testiranja plazmidnih profila i prilikom PFGE metode. Uslovi za sečenje DNK restrikcionim enzimima, količina enzima, pufer i temperatura inkubacije, određivani su prema uputstvu proizvođača (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija). U procesima kloniranja, kad je bilo potrebno ubaciti željeni fragment u vektor, korišćen je proces ligacije. 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, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, BSA 25 µg/ml) sa 1U T4 DNK ligaze (New England BioLabs, SAD) u odgovarajućem odnosu i inkubiranjem 16 h na 16°C.

## **4.9. Transformacija ćelija sa DNK**

### **4.9.1. Transformacija *Escherichia coli***

Nakon ligacije fragmenata DNK molekula i vektora za kloniranje, vršena je transformacija kompetentnih ćelija *E. coli* ligacionom smešom. Transformacija je rađena u cilju umožavanja konstrukata od interesa.

**Kompetentne ćelije** - Prvi korak, pre transformacije je bila priprema kompetentnih ćelija *E. coli* za transformaciju temperaturnim šokom, po modifikovanoj metodi sa rubidijum-hloridom (Hanahan, 1985). Deset kolonija *E. coli* je pokupljeno sa sveže petri šolje (LA) i resuspendovano u 1 mL LB medijuma, a zatim je prebačeno u 100 mL LB medijuma. Ćelije su inkubirane na 37°C uz aeraciju (180 rpm) do logaritamske faze rasta ( $A_{600}=0,3-0,6$ ). Rast bakterijske kulture je prekinut prebacivanjem na led i hlađenjem 15 min. Nakon toga su ćelije istaložene centrifugiranjem 5000 rpm tokom 10 min na 4°C (klinička centrifuga 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Talog je resuspendovan laganim mešanjem, sa prethodno ohlađenim, 0,1 M CaCl<sub>2</sub> i ostavljen je na ledu tokom 15 min. Ćelije su ponovo istaložene centrifugiranjem 5000 rpm tokom 10 min, a talog ovog puta resuspendovan 1/12,5 volumena RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 15% glicerola, pH 6,8). Suspenzija ćelija je inkubirana na ledu tokom 15 min, a zatim prebačena u mikrotube po 200 µL. Mikrotube sa ćelijama su ubacivane u tečni azot radi brzog smrzavanja ćelija, a zatim čuvane na -80°C do korišćenja.

**Transformacija *E. coli* kompetentnih ćelija toplotnim šokom** (“*Heat shock*”) – Kompetentne ćelije *E. coli* su se odmrzavale na ledu, a zatim im se dodavalo najmanje 200 ng (u zapremini ne više od 20  $\mu$ L) plazmidne DNK ili prečišćene ligacione smeše. Suspenzija u mikrotubama je inkubirana na ledu tokom 60 min uz blago mešanje na svakih 15 min. Nakon toga, ćelije su izlagane temperaturnom šoku (42°C) u trajanju od 90 sek, a zatim odmah prebačene na led i inkubirane 5 min. Posle toga, ćelijskoj suspenziji je dodato 300  $\mu$ L LB medijuma. Smeša je inkubirana 37°C tokom 30-60 min uz aeraciju. Suspenzija je razmazana na petri šolje sa LA podlogom sa dodatkom odgovarajućeg antibiotika, a zatim su ćelije inkubirane na 37°C do pojave kolonija (transformanata).

#### 4.9.2. Transformacija laktokoka

Transformacija laktokoka rađena je u cilju inaktivacije bakteriocinskih gena *lcnG* i *lcnM* u soju *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081. Geni *lcnG* i *lcnM* su sastavni deo operona odogovornih za sintezu bakteriocina laktokocina G i lakticina LMG. Kao i kod transformacije *E. coli*, i kod transformacije laktokoka, prvi korak je bila priprema kompetentnih ćelija. Priprema kompetentnih ćelija je rađena po modifikovanoj metodi Holo i Nes (1989). Inokulum prekonoćne kulture laktokoka (1%) je zasejan u 50 mL GM17 medijuma sa 1% (v/v) glicina. Kultura je inkubirana na 30°C do dostizanja log faze rasta  $A_{600}=0,2-0,6$ . Ćelije su centrifugirane na 3500 rpm tokom 10 min, a zatim oprane u 20 mL sterilne bidestilovane vode. Ovaj postupak je ponovljen dva puta, a na kraju je talog ćelija resuspendovan u 200  $\mu$ L sterilne bidestilovane vode. U suspenziju ćelija je dodato 1  $\mu$ g plazmidne DNK, smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi tokom 5 min, a zatim je prebačena u kivetu za elektroporaciju (dijametar 0,2 cm). Elektroporacija bakterija je urađena korišćenjem GENE PULSER aparata (*Eppendorf*, Hamburg, Nemačka). Pri otporu od 200  $\Omega$ , ćelije su podvrgnute pulsu jačine 2450 V/cm. Odmah nakon pulsiranja, dodato je 800  $\mu$ L GM17 medijuma uz mešanje. Nakon toga, suspenzija je inkubirana na 30°C tokom 2 h, a zatim je suspenzija utrljana u petri šolje sa GM17 agarom sa odgovarajućim antibiotikom. Petri šolje su inkubirane na 30°C do pojavljivanja kolonija (transformanata).

## 4.10. Konstrukcija „knock-out“ mutanata soja *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081

U cilju potvrde da soj *L. lactis* ssp *lactis* LMG2081 sintetiše dva bakteriocina, konstruisani su mutanti sa inaktiviranim genima odgovornih za sintezu ta dva bakteriocina. Za konstrukciju „knock-out“ mutanata u genima za sintezu laktokokcin G i lakticin LMG bakteriocina, korišćen je termosenzitivni plazmid, koji nosi rezistenciju na eritromicin, pG<sup>+</sup>host9. Ovaj plazmid se normalno replikuje na permisivnoj temperaturi (28°C), dok se na nepermisivnoj temperaturi za replikaciju (iznad 37°C) integriše u hromozom ili plazmid domaćina metodom homologe rekombinacije ili se gubi iz populacije (Maguin et al., 1996). PCR produkti 378 bp i 814 bp su korišćeni da poremete funkcionisanje *lcnG* i *lmgM* gena, redom. Prvo su PCR fragmenti klonirani u vektor pGem-T-easy (Promega, Medison, WIS, SAD), i dobijeni su plazmidni konstrukti pGem-T-easy<sub>lcnG</sub> i pGem-T-easy<sub>lctLMG</sub>. Nakon toga, fragmenti su subklonirani u plazmid pG<sup>+</sup>host9, koristeći *EcoRI* restrikcioni enzim. Dobijeni su plazmidni konstrukti pG<sup>+</sup>host9<sub>lcnG</sub> i pG<sup>+</sup>host9<sub>lctLMG</sub>. Dalje su ovi konstrukti transformisani u LMG2081, elektroporacijom. Transformanti su dobijeni na temperaturi od 28°C. Kako bi se omogućila integracija konstrukata, transformanti su striklovani na petri šolje sa GM17 agarom sa eritromicinom (10 µg/mL) i inkubirani su na 37°C tokom 48 h. Izrasli transformanti su testirani na osnovu bakteriocinske aktivnosti i hibridizacijom.

## 4.11. Elektroforeza i elucija DNK

### 4.11.1. Horizontalna elektroforeza na agaroznom gelu

Radi očitavanja rezultata PCR reakcije, digestije i plazmidnih profila, korišćena je horizontalna gel elektroforeza. Za pravljenje gelova je korišćena agarozna (1%), a gelovi su bojani korišćenjem etidijum bromida. Vizuelizacija dobijenih proizvoda reakcije je rađena korišćenjem transluminatora (Biometra). Gelovi su napravljeni otapanjem agaroze u TAE (1x) puferu (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA), uz

dodavanje etidijum-bromida (0,5 µg/mL). TAE (1x) je korišćen i kao pufer za elektroforezu. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm. Veličine PCR produkata, kao i DNK fragmenata dobijenih posle sečenja restrikcionim enzimima, određivani su na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine pređenog puta u odnosu na dužinu koji su prešli DNK fragmenti poznate veličine (standard, Gene Ruler – 100 bp DNA Ladder, Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija).

#### **4.11.2. Elektroforeza u pulsirajućem električnom polju („*Pulsed Field Gel Electrophoresis*“- PFGE)**

PFGE je metoda koja je rađena radi potvrđivanja da derivati dobijeni nakon čišćenja plazmida imaju poreklo divljeg soja, kao i u cilju potvrde dobijenih „knock-out“ mutanata. Metoda je rađena po metodi Kojića et al. (2006). Pojedinačne kolonije sa GM17 podloge su zasejane u GM17 medijum i inkubirane na 30°C preko noći. Inokulum prekonoćne kulture je zasejan u GM17 medijum (1%). Čelije su inkubirane na 30°C do postizanja log faze rasta ( $A_{600} = 0,2-0,6$ ). Nakon toga, 1.5 mL inokuluma ćelija je centrifugiran (4500 rpm tokom 10 min), a zatim je talog ćelija opran sa 1 mL EET pufera (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM TRIS, pH 7,5-8). U suspenziju je dodato 50 µL fenola. Smeša je homogenizovana i opet centrifugirana (13000 rpm tokom 2 min). Nakon toga, fenol je izvučen mikropipetom sa dna mikrotube, a ostatak je centrifugiran (13000 rpm tokom 2 min), nakon čega je supernatant odliven a talog ćelija resuspendovan u 50 µl EET pufera. Smeša je potom inkubirana 10 min na 42°C. Po isteku vremena, dodato je 50 µL 2% agaroze (*Lonza, Rockland, USA*), istopljene i ohlađene na 42°C, u 50 µL inkubirane smeše, dobro promešano i izliveno u kalupe koji su ostavljeni na 4°C kako bi se stegli. Nakon 10 min blokčići su izvučeni iz kalupa i preneti u 500 µL rastvora (EET pufer, 0,05% N-lauryl sarcosine, lizozim 4 mg/mL) i inkubirani 24 h na 37°C.

Nakon 24 h, rastvor sa lizozimom je odliven, a blokčići su inkubirani 24 h na 50°C u 500 µl rastvora (EET pufer, 0,5% SDS, 0,5 µg/ml proteinaza K). Kada su blokčići postali prozirni (nakon 24 h), rastvor je odliven, a dodato je 10 mL PMSF-a (phenylmethylsulfonyl fluoride) rastvorenog u vodi (0,5 mM). Smeša je mešana na sobnoj temperaturi 30 min, a potom je postupak ponovljen, odliven je prethodni

rastvor, a dodato opet 10 mL rastvora PMSF-a. Nakon ponovnog mešanja 30 min na sobnoj temperaturi, prethodni rastvor je odliven, a dodato je 5 mL sterilne bi-destilovane vode i ovaj postupak je takođe ponovljen dva puta. Nakon toga blokčići su najpre preinkubirani u purefu za restrikcioni enzim a zatim podvrgnuti digestiji sa različitim restrikcionim enzimima (*SmaI*, *NotI*). Nakon 3 h inkubiranja, ceo rastvor je odliven a reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 µl „STOP PFGE“ pufera (40% saharoza, 100 mM EDTA pH 8, brom fenol plavo). Za PFGE korišćen je 1,2% agarozni gel rastvoren u 0,5 x TBE puferu. Uslovi pod kojima je tekla elektroforeza su konstantna jačina struje od 300 mA, trajanje pulsa od 8 sek u trajanju od 8 h i 18 sek u trajanju od 10 h.

#### **4.11.3. Elucija DNK fragmenata**

Elucija PCR produkata ili DNK fragmenata dobijenih nakon digestije restrikcionim enzimima, vršena je tako što su prvo željeni fragmenti isečeni iz gela i prebačeni u mikro tube, a u cilju dalje pripreme dobijenih fragmenata za sekvenciranje i kloniranje, korišćen je kit za ekstrakciju DNK iz gela (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka).

#### **4.12. DNK-DNK hibridizacija („Southern blot“)**

U cilju potvrde uspešnosti konstrukcije „knock-out“ mutanata u bakteriocinskim genima *lcnG* i *lcnM*, koji su odgovorni za sintezu bakteriocina laktokocin G i lakticin LMG u soju *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081, posle bakteriocinski testova i PFGE analize, urađena je DNK-DNK hibridizacija. Takođe, ovim eksperimentom ispitano je da li se operoni za sintezu ova dva bakteriocina nalaze na plazmidu ili na hromozomu.

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

U prvom koraku eksperimenta DNK-DNK hibridizacije, soj LMG2081 i njegovi mutanti, LMG2081/pG+host9lctLMG i LMG2081/pG+host9lcnG, su analizirani PFGE metodom. Nakon toga, gel PFGE je izložen delovanju UV svetla (5

min), kako bise izvršila dimerizacija timina, a nakon toga je rađena denaturacija u denaturacionom puferu (1,5 M NaCl i 0,5 M NaOH) tokom 20 min i neutralizacija 2 x po 20 min u neutralizacionom puferu (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 7,5). Dalje je metoda DNK-DNK hibridizacije je rađena po metodi „Southern-blota“ (Southern, 1975). Nakon tretmana gela, postavljen je na 3 milimetarski papir (3MM), koji je u stvari most između pufera u rezervoaru i gela, a koji su prethodno potopljeni u rastvor 20xSSC pufer (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat, pH 7), tako da je strana sa rupicama za nanošenje DNK okrenuta na dole, a oko gela su postavljeni graničnici. Preko gela je postavljena najlonska membrana, istih dimenzija kao i gel, a preko nje dva 3 MM papira navlažena u 20xSSC puferu. Na kraju je postavljen sloj upijajućeg papira debljine oko 10 cm i sve je opterećeno tegom od 1 kg. Transfer DNK je izvršen u toku od 24 h u 20xSSC puferu. Nakon 24 h, najlonksa membrana je dva puta potopljena 5xSSC puferu tokom 2 min. Membrana je sušena na sobnoj temperaturi, dok je fiksiranje DNK za membranu rađeno pečenjem membrane 2 sata na 80°C u pećnici.

#### **4.12.2. Obeležavanje probe sa dioksigenin-dUTP-om**

U cilju vizuelizacije signala tokom procesa hibridizacije DNK, DNK probe su obeležavane dioksigenin-dUTP. Za obeležavanje probe, korišćen je kit „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Nemačka), po uputstvu proizvođača. U 1 µg denaturisane probe kuvanjem (PCR produkt od 814 bp, deo *lmgM* gena), dodata je smeša koja se sastojala 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, pH 7,5), 2 µL mešavine heksanukleotida (10 x koncentrovan) i „Klenow“ enzim za obeležavanje (2 U/µL), a bidestilovana voda je dodata do finalne zapremine od 15 µL. Ova smeša je inkubirana preko noći na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 µL 0,2 M EDTA, pH 8. Pre hibridizacije, proba je prvo precipitirana etanolom (96%, -20°C) kako 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.

#### 4.12.3. Neradiokativna DNK/DNK hibridizacija

Hibridizacija DNK sa neradioaktivno obeleženom probom rađena je na sledeći način: nakon pečenja membrana je pakovana u kesicu sa 10 mL hibridizacionog pufera (5xSSC koji sadrži 0,1% N-lauril sarkozil, 0,02% SDS, 1% kazein) u kojoj je inkubirana 1 h na temperaturi od 65°C. Zatim je u kesicu dodato 1 mL svežeg hibridizacionog pufera na svakih 10 cm<sup>2</sup> površine membrane u koji je prethodno dodata neradioaktivno obeležena i denaturisana proba. Hibridizacija se odvijala 24 h na 65 °C. Membrana je nakon hibridizacije oprana dva puta po 15 min: prvo u rastvoru I (2xSSC, 0,1% SDS) na sobnoj temperaturi, a zatim u rastvoru II (0,5xSSC, 0,1% SDS) na 65°C. „DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) korišćen je za detekciju hibrida. Pranje membrane i detekcija hibrida su vršeni po uputstvu proizvođača.

#### 4.13. Prečišćavanje i masena spektrometrija bakteriocina lakticin LMG

U cilju potvrde aktivnosti čistog bakteriocina lakticina LMG iz soja *L. lactis* ssp *lactis* LMG2081, rađeno je njegovo prečišćavanje. Dobijene frakcije, su nakon prečišćavanja, testirane na bakteriocinsku aktivnost metodom ukapavanja. Radi potvrde molekulske mase bakteriocina lakticin LMG rađena je masena spektrometrija prečišćenog bakteriocina.

##### 4.13.1. Prečišćavanje bakteriocina lakticin LMG

Za prečišćavanje bakteriocina lakticin LMG, korišćen je mutant LMG2081/pG<sup>+</sup>host9lcnG. Početna zapremina od 500 mL kulture, LMG2081/pG<sup>+</sup>host9lcnG, nakon 16 h inkubacije na 30°C je centrifugirana (4500 rpm, 30 min, 4°C). Bakteriocin, prisutan u supernatantu, je precipitiran amonijum-sulfatom 40% (w/v) mešanjem tokom 3 h na 4°C. Precipitat je dobijen nakon centrifugiranja (10000 rpm, 30 min, 4°C), a zatim je resuspendovan u 5 mL mili-Q vode sa 0,1 trifluor – sirćetne kiseline. Bakteriocin je prečišćen korišćenjem reverzno fazne tečne

hromatografije visokih performansi (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). - Äkta Purifier 10 System (GE Healthcare, Uppsala, Švedska), korišćenjem kolone (Discovery® BIO Wide Pore C5, 10 cm × 4,6 mm, 5 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)). Protein je eluiran linearnim gradijentom acetonitrila sa 0.1% TFA (0-90% sa 10 zapremina kolone). Prisustvo peptidnih frakcija, nakon hromatografije, je određivano merenjem apsorbancije na 215 nm. Dobijeni peptidne frakcije su uparavane u vakuum uparivaču (Eppendorf, 5301) a zatim rastvorene u istoj zapremini sterilne bidestilovane vode, a na kraju su testirane na bakteriocinsku aktivnost, metodom ukapavanja.

#### **4.13.2. Masena spektrometrija**

Analiza mase izolovanog bakteriocina je urađena korišćenjem metode masenog spektrometra, kuplovane sa HPLC. Uzorak je nanešen na reverzno-faznu kolonu C18 (RR HT, 1,8 µm, 4,6 x 50 mm) - Zorbax Eclipse XDB-C18 instalirana na 1200 serije HPLC sistem (Agilent Technologies) i razdvojen je gradijentom acetonitrila (5-95% tokom 10 min sa 0,2% mravlje kiseline, 95% tokom 5 min). Maseni spektrometar (Time-of-Flight (TOF) LC-MS sistem (G1969A; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)) je radio u pozitivnom jonskom modu (ESI), režim kapilarnog napona od 4000 V, fragmentor napona od 200 V i masa u rasponu od 100–3200 *m/z*. Softver (Agilent MassHunter Workstation Software and Analyst QS) je korišćen za analizu podataka.

#### **4.14. Antilisterijsko ispitivanje bakteriocina soja *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4**

U cilju eventualne primene bakteriocina soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 u prehrambenoj industriji, kao prirodnog konzervansa hrane, urađen eksperiment delovanja bakteriocinskog preparata soja BGBU1-4 na rast *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u bujonu i model sistemu proizvodnje sira.



#### 4.14.1 Priprema bakteriocinskog preparata

Baktericinski preparat soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 je napravljen metodom amonijum-sulfatne precipitacije. Početna zapremina kulture soja BGBU1-4 od 1L je centrifugirana (5000 rpm, 30 min, 4°C) nakon 16 h inkubacije na 30°C. Bakteriocin, prisutan u supernatantu, je precipitiran amonijum-sulfatom 40% (w/v) mešanjem na magnetnoj mešalici, tokom 3 h na 4°C. Precipitat je dobijen nakon centrifugiranja (10000 rpm, 30 min, 4°C), a zatim je resuspendovan u 10 mL sterilne bidestilovane vode, čime je dobijen finalni bakteriocin koncentrovan sto puta, u donosu na početnu zapreminu. Kako bi preparat bio oslobođen od ćelija, tretiran je na temperaturi od 80°C tokom 5 min. Kao pozitivna kontrola, korišćen je preparat soja *L. lactis* ssp. *lactis* NP45. Dok za negativnu kontrolu korišćen je preparat očišćenog derivata soja BGBU1-4 (BGBU1-4/29I, Bak<sup>-</sup>, Bak<sup>s</sup>). Preparati pozitivne i negativne kontrole, napravljeni su na isti način kao i preparat soja BGBU1-4. Preparati sojeva BGBU1-4, NP45 i BGBU1-4/29I su podešeni na pH 7, korišćenjem 0,1 M NaOH.

#### 4.14.2. Dejstvo bakteriocinskog preparata soja *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 na rast *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u bujonu

U cilju ispitivanja dejstva bakteriocinskog preparata soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 na *Listeria monocytogenes* ATCC19111, trebalo je upotrebiti GM17 bujonsku kulturu sa  $10^5$  cfu/mL. Da bi se odredio zadati broj ćelija u bujonu, prethodno je određena kriva rasta soja *L. monocytogenes* ATCC19111. U GM17 bujon sa  $10^5$  cfu/mL *L. monocytogenes* ATCC19111, dodati su: varijanta A - preparat soja BGBU1-4/29I, negativna kontrola; varijanta B - preparat soja BGBU1-4; varijanta C - preparat soja NP45, pozitivna kontrola. Preparati su u sve tri varijante dodati u odnosu 1:10 u odnosu na zapreminu GM17 bujona. Sve tri varijante su inkubirane na temperaturi od 37°C tokom 48 h. Broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 je praćen na Oxford agaru, na temperaturi inkubacije od 37°C tokom 48 h, u sledećim satima: 0, 2, 4, 6, 8, 24, 48 h. Analiza je rađena u tri ponavljanja.

#### 4.14.3. Dejstvo bakteriocinskog preparata soja *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 na rast *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u model sistemu proizvodnje sira

Model sistem sira je napravljen korišćenjem proizvedenog sira od ultrafiltriranog kravljeg mleka (UF mleka). Sir je homogenizovan i resuspendovan u 2% Na-fosfatnom puferu u odnosu 1:1. Smeša je sterilisana u autoklavu na 100°C tokom 20 min. Tako dobijen model sira, inokulisan je sa  $10^5$  cfu/g *L. monocytogenes* ATCC19111, a zatim su napravljene sledeće varijante: As – sa dodatim preparatom soja BGBU1-4/29I, negativna kontrola; Bs – sa dodatim preparatom soja BGBU1-4; Cs – sa dodatim preparatom soja NP45, pozitivna kontrola. Preparati su u sve tri varijante dodati u odnosu 1:10 u odnosu na masu sira. Dalje je model sistem sira podvrgnut temperaturnim uslovima koji su značajni u procesu proizvodnje i skladištenja sira (Miocinovic et al., 2011). Sve tri varijante modela sira su prvo inkubirane na temperaturi od 16-18°C tokom 24 h, čime je simuliran proces koagulacije. Nakon toga, ispitivane varijante su prebačene na temperaturu od 12°C tokom 7 dana, čime je simuliran proces zrenja sira. Na kraju, sve varijante su skladištene na temperaturi od 4°C tokom 28 dana. Broj ćelija *L. monocytogenes* je praćen tokom celog perioda ispitivanja, sledećom dinamikom:

- 0 dan – odmah nakon dodatka bakteriocinskih preparata u model sira sa *L. monocytogenes* ATCC19111
- 1 dan – nakon inkubacije modela sira na temperaturi 16-18°C tokom 24 h
- 7 dan – nakon inkubacije modela sira na temperaturi od 12°C tokom 6 dana
- 14 dan – nakon skladištenja modela sira na temperaturi od 4°C tokom 7 dana
- 21 dan – nakon skladištenja modela sira na temperaturi od 4°C tokom 14 dana
- 28 dan – nakon skladištenja modela sira na temperaturi od 4°C tokom 21 dan
- 35 dan – nakon skladištenja modela sira na temperaturi od 4°C tokom 28 dana

Za određivanje broja *L. monocytogenes* je korišćen Oxford agar, na temperaturi inkubacije od 37°C tokom 48 h u aerobnim uslovima. Sve analize su urađene u tri ponavljanja.

## **5. REZULTATI**

## 5.1. Izolacija i determinacija laktokoka

Izolacijom na selektivnim podlogama, dobijeno je ukupno 52 izolata čistih kultura od kojih je, na osnovu mikrobiološko-biohemijskih testova, odabrano je 10 izolata (Tabela 8).

**Tabela 8.** Bakteriocinska aktivnost izolata laktokoka

Indikator soj	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGMN1-596
<b>Testirani izolati laktokoka</b>	
BGBM50	+++
BGBM54	+
BGBM51	+
BGBM57	+
LMG2081	++++
LMG2020	++
BGBU1-2	+
BGBU1-28	++
BGBU1-4	++++
BGBU1-20	+

- + - zona inhibicije manja ili jednaka 2 mm; ++ - zona inhibicije veća od 2 mm a manja od 4 mm; +++ - zona inhibicije veća od 4 mm a manja od 6 mm; ++++ - zona inhibicije 6 mm

Na osnovu rezultata bakteriocinske aktivnosti prirodnih izolata laktokoka, koji su prikazani u Tabeli 8, za dalji rad su odabrani izolati BGBM50, LMG2081 i BGBU1-4 koji su pokazali najjaču bakteriocinsku aktivnost u odnosu na indikator soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGMN1-596.

### 5.1.2. Morfološke i fiziološke karakteristike odabranih izolata

Izolat BGBM50 je izolovan i tradicionalno napravljenog mekog sira u Sjeničkom okrugu, dok je izolat BGBU1-4 izolovani iz mekog sira proizvodnog od mešavine kravljeg i ovčijeg mleka, u istočnoj Srbiji. Dalje su ispitivane morfološke i fiziološke karakteristike odabranih izolata laktokoka (Tabela 9).

**Tabela 9.** Morfološke i fiziološke karakteristike odabranih izolata laktokoka

Soj	BGBM50	LMG2081	BGBU1-4
<b>Karakteristike</b>			
Gram +/-	+	+	+
Katalaza +/-	-	-	-
Fermentacija šećera	Homoferm	Homoferm	Homoferm
Rast na 15°C	+	+	+
Rast na 45°C	-	-	-
Rast u prisustvu 2% NaCl	+	+	+
Rast u prisustvu 4% NaCl	+	+	+
Rast u prisustvu 6,5% NaCl	+	+	+

### 5.1.3. Identifikacija odabranih izolata laktokoka

Dalja identifikacija sojeva, rađena je korišćenjem RAPID ID 32 Strep Sistema (bio Merieux) uz API Lab plus softver, za očitavanje rezultata. Rezultati su pokazali da sva tri soja pripadaju vrsti *Lactococcus lactis*. Radi potvrde pripadnosti tri ispitivana soja određenoj vrsti, korišćene su molekularne metode, umnožavanjem 16S rDNK PCR-om korišćenjem totalne DNK izolovane iz sojeva BGBM50, LMG2081, BGBU1-4 kao matrice i prajmera P1<sub>16s</sub> i P2<sub>16s</sub> koji su dizajnirani na osnovu konzerviranog regiona gena za 16S rRNK roda *Lactococcus* sp. (Jovicic et al., 2009). Kao produkt amplifikacije dobijen je fragment očekivane veličine. Nakon prečišćavanja, PCR produkt je sekvenciran (Macrogen's sequencing service, Holandija). Upoređivanjem rezultata nakon sekvenciranja, korišćenjem NCBI baze podataka, pokazano je da sva tri soja pokazuju 99% identičnosti regiona za 16S rRNK sa podvrstom *Lactococcus*

*lactis* ssp. *lactis*, čime je dodatno potvrđena determinacija urađena klasičnim metodama.

## 5.2. Karakterizacija bakteriocina ispitivanih sojeva

Sva tri ispitivana soja, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBM50, LMG2081 i BGBU1-4, pokazivala su izuzetnu bakteriocinsku aktivnost u odnosu na indikator soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGMN1-596 (Tabela 8). U cilju ispitivanja spektra delovanja bakteriocina ispitivanih sojeva, difuzionim testom sa bunarčićima, testirana je bakteriocinska aktivnost na laktokoke, na laktobacile i na najčešće patogene bakterije koje se mogu naći u hrani (Tabela 10).

**Tabela 10.** Spektar antimikrobnog delovanja bakteriocina ispitivanih sojeva

<b>Testirani sojevi</b>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBM50	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LMG2081	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGU1-4
<b>Indikator sojevi</b>			
<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> HN14	-	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 27729	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> H7:O157 ATCC 35150	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC	-	-	-

11778			
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 29930	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	-	-	-
<i>Clostridium botulinum</i>	-	-	-

„+“ - ima bakteriocinske aktivnosti; „-“ - nema bakteriocinske aktivnost

Na osnovu rezultata spektra delovanja bakteriocina ispitivanih sojeva, prikazanih u Tabeli 10, može se konstatovati da bakteriocin soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 ima širi spektar delovanja od bakteriocina sojeva *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 i LMG2081, a tome svedoči njegova aktivnost na *L. monocytogenes* ATCC19111 i *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* HN14. Radi lakšeg prikazivanja rezultata, dalja karakterizacije bakteriocina ispitivanih sojeva je prikazana u posebnim odeljcima, za svaki soj posebno.

### 5.2.1. Karakterizacija bakteriocina soja *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBM50

Za preliminarno testiranje bakteriocinske aktivnosti, korišćen je difuzioni test sa bunarčićima (Tabela 8). U cilju potvrde bakteriocinske aktivnosti, testiranja su dalje rađena sa supernatantom prekonoćne kulture soja BGBM50, koji je neutralisan i tretiran katalazom. Ovim testom se otklanja sumnja da inhibitorno delovanje potiče od mlečne kiseline ili vodonik peroksida. I posle ovog tretmana, supernatant soja BGBM50 je zadržao aktivost. Na kraju, proteinska priroda antimikrobne supstance je potvrđena testom sa kristalom pronaze E pored bunarčića. U prisustvu kristala pronaze E pored bunarčića dolazi do pojave karakterističnog polumesečastog izgleda zone inhibicije usled odsustva antimikrobne aktivnosti u blizini pronaze E, koja degraduje proteine, bakteriocine (Slika 4). Ovim bakteriocinskim testom je potvrđeno da soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 sintetiše bakteriocin, koji je nazvan BacBM50.



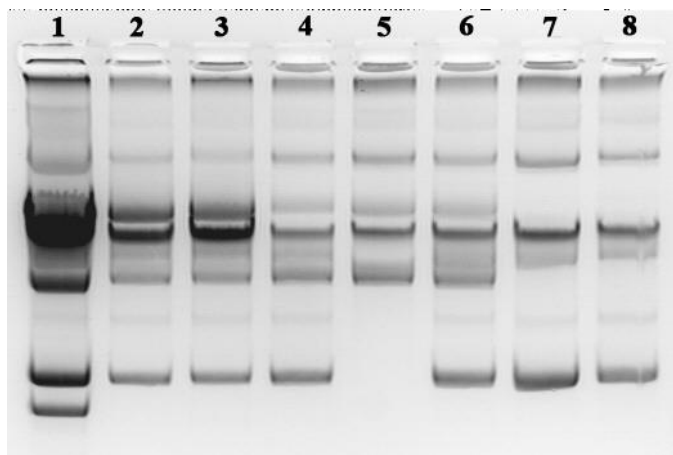
**Slika 4.** Sposobnost sinteze bakteriocina soja *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBM50. 1) Supernatant BGBM50; 2) Kontrola - supernatant BGMN1-596; 3) Neutralisan supernatant BGBM50 sa dodatom katalazom; 4) Kontrola - neutralisan supernatant BGMN1-596 sa dodatom katalazom.

#### 5.2.1.1. Lokalizacija gena za sintezu bakteriocina BacBM50

U dosadašnjim istraživanjima, pokazano je da se geni za sintezu i imunost na bakteriocine mogu nalaziti na bakterijskim plazmidima, kao i na hromozomu. Kako bi se utvrdila lokalizacija gena za sintezu i imunost bakteriocina BacBM50, korišćena je metoda čišćenja plazmida. Posle nekoliko uzastupnih ciklusa čišćenja plazmida, izdvojili su se najinteresantniji kandidati: BGBM50-8 (Bak<sup>+</sup>), BGBM50-34 (Bak<sup>+</sup>), BGBM50-11 (Bak<sup>+</sup>), BGBM50-13 (Bak<sup>+</sup>), BGBM50-14 (Bak<sup>-</sup>), BGBM50-25 (Bak<sup>+</sup>), BGBM50-62 (Bak<sup>+</sup>).

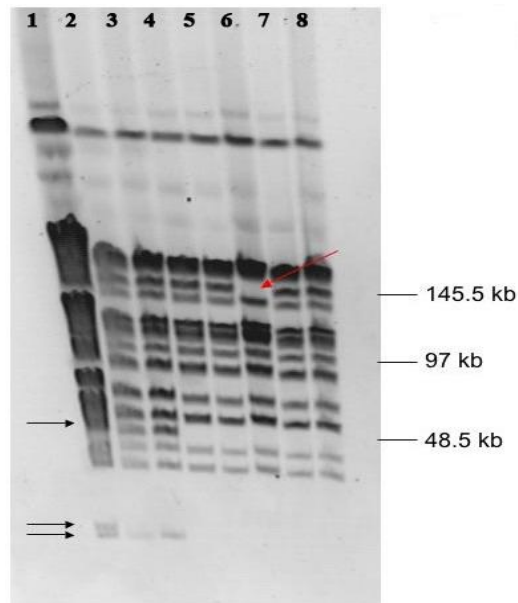
Derivat koji se izdvaja kao interesantan je BGBM50-14, koji je nakon difuzionog testa u bunarčićima pokazao odsustvo bakteriocinske aktivnosti, čime je potvrđeno da je ovaj derivat izgubio sposobnost sinteze bakteriocina BacBM50. Derivat, BGBM50-14, je u bakteriocinskom testu korišćen i kao indikator soj, kako bi se ispitala njegova imunost na bakteriocin BacBM50. Pokazano je da je derivat BGBM50-14, pored toga što je izgubio mogućnost sinteze bakteriocina BacBM50, izgubio i imunost na njega. Upoređivanjem plazmidnih profila soja BGBM50 i odabranih derivata, uočeno je da su svi derivati u odnosu na BGBM50 izgubili najmanji plazmid (Slika 5).





**Slika 5.** Plazmidni profil soja BGBM50 i njegovih derivata. 1. BGBM50; 2. BGBM50-8; 3. BGBM50-34; 4. BGBM50-11; 5. BGBM50-13; 6. BGBM50-14; 7. BGBM50-25; 8. BGBM50-62.

Derivat BGBM50-11 koji je zadržao bakteriocinsku aktivnost, pokazuje najveću sličnost sa plazmidnim profilom derivata BGBM50-14. Imajući sve ovo u vidu, pretpostavlja se da je plazmid na kojem se nalaze geni za sintezu i imunost na bakteriocin BacBM50 suviše velik da se može videti na plazmidnom profilu, pa je iz tog razloga rađena metoda PFGE. Za soj BGBM50 i sve njegove derivate je urađena analiza njihovih genomskih profila *Sma*I enzima (Slika 6).



**Slika 6.** *Sma*I PFGE restrikcioni profil BGBM50 i njegovih derivata. 1. BGBM50; 2. BGBM50-8; 3. BGBM50-34; 4. BGBM50-11; 5. BGBM50-13; 6. BGBM50-14; 7. BGBM50-25; 8. BGBM50-62. Strelice ukazuju na *Sma*I DNK fragmente koji nedostaju u očišćenim derivatima.

Na Slici 6. može se videti da se derivat BGBM50-14 razlikuje od ostalih derivata, kao i od soja BGBM50, na osnovu toga što mu nedostaje plazmid od 145,5 kb. Na osnovu toga je zaključeno da se na tom plazmidu nalaze geni za sintezu i imunost na bakteriocin BacBM50.

#### 5.2.1.2. Biohemijska karakterizacija bakteriocina BacBM50

Nakon izlaganja bakteriocina BacBM50 temperaturama u opsegu od 40°C-100°C , testirana je njegova aktivnost na indikator soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGMN1-596, a rezultati testiranja su prikazani u Tabeli 11.

**Tabela 11.** Uticaj različitih temperatura na aktivnost bakteriocina BacBM50

Temperatura (°C)	Vreme (minuti)	Veličina zone (mm)
30°C	10	3,5
	30	3,5
	60	3,4
40°C	10	3,5
	30	3,5
	60	3,4
50°C	10	3,5
	30	3,4
	60	3,5
60°C	10	3,2
	30	3,1
	60	3,3
70°C	10	3,2
	30	3,3
	60	3,4
80°C	10	3,3
	30	3,0
	60	2,8
90°C	10	2,8
	30	2,5
	60	1,7
100°C	10	1,4
	30	1,0
	60	0

Prilikom testiranja termostabilnosti bakteriocina BacBM50, kao pozitivna kontrola korišćen je bakteriocin BacBM50 inkubiran na temperaturi od 30°C tokom 10, 30, 60 min. Nakon izlaganja bakteriocina BacBM50, u opsegu temperatura od 40°C-70°C, tokom 10, 30 i 60 min, izmerene su zone inhibicije 3,2-3,5 mm, kao i kod pozitivne kontrole. Na višim temperaturama, beleži se konstantan pad aktivnosti bakteriocina BacBM50, dok je nakon izlaganja bakteriocina temperaturi od 100°C u periodu od 60 min zabeleženo odsustvo aktivnosti. Ispitivanjem uticaja niskih temperatura na aktivnost bakteriocina BacBM50, rezultati su pokazali da je bakteriocin zadržao svoju aktivnost tokom svih 30 dana inkubacije na temperaturama +4°C i -20°C. Na osnovu čega se može konstatovati da je bakteriocin BacBM50 stabilan u širokom temperaturnom opsegu.

Prilikom ispitivanja uticaja različitih pH vrednosti na aktivnost bakteriocina BacBM50, korišćen je difuzioni metod sa bunarčićima, a kao indikator soj je korišćen *L. lactis* ssp. *lactis* BGBMN1-596 (Tabela 12).

**Tabela 12.** Uticaj različitih pH vrednosti na aktivnost bakteriocina BacBM50

<b>pH</b>												
<b>vrednost</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Veličina</b>												
<b>zone (mm)</b>	2,0	2,2	2,5	3,2	3,5	3,5	3,5	3,4	3,3	3,1	3,0	2,8

Kao negativna kontrola korišćen je bakteriocinski preparat soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBMN1-596, bez bakteriocinske aktivnosti. Bakteriocinski preparat BGBMN1-596, negativna kontrola, nije pokazivala nikakvu aktivnost na indikator soj BGBMN1-596, čime je otklonjena sumnja uticaja niskih ili visokih pH vrednosti na indikator soj. Kao pozitivna kontrola, korišćen je bakteriocinski preparat soja BGBM50 bez ikakvih tretmana. Na osnovu dobijenih rezultata, prikazanih u Tabeli 13, bakteriocin BacBM50 pokazuje najjaču aktivnost u opsegu pH vrednosti od 5-7, tačnije, gde je izmerena veličina zona inhibicije kao i kod pozitivne kontrole, 3,5 mm. Bakteriocin BacBM50 je pokazivao smanjenu aktivnost na nižim pH vrednostima, a najslabija aktivnosti je zabeležena izlaganjem bakteriocina na pH vrednostima 1 i 2, gde su izmerene zone inhibicije bile 2 i 2,2 mm. Više pH vrednosti su takođe imale uticaja na aktivnost bakteriocina BacBM50, pri čemu je najslabija aktivnost zabeležena nakon izlaganja bakteriocina pH vrednosti 12, gde je izmerena zona inhibicije bila 2,8 mm.

Nakon delovanja pojedinačnih proteolitičkih enzima: pronaza E, proteinaza K, pepsin i tripsin, na bakteriocin BacBM50, dobijeni rezultati njegove aktivnosti na indikator soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM1-596, ukazuju na potpuno odsustvo atktivnosti, na osnovu čega se potvrđuje proteinska priroda ovog bakteriocina. Testiranjem uticaja enzima: lizozim, lipaza, DNKaza, RNKaza, na atktivnost bakteriocina BacBM50, pokazano je da ovi enzimi nemaju nikakav uticaj na aktivnost bakteriocina BacBM50.

### 5.2.1.3. Antimikrobni spektar delovanja bakteriocina BacBM50

Prilikom preliminarnih testiranja bakteriocinske aktivnosti, pokazano je da bakteriocin soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50, deluje na *L. lactis* ssp. *lactis* BGMN1-596 (Tabela 8), ali da ne deluje na laktobacile, kao ni na jednu od patogenih bakterija hrane koje su testirane (Tabela 10). Daljim ispitivanjem aktivnosti bakteriocina BacBM50, difuzionom metodom sa bunarčićima, korišćene su različite laktokoze bakteriocin proizvođači (Tabela 13). Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 13., može se konstatovati da bakteriocin BacBM50 pokazuje aktivnost na veliki broj različitih laktokoka. Na kraju na osnovu svih rezultata, zaključak je da bakteriocin BacBM50 ima uzak spektar antimikrobnog delovanja, s obzirom da pokazuje samo aktivnost na laktokoze.

**Tabela 13.** Antimikrobni spekter delovanja bakteriocina BacBM50

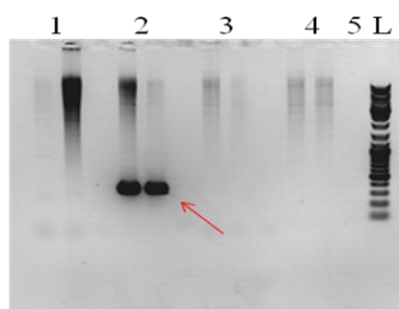
Bakteriocin preparati	BGBM50	BGMN-5	BGMN -501	BGMN1- 596T	BGBU1-4	BGŠM1-19	LMG2081
Indikator sojevi							
BGBM50	-	+	-	-	+	-	+
BGMN1-5	+	-	-	+	+	+	+
BGMN-501	+	+	-	+	+	+	+
BGMN596T	+	+	+	-	+	+	+
BGBU1-4	+	+	-	-	-	+	+
BGSM1-19	-	-	-	-	+	-	+
LMG2081	-	+	-	-	+	-	-

+ = postoji zona inhibicije; - = ne postoji zona inhibicije;

S obzirom da su za testiranje spektra delovanja bakteriocina BacBM50, korišćene laktokoce bakteriocin proizvođači, daljom analizom može se pretpostaviti koji od bakteriocina sintetiše soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50. Na osnovu rezultata unakrsnih bakteriocinskih testova, kao interesantan podatak se može izdvojiti to što soj BGBM50 nije pokazao aktivnost na soj BGŠM1-19 koji sintetiše dva bakteriocina, lakticin RM i laktokokcin B, na osnovu čega se može pretpostaviti da soj BGBM50 sintetiše jedan od ova dva bakteriocina. Daljom analizom rezultata, može se videti da soj BGBM50 deluje na soj BGMN1-501 koji je laktokokcin B proizvođač, čime je odbaćena pretpostavka da soj BGBM50 sintetiše laktokokcin B. Na osnovu ovih rezultata, nije se moglo sa sigurnošću konstatovati koji od bakteriocina proizvodi soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50, iz tog razloga dalja ispitivanja su rađena korišćenjem molekularnih metoda.

#### 5.2.1.4. Ispitivanje prisustva specifičnih gena za sintezu bakteriocina PCR metodom u soju *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50

Soj *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBM50 je korišćenjem specifičnih prajmera u PCR metodi, testiran na prisustvo gena nekih od najspecifičnijih i najčešćih bakteriocina koji se mogu naći u laktokokama (lakticin 481, laktokokcin G, laktokokcin 972, lakticin 3147). Na osnovu dobijenih rezultata, pokazano je da soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 poseduje gene za sintezu bakteriocina laktokokcina G (Slika 7.)

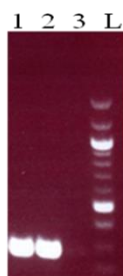


**Slika 7.** Elektroforeza PCR produkata sa specifičnim prajmerima za: 1. Lakticin 481; 2. Laktokokcin G; 3. Laktokokcin 972; 4. Lakticin 3147; 5. Negativna kontrola; L-Ladder 1 kb. Testovi su rađeni u duplikatu. Strelica obeležava pozitivnu PCR reakciju sa specifičnim prajmerima za laktokokcin G. Kao matrica je korišćena totalna DNK soja BGBM50.

Pozitivni PCR produkti su poslani na sekvenciranje u centar za sekvenciranje Microgen sequencing service, Holandija. Nakon analize sekvence, koristeći NCBI bazu podataka, pokazano je 99% identičnosti regiona za laktokokcin G. Ovim rezultatom je nedvosmisleno potvrđeno da soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 sintetizira bakteriocin laktokokcin G.

### 5.2.2. Karakterizacija bakteriocina soja *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LMG2081

Na osnovu preliminarnih testiranja bakteriocinske aktivnosti soja *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081, difuzionim testom sa bunarčićima, pokazano je da poseduje jaču aktivnost od soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 na indikator soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBMN1-596 (Tabela 8). Daljim ispitivanjima bakteriocinske aktivnosti soja LMG2081, pokazano da ne deluje na laktobacile, kao ni na patogene sojeve hrane koji su korišćeni u testu (Tabela 10). Rezultati testiranja bakteriocinske aktivnosti na laktokoke, prikazani su u Tabeli 13, pri čemu se može konstatovati da soj LMG2081 ima sposobnost inhibicije svih laktokoka na koje je testiran. Ono što je interesantno u ovim rezultatima je to što soj LMG2081 pokazuje imunost na delovanje većine laktokoka bakteriocin proizvođača. S obzirom da je pokazao imunost na delovanje soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 koji je laktokokcin G proizvođač, soj LMG2081 je PCR-om testiran na prisustvo gena za sintezu bakteriocina laktokokcina G, kao i na prisustvo gena koji kodiraju bakteriocine lakticin 481, nizin, laktokokcin B, laktokokcin 972, lakticin 3147. Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđeno je da soj LMG2081 poseduje gen za sintezu laktokokcina G (Slika 8).



**Slika 8.** Elektroforeza PCR produkata sa specifičnim prajmerima za laktokokcin G. 1) pozitivna kontrola (*L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50); 2) *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081; 3) negativna kontrola; L – Ladder 100 bp



Pozitivni PCR produkti su poslani na sekvenciranje u centar za sekvenciranje Microgen sequencing service, Holandija. Nakon analize sekvence, koristeći NCBI bazu podataka, pokazano je 100% identičnosti regiona za laktokokcin G. Ovim rezultatom je nedvosmisleno potvrđeno da soj *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081 sintetiše bakteriocin laktokokcin G. Međutim, kako soj LMG2081 poseduje gen za sintezu bakteriocina laktocina G, a pri tom pokazuje inhibitornu aktivnost na soj BGBM50, takođe laktokokcin G proizvođač, pretpostavljeno je da soj LMG2081 sintetiše još jedan bakteriocin.

#### **5.2.2.1. Usporedna analiza sekvence genoma sojeva *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LMG2081 i BGBM50**

Kako su prethodno dobijeni rezultati ukazivali na mogućnost da soj *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081 sintetiše još jedan bakteriocin, koji se razlikuje od svih do sad okarakterisanih bakteriocina, ili sintetiše laktokokcin G se atipičnim mehanizmom delovanja na senzitivnu ćeliju, urađeno je sekvenciranje genoma sojeva LMG2081 i BGBM50.

Za soj LMG2081 dobijeno je 100 kontigova koji pokrivaju 2,548,962 bp, dok je za soj BGBM50 dobijeno 124 kontiga koji pokrivaju 2,541,525 bp. Usporednom analizom sekvenci genoma, potvrđeno je da oba soja poseduju kompletne operone za sintezu laktokokcina G, identičnosti 98%. Ovaj podatak je ukazivao na to da soj LMG2081 verovatno sintetiše bar još jedan bakteriocin. Daljom analizom genoma, otkriveno je da se u okviru jednog kontiga (kontig 62) nalazi nepotpuni operon za sintezu bakteriocina. Sekvenca kontiga 62 je pokazala 40% identičnosti sa sekvencom operona za sintezu lakticin 481 bakteriocina, što je ukazalo da se u datom kontigu nalazio veći deo operona za sintezu još jednog bakteriocina.

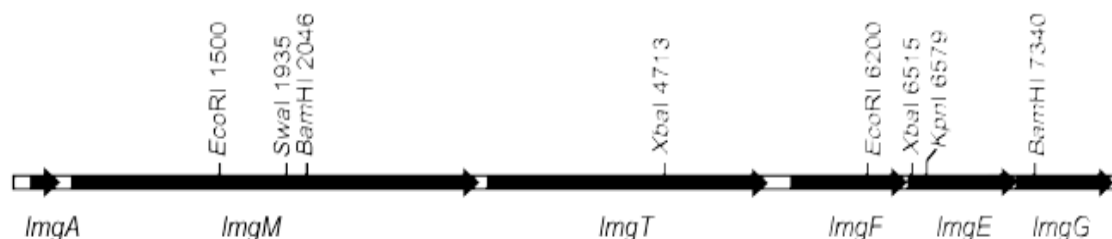
#### **5.2.2.2. Inverzni PCR**

Analizom genoma soja *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081 i kontiga 62, primećeno je da nedostaje početak operona za sintezu bakteriocina. Da bi se došlo do sekvence kontiga koji se nalazi uzvodno od kontiga 62, jedan od pristupa koji je korišćen je

metoda inverznog PCR-a. U toku analize genoma soja LMG2081, pošlo se od pretpostavke da se operon za sintezu potencijalnog bakteriocina nalazi na plazmidu. Iz tog razloga, prvi korak je bio izolacija plazmidne DNK iz soja LMG2081 po metodi koju su opisali Klaenhammer i O'Sullivan (1989). Nakon toga, urađena je digestija plazmidne DNK, korišćenjem restriktionog enzima *EcoRI*. Ovaj enzim je korišćen jer je analizom sekvence kontiga 62 utvrđeno da poseduje restriktiono mesto *EcoRI*. Zatim je urađena ligacija produkta digestije, kako bi se dobili cirkularni fragmenti, a produkt ligacije je korišćen kao matrica za PCR reakciju u kojoj su korišćeni specifični prajmeri LL/LD (Tabela 7). Dobijen PCR fragment je prečišćen a zatim je kloniran u komercijalni plazmid pGem-T-easy, čime je dobijen plazmid pGem-T-easyLL/DD, koji dalje transformisan sa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , radi umožavanja željenog fragmenta. Klonirani fragment je sekvenciran a sekvenca je analizirana uporednom pretragom sekvence genoma soja LMG2081, korišćenjem programa „DNK strider“. Nakon analize sekvence, pronađen je kontig 84 koji se nalazi ispred kontiga 62, njihovim spajanjem sastavljen je ceo operon koji je nazvan lctLMG, a potencijalni bakteriocin je nazvan lakticin LMG.

### 5.2.2.3. Kompjuterska analiza sekvence operona lctLMG

"DNA Strider" program je korišćen za kompjutersku analizu sekvence, a za pretraživanje homologije sa već poznatim sekvencama u banci gena korišćen je "BLAST" (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Sastavljeni operon, lctLMG, se nalazi na fragmentu od 8 kb. Na osnovu pretraživanja banke podataka, ustanovljeno je da se operon lctLMG sastoji od šest otvorenih okvira čitanja (ORF), nazvani *lmgA*, *lmgM*, *lmgT*, *lmgF*, *lmgE* i *lmgG* (Slika 9). *In silico* analizom, utvrđeno je da se nizvodno od operona lctLMG nalazi sekvenca koja kodira DNK-invertazu, sa visokom homologijom (83%) sa sekvencom koja kodira DNK-invertazu u soju *L. lactis* (WP\_046782557.1). Region koji se nalazi ispred operona lctLMG nije ispitan.



**Slika 9.** Raspored i orijentacija ORF-ova na lctLMG operonu veličine 8000 bp soja *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LMG2081. Pozicije bitnijih restrikcioni mesta su naznačene. Strelice pokazuju smer i dužine ORF-ova.

Analizom operona, primećeno je da operon lctLMG ima najviše sličnosti sa bakteriocinima koji pripadaju grupi lakticin-481 bakteriocina. Ono što je karakteristično za bakteriocine lakticin-481 grupe je da prolaze kroz posttranslacione modifikacije. Iz tog razloga za prvi gen u operonu lctLMG, *lmgA*, se pretpostavlja da je strukturni gen koji kodira prekursor peptid (49 aminokiselina), a za koji se pretpostavlja da će biti isečen između alanina (Ala) i glicina (Gly), a zatim dolazi do posttranslacionih modifikacija, nakon kojih se formira zreo peptid (25 aminokiselina). Na slici 10 prikazano je poređenje aminokiselinskih sekvenci gena *lmgA* i strukturnih gena nekih od najreprezentativnijih bakteriocina lakticin-481 grupe.

nukacin ISK-1(Q9KWM4)	MENSKVMKDIEVANLLEEVQEDLNEVLGAKKKSQVPIPTVSHDCHMNSFQTFVFTCCS
lakticin-481 (WP_032489363)	-----MKEQNSFNLLQEVTESELDDLILGAKGGSQVIHTISHECNMNSWQTFVFTCCS
variacin (CAA63706)	-----MTNAFQALDEVTDALDAILG--GGSGVPIPTISHECHMNSFQTFVFTCCS
butyrivibriocin (AAC19355)	-----MNKELNALTNPIDEKELEQILG--GGNGVIKTIISHECHMNTWQHFIFTCCS
lakticin LmgA (CUH82811.1)	-----MEKFEYSNLIQEVSDSELDEILG--AGNGVIKTIVSHECKMNTWQHFIFTCCS
salivaricin (AFB74480)	-----MKKDAIIESIKEVSLEELDQIIG--AGNGVFKTIISHECHLNTWAFILATCCS
	. : ** : : * . ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

**Slika 10.** Uporedna analiza aminokiselinskih sekvenci prekursor peptida *lmgA* i sličnih lantibiotika.

Sekvence N-terminalnog kraja, ili lider peptida, analiziranih bakteriocina se razlikuju po dužini i sekvenci ali svi sadrže tri nepromenjene aminokiseline (glutaminska kiselina-E, leucin-L, glicin-G). Propeptid analiziranih sekvenci bakteriocina grupe lakticin-481 je mnogo više konzerviran nego lider peptid i postoji 11 nepromenjenih aminokiselina. C-terminalni kraj propeptida sadrži četiri nepromenjene aminokiseline u svim ispitivanim bakteriocinima (TCCS). Ukupno je pronađeno 15 identičnih aminokiselina u svim bakteriocinim koji su poređeni.

Daljim ispitivanjem sekvence operona *lctLMG*, nizvodno od *lmgA* gena, nalazi se gen koji je imenovan *lmgM* (2654 bp). Gen *lmgM*, pokazuje najveću sličnost sa genom koji kodira modifikacioni enzim, koji je uključen u biosintezu bakteriocina (Tabela 14) (Uguen et al., 2000; Xie et al., 2004).

**Tabela 14.** Rezultati uporedne analize aminokiselinskih proteina kodiranih operonom *lctLMG*.

ORF (broj aminokiselina) pozicija	Proteini sa najvećom homologijom, broj	Pretpostavljeni protein kodiran ORF	Mikroorganizam	Aminokiselinska identičnost
<i>lmgA</i> (49 ak) 118-267	lantibiotik nukacin, WP_037580734.1 lantibiotik lakticin 481, WP_032489363.1	Lakticin-481 grupa lantibiotika	<i>Streptococcus equi</i> <i>Lactococcus lactis</i>	69% 73%
<i>lmgM</i> (884 ak) 757-3411	lakticin 481/protein za biosintezu <i>lcbDR2</i> , WP_032489360.1	protein za modifikaciju lantibiotika	<i>Lactococcus lactis</i>	45%
<i>lmgT</i> (696 ak) 3420-5510	lakticin 481/ATP-binding protein <i>lanD3</i> , protein za transport, WP_032489362.1	Peptidaza C39 familija	<i>Lactococcus lactis</i>	53%
<i>lmgF</i> (303 ak) 5587-6498	Bacitracin transpor ATP-binding protein, emb CIT27467.1	ABC-transporter protein	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	65%
<i>lmgE</i> (250 ak) 6498-7250	NukE, gbAKQ51582.1	ABC-transporter protein	<i>Staphylococcus epidermis</i>	48%
<i>lmgG</i> (245 ak) 7247-7984	NukG, gbAKQ51591.1	Eksport lantibiotika	<i>Staphylococcus epidermis</i>	49%

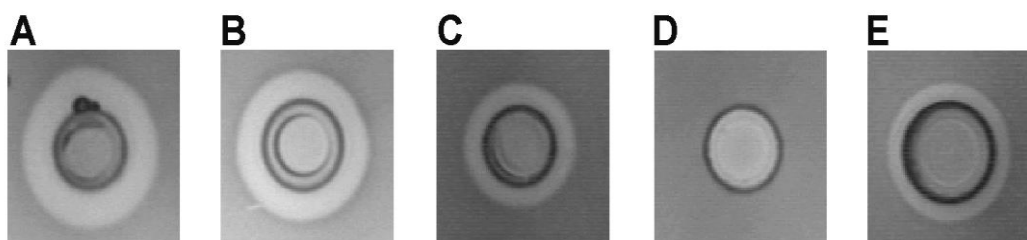
Dalje, gen *lmgT* (2090 bp), verovatno kodira protein za iscecanje lider peptida i izbacivanje zrelog bakteriocina izvan ćelije (Tabela 14) (Chatterjee et al., 2005; Dufour et al., 2007). Na kraju, tri gena, *lmgF* (911 bp), *lmgE* (752 bp) i *lmgG* (737 bp), su

najverovatnije odgovorni za sintezu proteina sličnih ABC-transporteru, čime omogućavaju imunost izbacivanjem zrelog bakteriocina izvan ćelije (Tabela 14). Sličan imuni sistem je prisutan u lantibioticima laticin 481, mutacin II i streptokokcin SA-FF22, u svakom od tih slučajeva, sistem od tri gena, *lanFEG*, omogućava imunost na lantibiotike (Dufour et al., 2007). U slučaju lantibiotika nukacin ISK-1, prisutan je dvostruki imuni sistem, *nukFEG* i *nukH*, koji pruža mnogo bolju zaštitu nego svaki sistem zasebno (Aso et al., 2005).

#### 5.2.2.4. Konstrukcija „knock-out“ mutanata soja *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LMG2081

U cilju potvrde da soj *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081 sintetiše bakteriocin laktokokcin G i lakticin LMG, konstruisani su „knock-out“ mutanti. Konstruisani plazmidi (pG<sup>+</sup>hostLcnG i pG<sup>+</sup>hostlctLMG) su integrirani u *lcnG* i *lmgM* gene, u cilju dobijanja dva mutanta, LMG2081/ pG<sup>+</sup>hostLcnG ( $\Delta$ *lcnG*) i LMG2081/ pG<sup>+</sup>hostlctLMG ( $\Delta$ *lctLMG*) mutanta. Mutanti su inkubirani na 37°C, a zatim provereni bakteriocinskim testovima, PFGE i hibridizacijom, što je imalo za cilj potvrdu uspešnosti metode temperaturnog „shift“-a za dobijanje mutanata kojima su atenuirani geni odgovorni za sintezu bakteriocina. Ova metoda je sa uspešnošću korišćena u velikom broju primera gde je bilo potrebno praćenje genskih funkcija kod različitih vrsta (*Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*) (Maguin et al., 1996).

Mutanti sa integriranim plazmidom pG<sup>+</sup>host9lcnG (LMG2081/ pG<sup>+</sup>hostLcnG) pokazuju slabiju bakteriocinsku aktivnost u odnosu na soj LMG2081, kada je indikator soj *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-596 (Slika 11A i 11C). Druga grupa mutanata, koji poseduju integrisan plazmid pG<sup>+</sup>hostlctLMG (LMG2081/ pG<sup>+</sup>hostlctLMG), izgubili su sposobnost inhibitornog delovanja na *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 (lcn G producent) (Slika 11F) i pokazali su znatno slabiju inhibitornu aktivnost delovanja na BGMN1-596 (Slika 11E). Jača inhibitorna aktivnost soja LMG2081 delovanja na BGMN1-596, potiče od zajedničkog delovanja oba bakteriocina (lcn G i lct LMG). Ovim rezultatima se potvrđuje pretpostavka da soj LMG2081 poseduje dva funkcionalna bakteriocinska operona. PFGE analizom i „Southern hibridizacijom“ je potvrđeno da su mutanti istog porekla kao i soj LMG2081 (Slika 12).

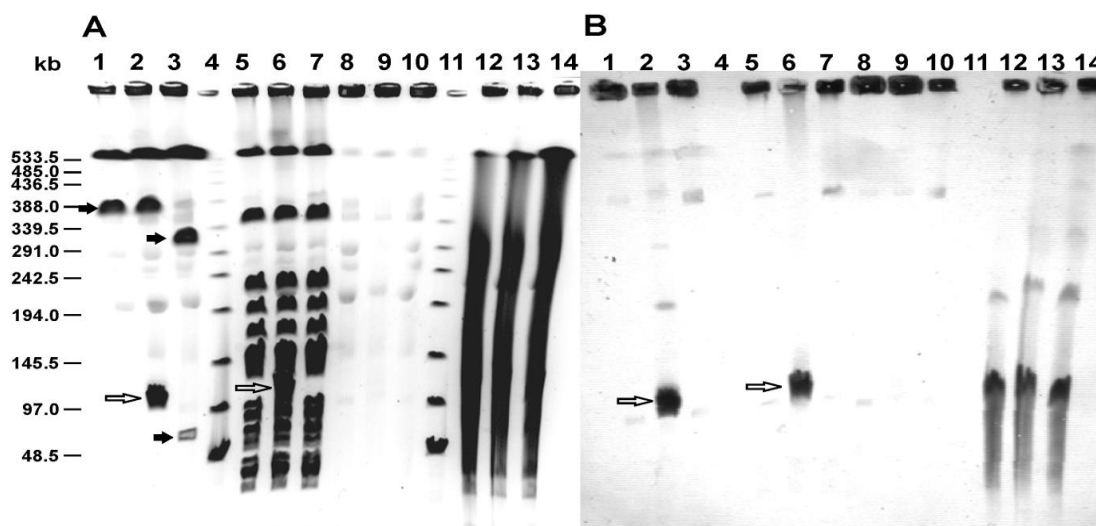


**Slika 11.** Bakteriocinska aktivnost soja *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081 i njegovih mutanata. **A)** Delovanje LMG2081 na BGMN1-596; **B)** Delovanje LMG2081 na BGBM50 (lcn G producent); **C)** Delovanje LMG2081/ pG<sup>+</sup>hostLcnG ( $\Delta$ lcnG) na BGMN1-596; **D)** Delovanje LMG2081/ pG<sup>+</sup>hostlctLMG ( $\Delta$ lctLMG) na BGBM50; **E)** Delovanje LMG2081/ pG<sup>+</sup>hostlctLMG na BGMN1-596.

#### 5.2.2.5. Lokalizacija gena za sintezu bakteriocina lakticina LMG i laktokokcin G u soju *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LMG2081

Kako pokušaji čišćenja plazmida soja LMG2081 nisu uspeli, proistekla je potreba za promenu pristupa za lokalizaciju gena za sintezu bakteriocina lakticin LMG i laktokokcin G. Korišćena je metoda PFGE u kombinaciji sa „Southern blot“ hibridizacijom. Za PFGE analizu korišćena je totalna DNK soja LMG2081 i oba mutanta LMG2081/ pG<sup>+</sup>hostlctLMG ( $\Delta$ lctLMG) i LMG2081/ pG<sup>+</sup>hostLcnG ( $\Delta$ lcnG), isečena sa dva restrikciona enzimima (*NotI* i *SmaI*) i tretirana sa S1 nukleazom. Kao kontrola je korišćena nesečena totalna DNK soja LMG2081 i njegovih mutanata. Plazmid p<sup>+</sup>Ghost9, poseduje restrikciona mesta *NotI* i *SmaI*, koja se unose u procesu integracije u soj LMG2081. Rezultati PFGE-hibridizacije potvrđuju pretpostavku da se operon za lakticin LMG bakteriocin nalazi na plazmidu, oko 115 kb i ne poseduje restrikciona mesta *NotI* i *SmaI* (Slika 12A i B, linija 2 – *NotI* linearizovan plazmid; linija 6 – linearizovan *SmaI* plazmid). Dalje, DNK iz soja LMG2081 i mutanta, nesečena i tretirana egzonukleazom S1, je analizirana PFGE-hibridizacijom. Za probu je korišćen deo operona lakticin LMG (*lmgM*), dobijen je signal samo sa ekstra hromozomalnim trakama (Slika 12B, linije 12-14), koje su na gelu pozicionirane u regionu od 115 kb, slično kao i kod linearizovanih plazmida.

Suprotno od bakteriocina lakticin LMG, operon laktokokcina G se nalazi na hromozomalnom fragmentu *NotI* digestije od 380 kb. Integracijom plazmida pG<sup>+</sup>host9 u laktokocin G operon, ovaj fragment je razdvojen na dva fragmenta 310 kb i 70 kb (Slika 12A, linija 3).



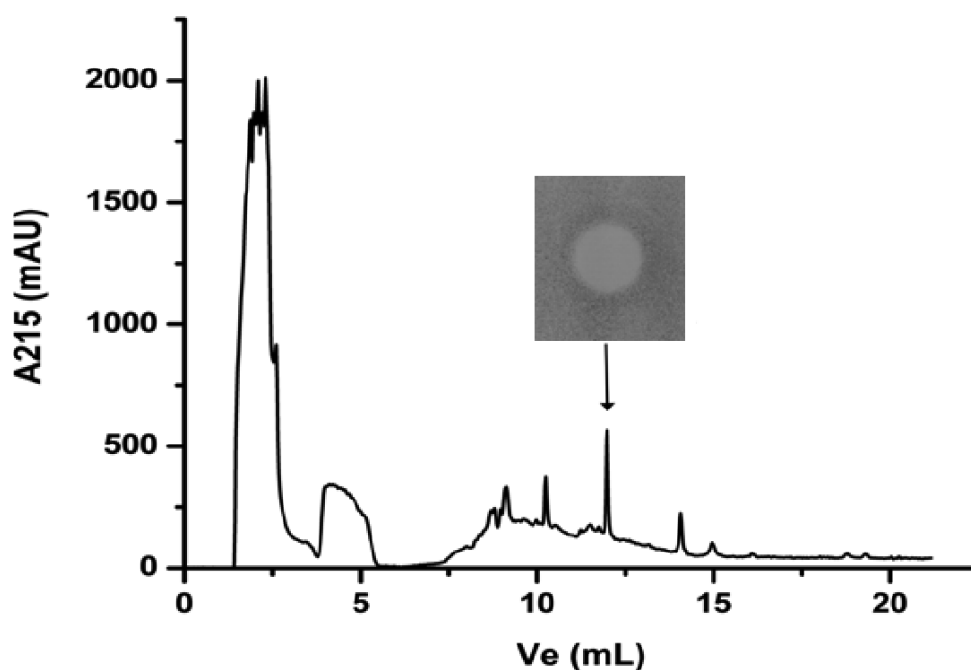
**Slika 12.** PFGE profili *Lactococcus lactis* LMG2081 i mutanata (lakticin LMG minus i laktokocin G minus) (A); Southern blot hibridizacija sa *lmgM* probom (B). Digestija: *NotI* (1-3) i *SmaI* (5-7), nesečeni (8-10) i S1 tretirani (12-14), *Lactococcus lactis* LMG2081 (1, 5, 8 i 12), LMG2081/ pG<sup>+</sup>host9lctLMG (2, 6, 9 i 13) i LMG2081/pG<sup>+</sup>host9lcnG (3, 7, 10 i 14). Linije 4 i 11,  $\lambda$ -konkatameri. Bele strelice ukazuju na linearizovani plazmid koje nosi lakticin LMG operon. Crne strelice ukazuju na razlike u hromozomalnim fragmentima izmedju LMG2081 i laktokocin G mutanta.

#### 5.2.2.6. Prečišćavanje i masena spektrometrija bakteriocina lakticin LMG

Bakteriocini koje sintetišu BMK su najčešće amfipatični ili hidrofobni peptidi katjonske prirode. Oni se međusobno razlikuju po svojoj molekularnoj masi, aminokiselinskom sastavu, pI vrednosti, ukupnom pozitivnom naelektrisanju i posttranslacionoj modifikaciji određenih aminokiselina. Postojanje ovakvih razlika između bakteriocina BMK dovelo je do razvijanja velikog broja različitih metoda za izolovanje bakteriocina. Najčešće se koristi metoda koja počinje precipitacijom proteina iz supernatanta bakterijske kulture amonijum sulfatom, a zatim slede različite

kombinacije jonoizmenjivačke hromatografije, gel filtracije i reverzno-fazne tečne hromatografije visokih performansi (RP-HPLC).

Bakteriocin, lakticin LMG, je prečišćen kombinacijom metoda amonijum-sulfatne precipitacije i RP-HPLC. Dobijene frakcije su testirane ukapavanjem na GM17 soft-agar inokulisan sojem *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBM50. Nakon inkubacije na 30°C tokom 24 h, rezultati su očitani. Na osnovu rezultata bakteriocinske aktivnosti frakcija, identifikovan je pik na hromatogramu koji potiče od bakteriocina lakticina LMG (Slika 13).

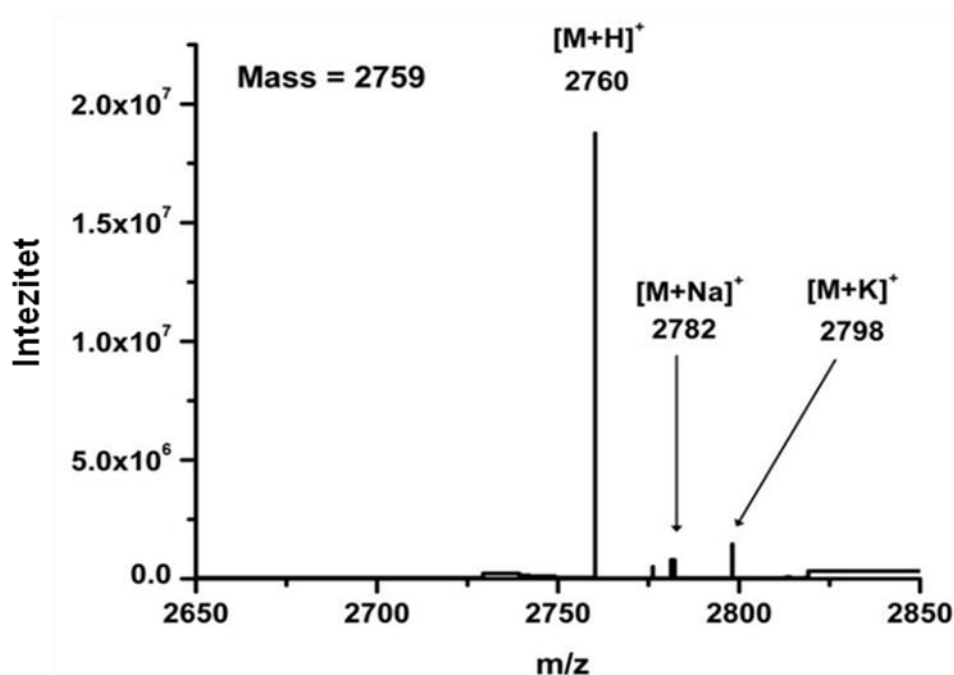


**Slika 13.** RP-HPLC hromatogram prečišćavanja bakteriocina iz amonijum sulfatnog precipitata supernatanta kulture. Aktivna frakcija je testirana metodom iskapavanja; indikator soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50.

Masena analiza aktivne frakcije je rađena kuplovanjem metoda masene spektrometrije i HPLC (MS/HPLC metoda). Uzorak je nanosen na reverzno faznu C18 kolonu i razdvojen korišćenjem linearnog gradijenta acetonitrila. Nakon toga je snimljen molekulski jon bakteriocina, i ESI-TOF analizom aktivne frakcije detektovane su joni sledećih masa 2760  $[M+H]^+$ , 2782  $[M+Na]^+$ , i 2798  $[M+K]^+$  (Slika 14). Na

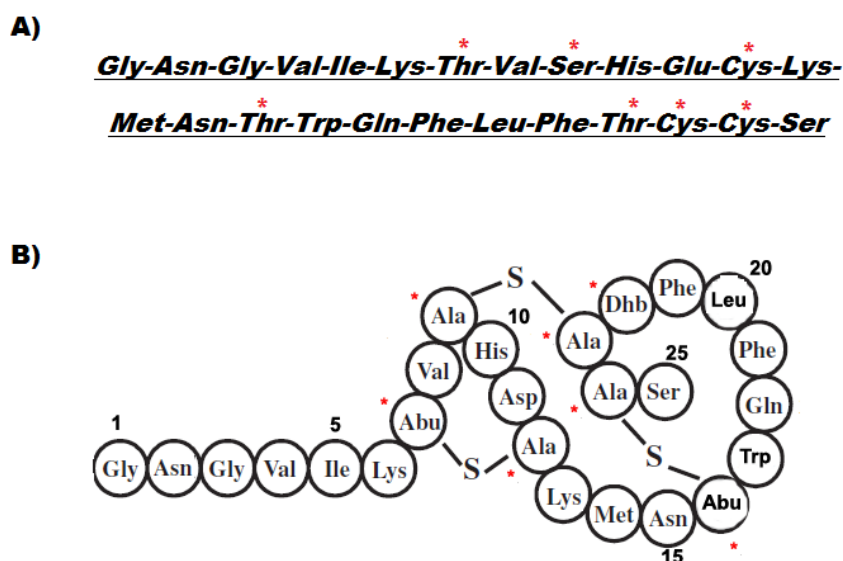


osnovu ovih podataka, izračunata je molekulska masa nenaelektrisane aktivne frakcije (lakticin LMG), koja iznosi 2759 Da.



**Slika 14.** Maseni spektar lakticina LMG. Preračunata masa lakticina LMG metodom ESI-TOF masene spektrometrije.

Na osnovu analize aminokiselinske sekvence, isecanjem lider peptida između Ala 23 i Gly 24, formira se peptid od 25 aminokiselina mase od 2831 Da. S obzirom na veliku sličnost konzerviranih aminokiselina bakteriocina lakticina LMG i lakticin-481 grupe lantibiotika, može se pretpostaviti da je lakticin LMG podvrgnut istim strukturnim modifikacijama kao i lantibiotici grupe lakticin-481 (Slika 15).



**Slika 15.** Primarna struktura (A) i pretpostavljena struktura (B) bakteriocina lakticina LMG. Crvenom zvezdicom su označeni posttranslaciono izmenjene aminokiseline.

Bakteriocini grupa lakticin-481 lantibiotika, sadrže treonin, serin i cistein, koji teže da budu modifikovani u neuobičajne aminokiseline kao što su dehidrobutirin, lantionin i 3-metillantionin, procesom dehidratacije (otpušta 4 molekula vode). Iz tog razloga, pretpostavljeno je da se kod lakticin LMG tioestarski mostovi nalaze na poziciji između aminokiselina 7 i 12, 9 i 23, i 16 i 24, dok se dehidrobutirin nalazi na poziciji 22 (Slika 15). Po pretpostavljenim posttraslacionim modifikacijama, preračunata molekulska masa zrelog bakteriocina lakticin LMG je 2759 Da, kao i molekulska masa dobijena metodom masene spektrometrije.

#### 5.2.2.7. Biohemijska karakterizacija bakteriocin lakticin LMG

Na osnovu istraživanja, pokazano je da soj LMG2081 ima sposobnost da produkuje dva aktivna bakteriocina, laktokokcin G i lakticin LMG. S obzirom da su biohemijske karakteristike laktkokcina G pokazana ranije u ovom radu prilikom karakterizacije bakteriocina soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50, u ovom delu istraživanja pažnja je posvećena samo karakteristikama bakteriocina lakticina LMG. Iz tog razloga kao bakteriocinski preparat je korišćen supernatant mutanta LMG2081/ pG<sup>+</sup>hostLcnG

(lcnG minus), inkubiran na 30°C tokom 16 h. Testiranje aktivnosti je rađeno difuzionom metodom sa bunarčićima, a kao indikator soj je korišćen soj BGBM50 (Tabela 15).

**Tabela 15.** Uticaj različitih temperatura na aktivnost bakteriocina lakticin LMG

Temperatura (°C)	Vreme (minuti)	Veličina zone (mm)
30°C	10	4,4
	30	4,4
	60	4,3
40°C	10	4,4
	30	4,3
	60	4,3
50°C	10	4,4
	30	4,4
	60	4,4
60°C	10	4,3
	30	4,4
	60	4,4
70°C	10	4,5
	30	4,4
	60	4,4
80°C	10	4,3
	30	4,2
	60	4,2
90°C	10	4,2
	30	4,1
	60	4,1
100°C	10	4,0
	30	4,0
	60	3,9

Bakteriocin lakticin LMG pokazuje gotovo nepromenjenu aktivnosti tokom celog tretmana na različitim temperaturama. Nakon delovanja temperature od 100°C tokom 60 min, primećena je malo slabija aktivnost bakteriocina lakticin LMG, gde je izmerena zona inhibicije iznosila 3,9 mm, što je manje za 0,5 mm u odnosu na kontrolnu varijantu.

Testiranjem aktivnosti bakteriocina lakticin LMG nakon njegovog izlaganja temperaturama od +4°C i -20°C, tokom 30 dana, utvrđeno je da mu je aktivnost

nepromenjena. Ovim testiranjem se moglo konstatovati da je bakteriocin lakticin LMG izuzetno termostabilan bakteriocin, kao i da zadržava svoju aktivnost nakon izlaganja niskim temperaturama.

Ispitivanja uticaja različitih pH vrednosti na aktivnost bakteriocina lakticin LMG, korišćen je difuzioni metod sa bunarčićima, a kao indikator soj je korišćen *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 (Tabela 16).

**Tabela 16.** Uticaj različitih pH vrednosti na aktivnost bakteriocina LMG

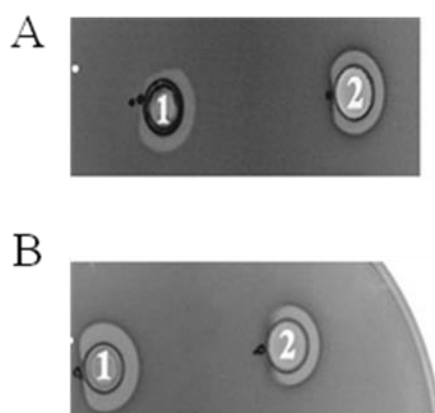
pH vrednost	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Veličina zone (mm)	2,5	2,8	3,0	3,4	4,4	4,5	4,5	4,4	4,4	4,3	3,8	3,5

Kao negativna kontrola korišćen je bakteriocinski preparat soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGMN1-596, bez bakteriocinske aktivnosti. Bakteriocinski preparat BGBMN1-596, negativna kontrola, nije pokazivao nikakvu aktivnost na indikator soj BGMN1-596, čime je otklonjena sumnja uticaja niskih ili visokih pH vrednosti na indikator soj. Kao pozitivna kontrola, korišćen je bakteriocinski preparat mutanta LMG2081/pG<sup>+</sup>hostLcnG (lcnG minus), bez ikakvih tretmana. Na osnovu dobijenih rezultata, bakteriocin lakticin LMG pokazuje najjaču aktivnost u opsegu pH vrednosti od 5-10, gde su izmerene zone inhibicije 4,5 i 4,4 mm. Najjači uticaj na smanjenje aktivnosti bakteriocina lakticin LMG, imale su pH vrednosti 1 i 2, gde su izmerene zone inhibicije 2,5 i 2,8 mm. Više pH vrednosti nisu imale toliko uticaja na aktivnost bakteriocina kao i niže pH vrednosti, ali je ipak zabeležen značajan pad aktivnosti nakon izlaganja na pH vrednosti 12, gde je izmerena zona inhibicije 3,5 mm.

Nakon delovanja pojedinačnih proteolitičkih enzima: pronaza E, proteinaza K, pepsin i tripsin, na bakteriocin lakticin LMG rezultati njegove aktivnosti na indikator soj *Listeria monocytogenes* ATCC19111, ukazuju na potpuno odsustvo aktivnosti, na osnovu čega se potvrđuje proteinska priroda ovog bakteriocina. Testiranjem uticaja enzima: lizozim, lipaza, Dnaza, Rnaza, na atktivnost bakteriocina lakticin LMG, pokazano je da ovi enzimi nemaju nikakav uticaj na aktivnost ovog bakteriocina.

### 5.2.3. Karakterizacija bakteriocina soja *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4

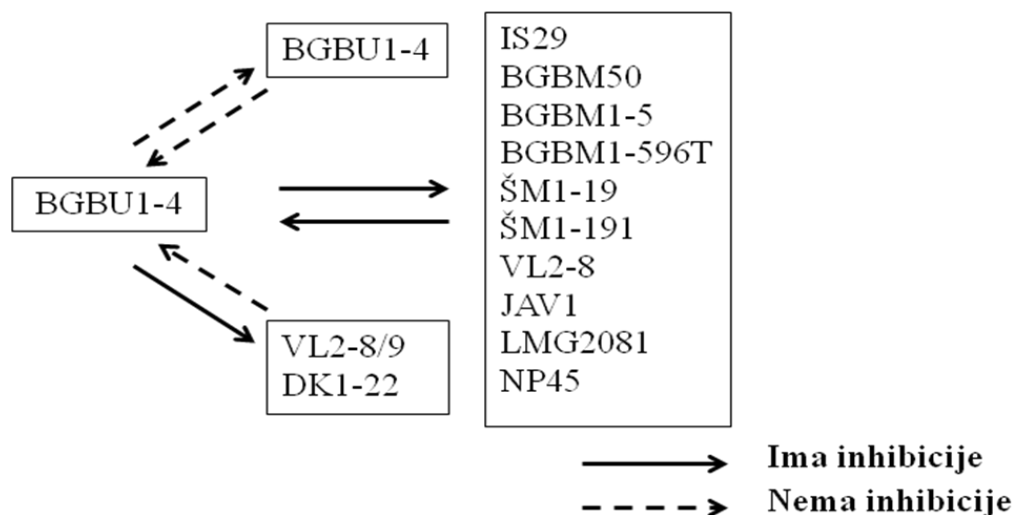
Na osnovu preliminarnog testiranja bakteriocinske aktivnosti soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4, utvrđeno je da soj BGBU1-4 poseduje izuzetnu bakteriocinsku aktivnost na indikator soj *L. lactis* ssp. *lactis* MN1-596 (Tabela 8). Daljim testiranjem bakteriocinske aktivnosti soja BGBU1-4, utvrđeno je da bakteriocin soja BGBU1-4 poseduje širi spektar delovanja od bakteriocina laktokokcina G i lakticina LMG, koji su okarakterisani u prethodnim odeljcima ovog rada (Tabela 10). Ono što izdvaja bakteriocin soja BGBU1-4 od bakteriocina laktokokcin G i lakticin LMG je njegova sposobnost da inhibira rast *Listeria monocytogenes* ATCC19111 i *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* HN14. Bakteriocinska aktivnost soja BGBU1-4 na *L. monocytogenes* ATCC19111 je potvrđena difuzionom metodom sa bunarčićima, pri čemu korišćen neutralisan supernatant bakterijske kulture soja BGBU1-4 nakon 16 h inkubacije na temperaturi od 30°C, a pored bunarčića je nanesen kristal pronaza E (Slika 16).



**Slika 16.** Bakteriocinski test prekonoćne kulture *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 i njegovog neutralisanog supernatanta -. Indikator soj: A) *L. lactis* ssp. *lacti* BGMN1-596, B) *L. monocytogenes* ATCC19111. Prekonoćna kultura – 1; neutralisan supernatant – 2.

Ovim testom je potvrđena proteinska priroda delovanja antimikrobnog jedinjenja soja BGBU1-4 na *L. monocytogenes* ATCC19111, odnosno bakteriocina. U nameri da se identifikuje bakteriocin koji produkuje soj BGBU1-4, urađeni su unakrsni

bakteriocinski testovi sa bakteriocin proizvođačima, čiji su bakteriocini manje ili više okarakterisani sa sojem BGBU1-4 (Slika 17).



**Slika 17.** Šematski prikaz unakrsne bakteriocinske aktivnosti između različitih sojeva proizvođača bakteriocina

Bakteriocin proizvođači koji su korišćeni u ovom bakteriocinskom testu navedeni su u Tabeli 3. Na osnovu rezultata unakrsnih bakteriocinskih testova prikazanih na Slici 16, gde soj BGBU1-4 pokazuje sposobnost inhibicije rasta sojeva *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBM50, BGBM1-5, BGMN1-596T, ŠM1-19, ŠM1-191, LMG2081, NP45, može se konstatovati da soj BGBU1-4 ne proizvodi bakteriocine: laktokokcin G, LsbB, laktokokcin B, lakticin RM, lakticin LMG i nizin. Takođe, BGBU1-4 pokazuje sposobnost inhibicije rasta sojeva *Lactococcus lactis* IS29, VL2-8, JAV1 koji su bakteriocin proizvođači, ali im bakteriocini nisu još uvek okarakterisani. Ovim testom je pokazano da soj BGBU1-4 poseduje bakteriocin koji, pored toga što deluje na listeriju i laktobacile, deluje na veliki broj različitih prirodnih izolata laktokoka.

Kako metodom unakrsnog bakteriocinskog testa soja BGBU1-4 i ostalih sojeva bakteriocin proizvođača, nije mogao da se izvuče jedinstven zaključak o tome koji bakteriocin sintetiše soj BGBU1-4, dalje je korišćen PCR sa specifičnim prajmerima za prisustvo strukturnih gena odgovornih za sintezu sledećih bakteriocina: lakticin 481, laktokokcin 972, laktokokcin Q, lakticin 3147, laktokokcin M (Tabela 7). Nakon

provere PCR produkata, potvrđeno je da soj BGBU1-4 ne sintetiše ni jedan od ovih bakteriocina.

Na osnovu ovih rezultata se može konstatovati da soj BGBU1-4 sintetiše bakteriocin koji nije tipičan za laktokoke ili sintetiše potpuno nov bakteriocin. U dosadašnjem istraživanju, nije se došlo do sekvence DNK molekula u soju BGBU1-4 koja je odgovorna za sintezu ovog bakteriocina. Kako je cilj ovog istraživanja bio usmeren ka primeni ovog bakteriocina, njegova dalja identifikacija može biti predmet nekog drugog istraživanja.

#### **5.2.3.1. Lokalizacija gena za sintezu bakteriocina soja *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4**

Dalja karakterizacija bakteriocina soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4, uključivalo je čišćenje plazmida, što je za cilj imalo da se utvrdi lokacija gena za sintezu bakteriocina (hromozom ili plazmid). Dobijeni derivati, nakon čišćenja plazmida soja BGBU1-4, su testirani na bakteriocinsku aktivnost korišćenjem indikator sojeva *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM1-596 i *Listeria monocytogenes* ATCC19111. Na osnovu rezultata dobijenih nakon bakteriocinskih testova, iz dve grupe testiranih derivata, izdvajaju se derivati *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4/8 i BGBU1-4/29I (Tabela 17).

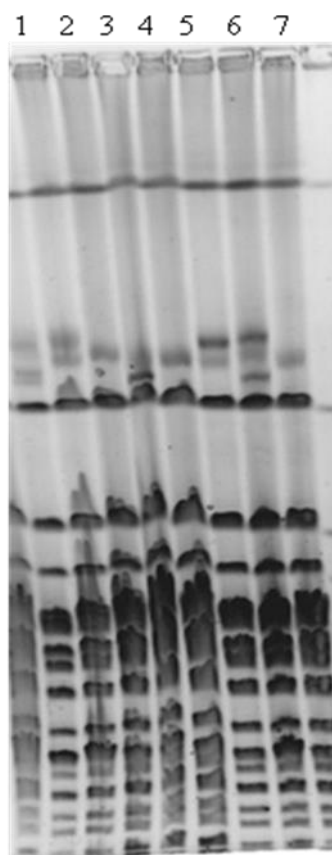
**Tabela 17.** Antimikrobno delovanje soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 i njegovih derivata nakon čišćenja plazmida

<b>Bakteriocin producenti</b>	BGBU1-4	BGBU1-4/8	BGBU1-4/29I
<b>Indikator sojevi</b>			
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBU1-4	-	-	-
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBU1-4/8	+	-	-
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGBU1-4/29I	++	+	-
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> BGMN1596	++	+	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111	+	-	-

++ = zona inhibicije veličine 4-6 mm; + = zona inhibicije veličine manja od 4 mm; - = ne postoji zona inhibicije.

Na osnovu rezultata bakteriocinskih testova prikazanih u Tabeli 17, vidi se da derivat BGBU1-4/8 ima sposobnost inhibicije rasta indikator soja BGMN1-596, ali ne pokazuje aktivnost na *L. monocytogenes* ATCC19111. S obzirom da je derivat BGBU1-4/8 senzitiv na delovanja BGBU1-4, može se pretpostaviti da je derivat BGBU1-4/8 tokom čišćenja plazmida izgubio plazmid na kojem se nalaze geni za sintezu bakteriocina koji deluje na *L. monocytogenes* ATCC19111. Drugi derivat, BGBU1-4/29I, ne pokazuje aktivnost ni na BGMN1-596, kao ni na *L. monocytogenes* ATCC19111, a senzitiv je na delovanje soja BGBU1-4 i derivata BGBU1-4/8, što ukazuje da je derivat BGBU1-4/29I tokom čišćenja plazmida izgubio plazmide koji su odgovorni za sintezu svih bakteriocina. Soj BGBU1-4 i njegovi derivati su nakon čišćenja plazmida su analizirani PFGE metodom, čime je utvrđeno da su derivati čišćenja plazmida istog porekla kao i soj BGBU1-4 (Slika 18).





**Slika 18.** *Sma*I PFGE restrikcioni profil soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 i njegovih derivata: 1) BGBU1-4; 2) BGBU1-4/8; 3) BGBU1-4/29I; 4) BGBU1-4/47; 5) BGBU1-4/83; 6) BGBU1-4/14I; 7) BGBU1-4/17I

Na kraju, na osnovu rezultata dobijenih nakon čišćenja plazmida, može se pretpostaviti da soj BGBU1-4 sintetiše dva bakteriocina, pri čemu jedan ima sposobnost inhibicije rasta sojeva *L. lactis* ssp. *lactis* BGMN1-596 i *L. monocytogenes* ATCC19111, a drugi ima samo sposobnost inhibicije rasta soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGMN1-596. Takođe, ono što je konstatovano testom čišćenja plazmida je da su geni, odgovorni za sintezu svih bakteriocina u soju BGBU1-4, locirani na plazmidima. Kako je bakteriocin koji ispoljava antilisterijsko delovanje, znatno interesantniji, dalja ispitivanja biohemijske karakteristike i njegove primene su se odnosile upravo na njega. Radi jednostavnijeg razumevanja, bakteriocin sa antilisterijskim delovanjem koji sintetiše soj BGBU1-4 je nazvan laktolisterin BU1-4.

### 5.2.3.2. Biohemijska karakterizacija bakteriocina laktolisterin BU1-4

Nakon izlaganja bakteriocina laktolisterin BU1-4 temperaturama u opsegu od 40°C-100°C, u periodima od 10, 30 i 60 min, testiranje njegove aktivnosti rađeno je difuzionim testom sa bunarčićima, a kao indikator korišćen je soj *L. monocytogenes* ATCC19111 (Tabela 18).

**Tabela 18.** Uticaj različitih temperatura na aktivnost bakteriocina laktolisterin BU1-4

Temperatura (°C)	Vreme (minuti)	Velicina zone (mm)
30°C	10	4,5
	30	4,5
	60	4,5
40°C	10	4,5
	30	4,4
	60	4,5
50°C	10	4,4
	30	4,5
	60	4,5
60°C	10	4,4
	30	4,3
	60	4,2
70°C	10	3,0
	30	2,8
	60	2,0
80°C	10	2,0
	30	0
	60	0
90°C	10	0
	30	0
	60	0
100°C	10	0
	30	0
	60	0

Utvrđeno je da bakteriocin laktolisterin BU1-4 zadržavao aktivnost na temperaturama u opsegu od 40°C-60°C tokom svih vremena inkubacije, gde su izmerene zone inhibicije od 4,5 mm. Daljim povećanjem temperature, tačnije na temperaturi od 70°C, nakon 10 i 30 min inkubacije, bakteriocin laktolisterin BU1-4 je

imao smanjenu aktivnosti, izmerena je zona od 3,0 mm, a nakon 60 min inkubacije, izmerena je zona inhibicije od 2,0 mm. Takvu aktivnost bakteriocin laktolisterin BU1-4 je imao i nakon izlaganja temperaturi od 80°C tokom 10 min, dok je dužim izlaganjem na ovoj temperaturi, kao i izlaganjem na višim temperaturama, potpuno gubio aktivost. Testiranjem aktivnosti bakteriocina laktolisterin BU1-4, nakon njegovog izlaganja temperaturama od +4°C i -20°C, tokom 30 dana, utvrđeno je da mu je aktivnost nepromenjena.

Kao i u prethodnim odeljcima ovog rada, u kojima je testiran uticaj pH vrednosti na aktivnost bakteriocina i u ovom slučaju je korišćen difuzioni metod sa bunarčićima, a kao negativna kontrola je korišćen bakteriocinski preparat soj BGBMN1-596 bez bakteriocinske aktivnosti. Dalje, za testiranje aktivnosti bakteriocina laktolisterin BU1-4 nakon delovanja različitih pH vrednosti, kao indikator korišćen je soj *L. monocytogenes* ATCC19111, a kao pozitivna kontrola korišćen je bakteriocinski preparat laktolisterin BU1-4 bez ikakvih tretmana (Tabela 19).

**Tabela 19.** Uticaj različitih pH vrednosti na aktivnost bakteriocina laktolisterin BU1-4

pH vrednost	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Veličina zone (mm)</b>	3,0	3,2	3,4	4,4	4,4	4,4	4,5	4,4	4,4	4,3	4,1	4,0

Na osnovu izmerenih zona inhibicije, bakteriocin laktolisterin BU1-4 pokazuje najjaču aktivnost u opsegu pH vrednosti od 4-10. U ovom opsegu izmerene su zone od 4,3 do 4,5 mm, što se podudara sa izmerenim veličinama zona inhibicije kod pozitivne kontrole. Niže pH vrednosti utiču na smanjenje aktivnosti bakteriocina laktolisterin BU1-4, pa su na pH vrednostima 1, 2, 3, izmerene zone inhibicije 3,0, 3,2, 3,3 mm. Više pH vrednosti 11 i 12, imaju gotovo zanemarljiv uticaj na smanjenje aktivnosti bakteriocina laktolisterin BU1-4, s obzirom da su izmerene zone inhibicije 4,1 i 4,0 mm.

Nakon delovanja pojedinačnih proteolitičkih enzima: pronaza E, proteinaza K, pepsin i tripsin, na bakteriocin laktolisterin BU1-4, dobijeni rezultati njegove antilisterijske aktivnosti ukazuju na potpuno odsustvo aktivnosti. Testiranjem uticaja

enzima: lizozim, lipaza, DNKaza, RNKaza, na aktivnost bakteriocina laktolisterin BU1-4, pokazano je da ovi enzimi nemaju nikakav uticaj na njegovu antilisterijsku aktivnost.

### 5.2.3.3. Antilisterijsko ispitivanje bakteriocina laktolisterin BU1-4

Na osnovu rezultata dobijenih nakon ispitivanja biohemijskih karakteristika bakteriocina laktolisterin BU1-4, konstatovano je da bakteriocin laktolisterin BU1-4 zadržava antilisterijsku aktivnost nakon izlaganja nepovoljnim uslovima, što mu omogućava korišćenje u različitim sredinama. Iz tog razloga, ispitivana je antilisterijska aktivnost bakteriocina laktolisterin BU1-4 u bujonu, kao preliminarni test, a zatim je ispitivana njegova antilisterijska aktivnost u model sistemu sira.

#### 5.2.3.3.1. Rast *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u prisustvu bakteriocinskog preparata laktolisterin BU1-4 u GM17 bujonu

Ispitivanje antilisterijskog efekta bakteriocina laktolisterin BU1-4 je rađeno praćenjem rasta *L. monocytogenes* ATCC19111 u GM17 bujonu na 37°C tokom 48 h u prisustvu bakteriocinskog preparata laktolisterin BU1-4 (varijanta B). Kao negativna kontrola korišćen je preparat očišćenog derivata soja BGBU1-4 bez bakteriocinske aktivnosti, BGBU1-4/29I (Bak<sup>-</sup>, Bak<sup>S</sup>) (varijanta A), dok je kao pozitivna kontrola, korišćen bakteriocinski preparat soja *L. lactis* ssp. *lactis* NP45 (nizin producent) (varijanta C).

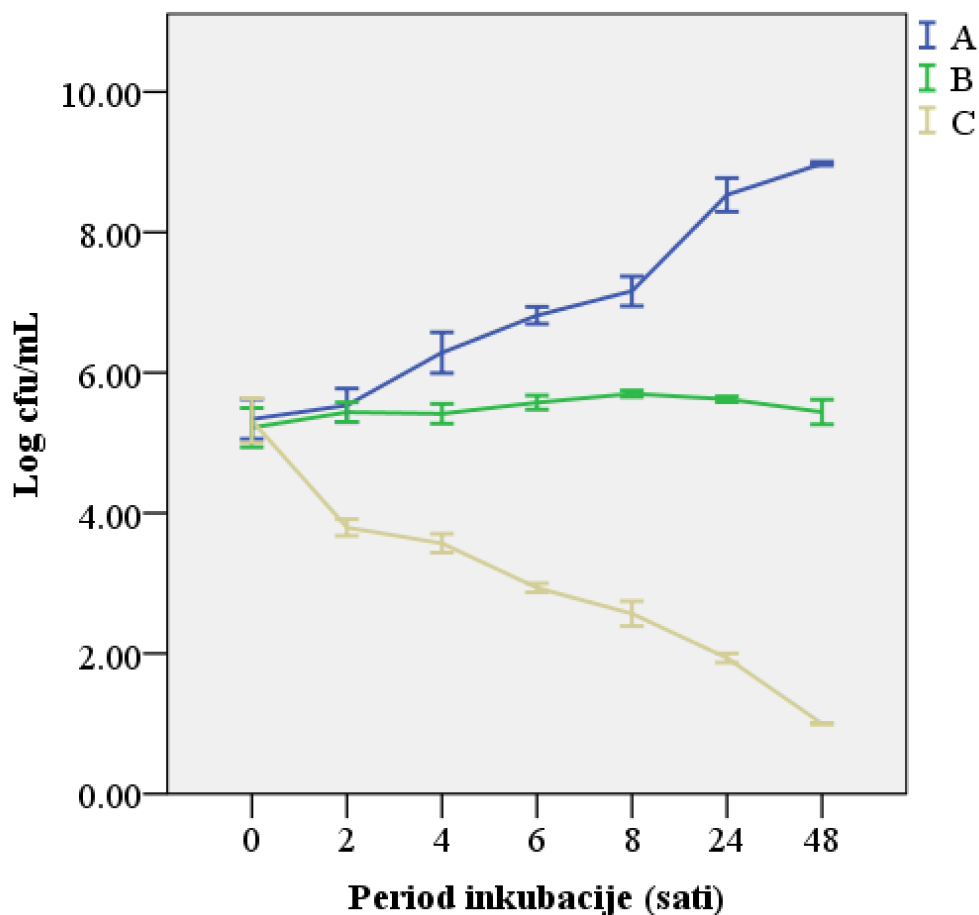
Rezultati promene broja ćelija *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u svim GM17 bujona, tokom 48 h inkubacije na 37°C, prikazani su u Tabeli 20.

**Tabela 20.** Promena broja ćelija *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u GM17 bujonu

Sati	0	2	4	6	8	24	48
<b>Varijanta</b>							
<b>A</b>	$2,4 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$5 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$
<b>B</b>	$1,8 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$
<b>C</b>	$3 \times 10^5$	$6,3 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$8,7 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$	$8,7 \times 10^1$	$1 \times 10^1$

A –bakteriocinski preparat derivata BGBU1-4/29I (Bak<sup>-</sup>, Bak<sup>s</sup>); B – bakteriocinski preparat laktolisterin BU1-4; C – bakteriocinski preparat soja NP45

U prisustvu bakteriocinskog preparata laktolisterin BU1-4 (varijanta B), nisu uočene značajne promene broja ćelija *L. monocytogenes* ATCC119111 tokom svih 48 h inkubacije na 37°C. U poređenju sa varijantom A, u prisustvu nebakteriocinskog preparata, gde se broj ćelija *L. monocytogenes* ATC19111 povećava tokom svih 48 h, a finalno za čak 3,5 log cfu/mL, može se konstatovati da su promene nastale u varijanti B gotovo beznačajne. U varijanti A, najveći rast beleži se u periodu od 8-24 sata inkubacije. U tom periodu u varijanti B dolazi do neznatnog pada broja ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111. U prisustvu bakteriocinskog preparata soja NP45 (varijanta C), broj ćelija *L. monocytogenes* ATC19111 opada tokom celog perioda inkubacije. Najveći pad se beleži u prva dva sata inkubacije, gde je zabeležen pad od gotovo 2 log cfu/mL. Finalno, u varijanti C, beleži se pad od gotovo 4 log cfu/mL (Grafik 1).



**Grafik 1.** Promena broja *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u GM17. A – bakteriocinski preparat derivata BGBU1-4/29I (Bak<sup>-</sup>, Bak<sup>s</sup>); B – bakteriocinski prerparat laktolisterin BU1-4; C – bakteriocinski preparat soja NP45.

Nakon dobijenih rezultata ispitivanja aktivnosti bakteriocina laktolisterin BU1-4 na *L. monocytogenes* ATCC19111 u GM17 bujonu, može se konstatovati da je bakteriocin laktolisterin BU1-4 pokazao bakteriostatički efekat tokom svih 48 h inkubacije. Zabeležen je nesmetan rast broja ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 u prisustvu nebakteriocinskog preparata derivata BGBU1-4/29I, dok je bakteriocinski preparat nizina pokazao bakteriocidni efekat.

#### 5.2.3.3.2. Rast *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u prisustvu bakteriocinskog preparata laktolisterin BU1-4 u modelu sira

S obzirom da je bakteriocin laktolisterin BU1-4 u GM17 bujonu pokazao bakteriostatički efekat, dalje testiranje je bilo usmereno na ispitivanje njegove antilisterijske aktivnosti u nepovoljnoj sredini, kao što je sir, pri temperaturnim uslovima koji su značajni u procesu proizvodnje i skladištenja sira. Bakteriocinski preparat laktolisterin BU1-4 je dodat u model sira u odnosu 1:10 - (preparat:model sira) (varijanta Bs). Kao pozitivna kontrola korišćen je preparat soja *L. lactis* ssp. *lactis* NP45 (nizin producent) (varijanta Cs) a kao negativna kontrola korišćen je preparat derivata soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4, BGBU1-4/29I (Bak<sup>-</sup>, Bak<sup>s</sup>) (Varijanta As). U obe kontrolne varijante, preparat je dodat u model sira u odnosu 1:10 (preparat:model sira). U svim varijantama modela sira, početni broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 bio je 10<sup>5</sup> cfu/g. Rast *L. monocytogenes* ATCC19111 je praćen u sledećim tačkama procesa:

0 dan – nakon dodatka *L. monocytogenes* ATCC19111 i bakteriocinskog preparata u model sira

1 dan – nakon inkubacije modela sira na 18°C tokom 24 h

7 dan – nakon inkubacije modela sira na 12°C tokom 6 dana

14, 21, 28, 35 dana – nakon skladištenja modela sira na 4°C.

Rezultati promene broja ćelija *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u svim varijantama modelu sira, prilikom celog procesa proizvodnje i skladištenja, prikazani su u Tabeli 21.

**Tabela 21.** Promena broja ćelija *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u modelu sistemu sira

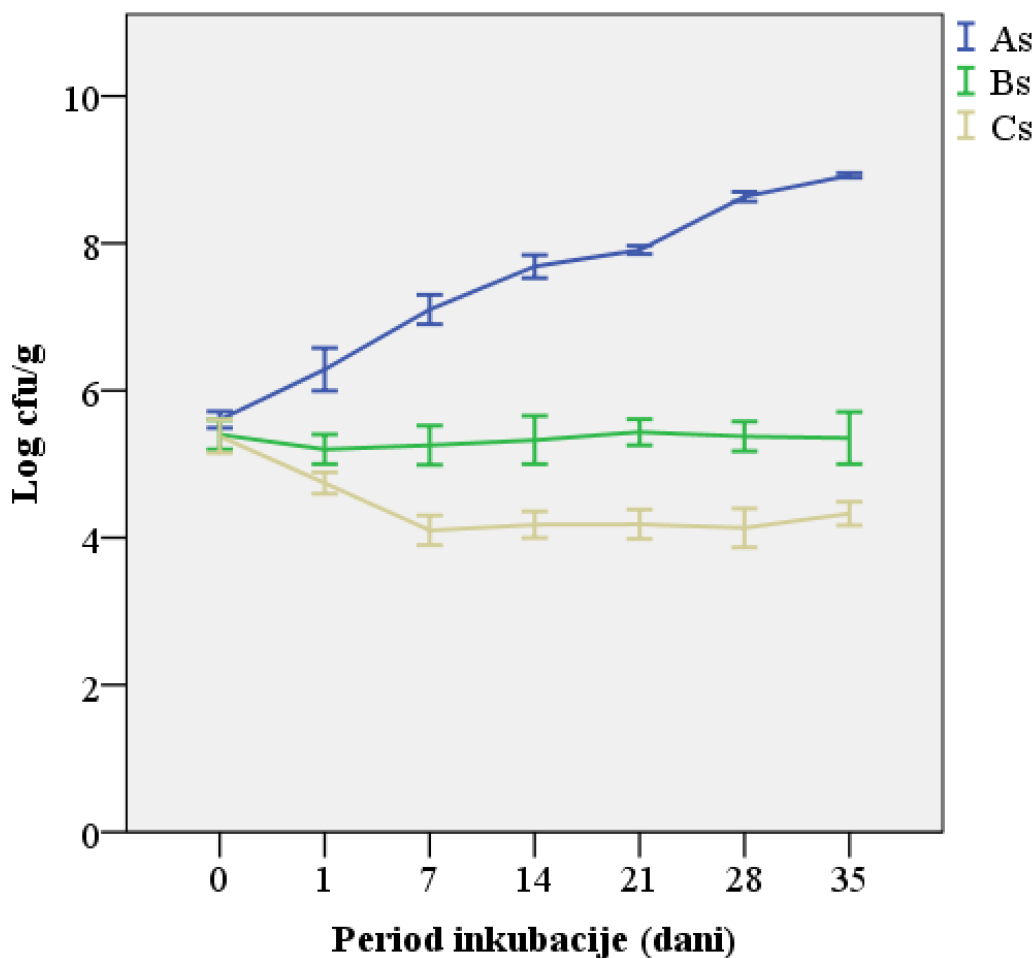
Dani	0	1	7	14	21	28	35
<b>Varijanta</b>							
<b>As</b>	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$5 \times 10^7$	$8,1 \times 10^7$	$4,7 \times 10^8$	$8,5 \times 10^8$
<b>Bs</b>	$2,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$
<b>Cs</b>	$2,5 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$

As –bakteriocinski preparat derivata BGBU1-4/29I (Bak -); Bs – bakteriocinski prerparat laktolisterin BU1-4; Cs – bakteriocinski preparat soja NP45.

U toku prva 24 h inkubacije na 18°C, beleži se rast broja ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 u varijanti As (preparat bez bakteriocinske aktivnosti) za ~0,8 log cfu/g. Taj trend se nastavlja i tokom 7 dana inkubacije modela sistema sira na temperaturi od 12°C (Tabela 21). U varijanti Bs (bakteriocinski preparat laktolisterin BU1-4), nakon prvih 24 h, kao i nakon 7 dana na 18°C, broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 ostao je na početnom nivou ( $10^5$  cfu/g). U varijanti modela sira sa dodatkom bakteriocinskog preparata soja *L. lactis* ssp. *lactis* NP45 (varijanta Cs), u prva 24 h, broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 opada za ~0,7 log cfu/g. Dalje, nakon inkubacije model sistema sira sa nizinom na 12°C tokom 7 dana, beleži se blaži pad broja ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111, za oko ~0,4 log cfu/g.

U toku perioda skladištenja modela sistema sira, u varijanti As, beleži se konstantan rast broja ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111, nakon 14, 21, 28, 35 dana. U varijantama Bs i Cs, nivo broja ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 ostaje nepromenjen tokom svih dana skladištenja (Grafik 2).





**Grafik 2.** Promena broja ćelija *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u model sistemu sira. As –bakteriocinski preparat derivata BGBU1-4/29I (Bak<sup>-</sup>, Bak<sup>S</sup>); Bs – bakteriocinski prerparat laktolisterin BU1-4; Cs – bakteriocinski preparat soja NP45.

Sagledavajući ceo proces proizvodnje model sistema sira, evidentno je da u varijanti As nije bilo bakteriocinske aktivnosti (negativna kontrola), dok je u varijantama Bs i Cs detektovana bakteriostatička aktivnost. U varijanti Bs, od početka do kraja procesa beleži se nepromenjen broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111, u odnosu na početni broja. Ova aktivnost je bila intezivnija u varijanti Cs u prvih 7 dana, a dalje je ostala nepromenjena kao i kod varijante Bs. Na osnovu dobijenih rezultata, može se konstatovati da bakteriocin laktolisterin BU1-4 zadržava bakteriostatičku aktivnost u GM17 bujonu i model sistemu sira, dok je nizin u GM17 bujonu pokazao bakteriocidni efekat, a u modelu sira bakteriostatički. Dalja istraživanja mogu biti usmerena u kombinaciji ova dva bakteriocina u toku proizvodnje sira ili kombinacija

negog drugog antilsterijskog jedinjenja i bakteriocina laktolisterin BU1-4 u proizvodnji sira.

## **6. DISKUSIJA**

Bakterije mlečne kiseline (BMK) naseljavaju različite prirodne niše, mogu se naći na biljkama, životinjama i životinjskim proizvodima. U težnji da se adaptiraju na različite uslove sredine i izbore za svoj prostor u konkurenciji sa drugim bakterijskim vrstama, BMK sintetišu različita jedinjenja, a među njima se izdvajaju bakteriocini. Bakteriocini su ribozomalno sintetisani antimikrobni peptidi, koji su u dosadašnjim studijama testirani kao prirodni konzervansi hrane, a od nedavno u farmaceutskoj industriji kao zamena za antibiotike ili dopuna antibioticima. Kako se u svetu i kod nas pojavljuje sve veći problem sa bakterijama koje nose antibiotske rezistencije, testiranje bakteriocina je usmereno i na sinergističko delovanje antibiotika i bakteriocina na antibiotike rezistentne bakterije (Mataraci i Dosler, 2012).

Iz tog razloga, postoji stalna težnja za izolacijom novih sojeva BMK, koje sintetišu bakteriocine sa većim potencijalom. Dugi niz godina, istraživanja su bila usmerena na industrijske sojeve BMK laktobacila i laktokoka, ali poslednjih godina raste interesovanje za istraživanja bakteriocina prirodnih izolata BMK (Lozo, 2008). Razlog tome su znatno raznovrsnije karakteristike prirodnih izolata, kao i mogućnost sinteze novih bakteriocina sa širim spektrom delovanja. Izvor prirodnih izolata BMK mogu biti, između ostalih prehrambenih proizvoda, fermentisani proizvodi od mleka koji su proizvedeni na tradicionalan način bez dodatka industrijskih sojeva (Radulović, 2007). Pored sireva, različite vrste voća takođe mogu predstavljati bogat izvor prirodnih izolata BMK. Većina BMK imaju status GRAS, čime ispunjavaju osnovni uslov, da se one ili njihovi produkti, mogu koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Iz tog razloga, detaljnija molekularna i biohemijska karakterizacija bakteriocina, koja pruža veliki broj korisnih informacije o samom peptidu, je više nego neophodna pre upotrebe bakteriocina.

Laktokoke su široko rasprostranjen rod BMK, i zbog svojih karakteristika, našle su najveću primenu kao starter kulture u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda. Takođe, široko rasprostranjeni bakteriocini koji se komercijalno koriste u više od 50 zemalja širom sveta, nizin i pediocin PA-1/AcH, su izolovani iz laktokoka (Cotter et al., 2005). U ovom radu, korišćenjem standardnih mikrobioloških metoda, iz sireva, napravljenih na tradicionalan način bez dodatka startera, kao i iz svežeg voća, izolovan je veliki broj sojeva koji pripadaju rodu *Lactococcus* sp, u težnji da se dobije

soj sa bakteriocinskom aktivnošću. Svi izolati su testirani na bakteriocinsku aktivnost, i kao najinteresantniji su izdvojena tri izolata za dalje ispitivanje bakteriocina.

Nakon izolacije i karakterizacije odabranih sojeva, korišćenjem standardnih mikrobioloških i biohemijskih metoda, dalja determinacija nastavljena je korišćenjem molekularnih metoda. Poslednjih godina, molekularne metode u identifikaciji bakterija se intezivno razvijaju, jer je primećeno da korišćenjem samo klasičnih biohemijskih metoda, u velikom broju slučajeva se dobijaju dvosmisleni rezultati ili nedovoljno precizni rezultati (Dubernet et al., 2002; Moreira et al., 2005). Međutim, korišćenjem molekularnih metoda sekvenciranja 16S rDNK, vrlo često se ne mogu razlikovati podvrste i biovarijeteti vrste *Lactococcus lactis* (Moraes et al., 2013). Iz tog razloga, najkompletniji rezultati, u identifikaciji BMK, se dobijaju kombinacijom fenotipskih i molekularnih metoda. Kombinacijom molekularnih i klasičnih biohemijskih metoda, ustanovljeno je da sva tri prirodna izolata (BGBM50, LMG2081 i BGU1-4) pripadaju vrsti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

Nakon identifikacije tri ispitivana izolata, dalje su molekularno i biohemijski okarakterisani njihovi bakteriocini. Takođe, ispitan je uticaj bakteriocina *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 na rast *Listeria monocytogenes* u medijumu i model sistemu sira.

## 6.1. Bakteriocin BacBM50

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50, utvrđeno je da sintetiše bakteriocin. Bakteriocin je imenovan kao BacBM50. Analizom plazmidnog profila je konstatovano da soj BGBM50 poseduje veći broj plazmida, kako malih, tako i velikih. Metodom čišćenja plazmida, izdvojeno je 7 najinteresantnijih derivata, a upoređivanjem njihovih *Sma*I PFGE restrikcioni paterni, ustanovljeno je da derivatu koji nema sposobnost sinteze i imunosti na bakteriocin BacBM50, nedostaje veliki plazmid od 145,5 kb (Slika 6). Ovim rezultatom, nedvosmisleno je pokazano da se genetičke determinante koje kodiraju bakteriocin BacBM50 nalaze na plazmidu. Do sada su zabeleženi različiti slučajevi, kada su genetičke determinante za sintezu i imunost na bakteriocine locirane na hromozomu (Diep et al., 1996; Jimenez-Diaz et al., 1995) i kad su genetičke determinante smeštene na plazmidima (Qadri et al., 1995; Kanatani et al., 1995; Gajic et al., 1999). Sličan slučaj, gde su geni za sintezu

bakteriocina i imunost na bakteriocin lokalizovani na velikom plazmidu, zabeležen je u slučaju soja *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 (Kojic et al., 2005).

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja biohemijskih karakteristika, pokazano je da je bakteriocin BacBM50 zadržava aktivnost u širokom temperaturnom opsegu, sa najjačom aktivnošću u temperaturnom opsegu od 30°C-70°C, kao i da mu je aktivnost nepromenjena nakon izlaganja temperaturama +4°C i -20°C. Daljim ispitivanjem biohemijskih karakteristika, bakteriocin BacBM50 je zadržavao aktivnost u opsegu pH vrednosti od 1-12, ali sa najjačom aktivnošću u opsegu pH vrednosti od 5-7 i na kraju. Na kraju, ispitivanjem uticaja različitih enzima na aktivnost bakteriocina BacBM50, pokazano je da svi testirani proteolitički enzimi (pepsin, tripsin, proteinaza K, pronaza E) dovode do gubitka njegove aktivnosti, što je veoma važna karakteristika jer ga čini bezbednim za upotrebu u proizvodima namenjenim ljudskoj ishrani. Slične biohemijske karakteristike su pokazali i bakteriocini izolovani iz sojeva *Lactobacillus murinus* AU06 (Elayaraja et al., 2014), *Lactobacillus brevis* UN (Gautam et al., 2014), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 (Lozo, 2008), kao i iz *Lactococcus lactis* MM19 i *Pediococcus acidilactici* MM33 (Millete et al., 2006). Takođe, pored ovih bakteriocina, mnogi bakteriocini prirodnih laktokoka, izolovanih na teritoriji Srbije, pokazuju slične biohemijske karakteristike, LsbB i S50 (Gajic et al., 1999; Kojic et al., 1991).

U cilju determinacije bakteriocina BacBM50, korišćena je kombinacija PCR testiranja sa specifičnim prajmerima za sintezu već poznatih bakteriocina i unakrsnih bakteriocinskih testova sa bakterijskim sojevima, bakteriocin proizvođačima, do sada okarakterisanih bakteriocina. Nakon ovih testiranja, utvrđeno je da soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50 sintetiše bakteriocin laktokcin G, koji je poznat i okarakterisan bakteriocin sa dvopeptidnom strukturom i pripada klasi IIb bakteriocina. Laktokokcin G je pronađen i u prirodnom izolatu, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 2A27, koji je izolovan iz Španskog tradicionalnog sira bez dodatka startera (Alegria et al., 2010). Na osnovu podataka iz literature poznato je da su različite grupe naučnika nezavisnim radom okarakterisale isti bakteriocin. Takav je slučaj sa pediocinom AcH koji sintetiše *Pediococcus acidilactici* H (Motlagh et al., 1992) za koji je pokazano da je identičan pediocinu PA-1 koji sintetiše *P. acidilactici* PAC10 (Marugg et al., 1992), ili kurvacin A koji sintetiše *L. curvatus* LTH1174 (Tichaczek et al., 1992) koji je identičan sakacinu

A koji sintetiše *L. sakei* Lb706 (Holck et al., 1992) ili hiracin JM79 koji sintetiše *Enterococcus hirae* DCH5 (Sánchez et al., 2007) koji je identičan sa bakteriocinom T8 koji sintetiše *E. faecium* T8 (de Kwaadsteniet et al., 2006). Ovi rezultati su pokazali da su isti bakteriocini nađeni kako u istim, tako i u različitim vrstama, koje ne samo da su udaljene u pogledu klasifikacije nego i naseljavaju potpuno različita staništa. Malo se zna o evoluciji gena koji kodiraju bakteriocine kod različitih bakterija. Analize genoma sekvenciranih vrsta iz roda *Lactobacillus* su potvrdile da geni za bakteriocine spadaju u grupu gena koji su podložni horizontalnom transferu gena (Makarova i Koonin, 2007). Interesantno je da su se autori opredelili za analizu baš ove fenotipske karakteristike u odnosu na mnoge druge koje bakterije poseduju. Jedan od razloga je, da je pokazano da postoji izvesna konzerviranost u bakteriocinskim operonima što ukazuje da je sinteza bakteriocina selektivna prednost za soj koji ga sintetiše. Na taj način u nepovoljnim uslovima sredine kada bakterijska populacija dostigne određenu brojnost, a koncentracija nutrijenata se drastično smanji, "quorum sensing" mehanizmom ili na neki drugi način dolazi do aktiviranja intenzivne sinteze bakteriocina (Kleerebezem i Quadri, 2001).

Ispitivanjem antimikrobnog spektra delovanja bakteriocina laktokokcina G iz soja BGBM50, pokazano je laktokokcin G ispoljava veoma uzak spektar delovanja. Pokazuje aktivnost jedino u odnosu na neke laktokoke, dok na patogene sojeve (Gram-pozitivne i Gram-negativne) ne deluje. Slični rezultati su dobijeni i u slučaju već pomenutog laktokokcina G soja izolovanog laktokoka iz Španskog tradicionalnog sira bez dodatka startera (Alegria et al., 2010), kao i u slučaju dvopeptidnog bakteriocina laktokokcina Q (Zendo et al., 2006). Dobijeni podaci su u korelaciji sa definicijom bakteriocina, da su to mali ribozomalno sintetisani peptidi ili proteini sa uskim spektrom antimikrobne aktivnosti koja je ograničena na blisko srodne vrste i soj proizvođač poseduje mehanizam specifične samozaštite (Jack et al., 1995). Međutim, neki bakteriocini, kao što su pediocin AcH (Motlagh et al., 1992), laktocin 705 (Cuozzo et al., 2000), DF4Mi (Furtado et al., 2015), imaju širi spektar delovanja. Kao poseban bakteriocin, izdvaja se nizin, koji može delovati na Gram-negativne bakterije, ako im je prethodno oštećena spoljašnja membrana (Stevens et al., 1991), kao i na *Clostridium difficile* (Lay et al., 2016). Mnogi bakteriocini ne mogu delovati na patogene bakterije

samostalno, ali u kombinaciji sa nekim spoljašnjim faktorima kojim se oštećuje spoljašnja membrana, mogu imati inhibitorni efekat (Luders et al., 2003).

U ovom delu rada, okarakterisan i determinisan je bakteriocin prirodnog izolata *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50, laktokokcin G. Ovaj bakteriocin je pokazao dobre biohemijske karakteristike, ali kao i svi nemodifikovani dvopeptidni bakteriocini, pokazuje uzak spektar delovanja ograničen samo na laktokoke (Garneau et al., 2002). Najviše sličnosti, bakteriocin laktokokcin G pokazuje sa laktokokcin Q i enterocin 1071. Za njihovu antimikrobnu aktivnost potrebna su oba peptida, odnosu 1:1, a kako ovi bakteriocini pokazuju visok stepen identičnosti, njihov mehanizam delovanja je identičan. Za ciljnu ćeliju se vezuju preko Upp proteina, nakon čega formira pore na membrani preko kojih dolazi do curenja ćelijskog materijala i monovalentnih katjona, kao što su  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ , što rezultira smrću ćelije (Moll et al., 1998, Kjos et al., 2014). Za ostale dvopeptidne bakteriocine nema dokaza da koriste ovaj mehanizam delovanja na ciljnu ćeliju, što ukazuje na visoku specifičnost delovanja bakteriocina laktokokcina G. Zahvaljujući ovom specifičnom mehanizmu delovanja laktokokcina G, buduća istraživanja bi mogla biti usmerena na ispitivanje njegovog korišćenja kao prirodnog konzervansa hrane u kombinaciji sa nekim drugim antimikrobnim faktorima koji koriste drugi mehanizam delovanja, čime postoji mogućnost pojačavanja i proširivanja antimikrobnog potencijala bakteriocina.

Ono što treba naglasiti je da iako je izolovan soj BGBM50 koji sintetiše već poznati bakteriocin laktokokcin G, otkriće ovog soja je omogućilo da se u soju LMG2081 otkrije postojanje još jednog bakteriocina.

## 6.2. Bakteriocin lakticin LMG

U testovima unakrsne bakteriocinske aktivnosti, primećeno je da bakteriocinski preparat soja *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081 ima sposobnost inhibicije soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50. Kako je metodom PCR potvrđeno da je soj LMG2081 laktokokcin G, kao i soj BGBM50, pretpostavljeno je da soj LMG2081 sintetiše još jedan bakteriocin ili da jedan od ova dva soja sintetiše nešto drugačiji laktkokcin G (drugačiji mehanizam delovanja ili poseduje drugačiji mehanizam imunosti na laktokokcin G).



Sekvenciranjem i analizom genoma, potvrđeno je da oba soja poseduju kompletne operone za sintezu bakteriocina laktocina G. Daljom analizom genoma, pronađen je operon, koji je nazvan *lctLMG*, koji je pokazao sličnu organizaciju sa operonima bakteriocina koji pripadaju lakticin 481 grupi. Na kraju operona *lctLMG*, nalazi se još jedan ORF koji kodira DNK invertazu, što ukazuje na kraj operona *lctLMG*. U slučaju operona nukacin ISK-1, koji takođe pripada bakteriocinima lakticin-481 grupe i pokazuje veliku sličnost sa jednim ispitivanim bakteriocinom, na kraju operona nalazi se gen *nukH* koji je odgovoran za pojačanu imunost na ovaj bakteriocin (Aso et al., 2005). Većina bakteriocina grupe lakticin-481, kao što je lakticin 481, ne poseduju ovaj dodatni gen za imunost. Međutim, lakticin 481, poseduje transkripcioni regulator koji se nalazi ispred operona (Uguen et al., 2000). Kako ovaj podatak nije bio od interesa u toku karakterizacije bakteriocina iz soja soja LMG2081, nije lociran kontig koji se nalazi uzvodno operona *lctLMG*, pa je i sekvenca koja se nalazi ispred operona *lctLMG* nepoznata. Sa tim u vezi, dodatni geni (ukoliko postoje) odgovorni za sintezu ili regulaciju ekspresije bakteriocina lakticina LMG, nisu poznati.

Daljom analizom sekvence operona *lctLMG*, utvrđeno je da se prekursor peptid sastoji od 49 aminokiselina, kao i kod većine lantibiotika lakticin-481 grupe. Analizom aminokiselinske sekvence propeptida lakticina LMG i njegovog lider peptida, ustanovljene su razlike u odnosu na lakticin 481 i ostale reprezentativne lantibiotike (Slika 9). Sekvenca propeptida lakticina LMG pokazuje 76% identičnosti sa lakticinom 481 i 74% identičnosti sa nukacin ISK-1. Sekvence lider peptida lakticina LMG pokazuje 76% i 50% identičnosti sa lakticinom 481 odnosno nukacin ISK-1. Zreo peptid lakticina LMG je kraći za dve aminokiseline u odnosu na lakticin 481 i nukacin ISK-1. Dalje, u lakticinu LMG, tri cisteina (Cys), dva treonina (Thr) i serin na poziciji 9 (Ser9, serin na devetom mestu u zrelom peptidu), postranslacionim promenama učestvuju u formiranju strukture oblika prstena i konzervirane su. Serin na poziciji 18 koji je prisutan kod većine lantibiotika laticin-481 grupe, je u slučaju lakticina LMG zamenjen sa treoninom na poziciji 16 i prolazi kroz posttranslacione promene dehidratacije. Prilikom istraživanja, Jack et al. (1994) su utvrdili da kod streptokokcina SA-FF22, formacija tioestarskih mostova između Cys i dehidriranog Thr18 rezultuju formiranjem 3-metillantionina (MeLan: Abu-S-Ala; Abu-aminobutirinska kiselina; Ala-alanin; S-sumpor). Takođe, Asaduzzaman i Sonomoto, (2009) su utvrdili da se kod

streptokokcina SA-FF22 na dva mesta formiraju MeLan veze, a na jednom mestu Lan veza (Lan: Ala-S-Ala), dok se kod lakticina 481 i nukacina ISK-1 formira na jednom mestu MeLan veza, a na dva mesta Lan veza, ali i pored toga sva tri lantibiotika imaju istu šemu veza, što ove bakteriocine svrstava u istu grupu, odnosno lakticin-481 grupu.

Lakticin LMG je izolovan iz amonijum sulfatnog precipitata 16 h kulture mutanta LMG2081/ pG<sup>+</sup>hostlctLMG (*ΔlctLMG*), korišćenjem RP-HPLC. Nakon provere aktivnosti dobijenih frakcija, određena masa aktivne frakcije korišćenjem MS/HPLC i ESI-TOF analizom. Na osnovu dobijene mase i analize aminokiselinske sekvence operona lctLMG, pretpostavljeno mesto odsecanja lider peptida u lakticin LMG je između Ala/Gly, gde se dobija zreo peptid od 25 aminokiselina. Ovo je u suprotnosti sa ostalim poznatim lantibioticima grupe-481, koji se uglavnom sastoje od 27 aminokiselina (Uguen et al., 2000; Wiley et al., 2007). Međutim, u slučaju lakticina LMG, na osnovu ove teorije dobija se preračunata molekulska masa aktivnog peptida koja iznosi 2759 Da, što je u apsolutnoj korelaciji sa molekulskom masom aktivne frakcije dobijenom ESI-TOF masenom spektrometrijom. Iako lakticin LMG pokazuje visok stepen identičnosti sa prethodno okarakterisanim lantibioticima grupe-481 (lakticin 481 i nukacin ISK-1), može se tvrditi da je lakticin LMG novi lantibiotik koji ima jedinstvenu molekulsku masu, aminokiselinske zamene i strukturu operona.

U literaturi je poznato da laktokoke mogu sintetisati više od jednog bakteriocina, međutim ono što se zna do sada je da laktokoke koje sintetišu dva ili više bakteriocina pripadaju istoj klasi. Neki od primera su *L. lactis* subsp. *lactis* 9B4 i *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, koji sintetišu najmanje tri različita bakteriocina (van Belkum et al., 1991; Kojic et al., 2006), koji pripadaju klasi II. Do sada, nikada nije zabeležen slučaj sinteze dva bakteriocina koji pripadaju različitim klasama, tačnije jedan bakteriocin pripada klasi I (lantibiotik-lakticin LMG), a drugi bakteriocin pripada klasi IIb (dvopeptidni laktokokcin G).

Takođe, ono što je vrlo interesantno je da se geni koji kodiraju bakteriocine lakticin LMG i laktokokcin G u soju LMG2081 nalaze na različitim genetičkim elementima. Tačnije, operon koji je odgovoran za sintezu lakticina LMG se nalazi na plazmidu, dok je operon koji je odgovoran za sintezu laktkokcina G smešten na hromozomu soja LMG2081. Geni koji kodiraju bakteriocine mogu se nalaziti na hromozomu (Diep et al., 1996), ali vrlo često na mobilnim genetičkim elementima, kao

što su plazmidi ili transpozoni (Kojic et al., 2006). Mnoge studije su pokazale da je konjugacija čest mehanizam transfera genetičkog materijala između BMK (Neve et al., 1987; Gabin-Gauthier et al., 1991), a kako se prirodni sojevi BMK nalaze u okruženjima sa kompleksnom strukturom koja predstavlja pogodne uslove za transfer plazmida ili transpozona putem konjugacije (Moschett et al., 1996), to može biti eventualno objašnjenje prisutnosti operona na različitim genetičkim elementima u jednom soju, koji kodiraju sintezu dva bakteriocina različitih klasa.

Bakteriocin lakticin LMG je pokazao jako dobre biohemijske karakteristike. Izuzetno je temperaturno rezistentan, zadržava između 85-90% aktivnosti na temperaturi od 100°C tokom 60 min inkubacije. Dalje, pokazao je aktivnost u opsegu pH od 1-12, a maksimalna vrednost u opsegu od 5-10. Takođe, nakon izlaganja lakticina LMG dejstvu pronaze E, proteinaze K, pepsina i tripsina, potpuno je gubio aktivnost. Do sada je pokazano da slične osobine mogu pokazivati mnogi bakteriocini klase II, kao što su laktokokocin G (ovaj rad), bakteriocin S50 (Kojic et al., 1999), LsbB (Gajic et al., 1999; Gajic et al., 2003), lakticin RM (Strahinić et al., 2007). Međutim, o biohemijskim karakteristikama bakteriocina klase, grupe lakticin-481, nema puno podataka. Bakteriocin nukacin 3299, koji pripada grupi lakticin-481, i pokazuje izuzetnu sličnost sa bakteriocinom nukacin ISK-1, pokazuje slične biohemijske karakteristike kao i lakticin LMG (Ceotto et al., 2010).

Testiranjem lakticina LMG na različite patogene hrane, kao i na laktobacile, nije dao aktivnost. Na osnovu toga, može se konstatovati da lakticin LMG, ima uzak spektar delovanja, ograničen samo na laktokoke. Za razliku od lakticina LMG mnogi bakteriocini klase I pokazuju znatno širi spektar delovanja, kao što su, nizin koji deluje i na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, zatim lakticin 3147 koji pokazuje aktivnost na *Staphylococcus aureus* (Galvin et al., 1999; Dal Bello et al., 2012). Takođe, neki lantibiotici grupe-481, pokazuju širi spektar delovanja, lakticin 481 (Piard et al., 1992; Dal Bello et al., 2012), nukacin ISK-1 (Kimura et al., 1997; Asaduzzaman et al., 2009), nukacin 3299 (Ceotto et al., 2010).

Na osnovu iznetih rezultata se može zaključiti da soj LMG2081 sintetiše nov bakteriocin, lakticin LMG, koji pokazuje sličnost sa bakteriocinima nukacin ISK-1 i lakticin 481 i pripada klasi I bakteriocina. Takođe, dokazano je da soj LMG2081, poseduje kompletne operone za sintezu bakteriocina laktokcina G i lakticina LMG, a

koji se nalaze na hromozomu i plazmidu, redom. Ovo je prvi zabeležen slučaj da jedan soj ima sposobnost da sintetiše dva bakteriocina koji pripadaju različitim klasama. Primena bakteriocina lakticina LMG bila bi ograničena, s obzirom na njegovu jaku inhibitornu aktivnost na laktokoke, kao i optimiziranih uslova za dobijanje prečišćenog molekula u dovoljnim količinama, može se razmišljati o njegovoj primeni u proizvodnji sireva sa dugim zrenjem. Naime, njegovom usmerenom aktivnošću na laktokoke, mogu se osloboditi intracelularni enzimi, što bi dovelo do ubrzavanja procesa zrenja sira. U nekim studijama su već korišćeni neki od lantibiotika, kao što je lakticin 481, u svrhu ubrzavanja zrenja sireva (O'Sullivan et al., 2002). Takođe, pored uloge da ubrzaju zrenja, neki bakteriocini ove klase su korišćeni za poboljšanje arome sira (Oumer et al., 2001; Garde et al., 2006). Novijim studijama je pokazano da neki bakteriocini, koji nemaju delovanje na patogene, u kombinaciji sa drugim efektom, na primer visok pritisak, mogu smanjiti broj patogenih bakterija u siru (Rodriguez et al., 2005). Bilo koja od ovih navedenih primena bakteriocina lakticina LMG, prvo zahteva dalja istraživanja, kako bi se utvrdili najbolji uslovi i način da se primeni ovaj bakteriocin.

### 6.3. Bakteriocin laktolisterin BU1-4

*Listeria monocytogenes* je oportunistički patogen, koji se najčešće može naći u mleku i mlečnim proizvodima. Sposobnost ovog patogenog soja da preživljava u temperaturnom opsegu od 4°C - 45°C, zatim tolerancija na visoke koncentracije soli, i njegova sposobnost da raste na relativno niskim pH vrednostima, njegova kontrola u hrani predstavlja veliki problem (Vignolo et al., 2000). Obećavajući pristup u kontroli *L. monocytogenes*, ili čak eliminaciji ovog patogena, je korišćenje bakteriocina, kao dodatka hrani. U nekoliko studija, pokazano je da bakteriocini širokog spektra delovanja, kao što je nizin, mogu inhibirati rast *L. monocytogenes* u hrani (Ryser, 1999; Rodriguez et al., 2005; Samelis et al., 2003). Neki bakteriocini su čak pokazali sposobnost potpune eliminacije *L. monocytogenes* iz sira u kratkom periodu (Ryser, 1999).

Treći soj, kojem je ispitana bakteriocinska aktivnost, je *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4, koji je pokazao izuzetnu inhibitornu aktivnost na indikator soj *L. lactis* ssp.

*lactis* BGMN1-596. Za razliku od većine okarakterisanih bakteriocina, čija je antimikrobna aktivnost ograničena na laktokoke, bakteriocin soja *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 pokazuje širi spektar antimikrobnog delovanja (inhibira rast laktokoka, nekih sojeva laktobacila), a ono što ga posebno izdvaja je efekat inhibitornog delovanja na *Listeria monocytogenes*. Širok spektar delovanja, uključujući i efekat na *L. monocytogenes*, pokazali su neki lantibiotici, npr. nizin, zatim lakticin 481 iz *L. lactis* TAB24 (Rodriguez et al., 2000), bakteriocini IIa klase pediocin-AcH (Loessner et al., 2003), zatim bakteriocini iz enterokoka, SH01 i enterocin HF (Kim et al., 2015; Arbulu et al., 2015), kao i bakteriocini iz laktobacila sakacin Q i bakteriocin K41 (Rivas et al., 2014; Zaeim et al., 2014).

Ispitivanjem lokacije genetičkog materijala koji kodira bakteriocin, dobijeno je dve grupe derivata sa bakteriocinskom aktivnošću. Pretpostavljeno da soj BGBU1-4 poseduje operone za sintezu najmanje dva bakteriocina, koji se nalaze na različitim plazmidima. Pored soja BGBU1-4, još neki prirodni izolati su pokazali iste osobine, kao što su *L. lactis* subsp. *-lactis* BGMN1-5 i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGSM1-19 (Kojic et al., 2006; Strahinic et al., 2007), dok u nekim slučajevima, kao kod soja *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081, koji smo analizirali u ovom radu, genetički materijal za sintezu dva bakteriocina se nalazi na hromozomu i plazmidu odvojeno.

Bakteriocin laktolisterin BU1-4 zadržava 55% aktivnosti nakon izlaganja na 80°C tokom 10 min, dok je na višim temperaturama gubio aktivnost. Zadržavao je 100% aktivnosti u širokom opsegu pH vrednosti 4-10. Delovanje proteolitičkih enzima rezultiralo je odsustvom aktivnosti laktolisterin BU1-4. Na osnovu ovih biohemijskih karakteristika, može se zaključiti da bakteriocin laktolisterin BU1-4 ispunjava još jedan od uslova koji su neophodni za njegovu primenu kao prirodnog konzervansa u prehrambenoj industriji. Kao što se može videti u prethodna dva poglavlja (6.1 i 6.2), mnogi bakteriocini, kako klase I, tako i klase II, koji su dobijeni iz prirodnih izolata BMK, pokazuju iste ili slične biohemijske karakteristike kao i laktolisterin BU1-4 (Kojic et al., 1999; Gajic et al., 1999; Gajic et al., 2003; Ceotto et al., 2010; Alegria et al., 2010). Međutim, navedeni bakteriocini imaju uzak spektar antimikrobnog delovanja. Znatno manji broj bakteriocina, koji poseduju antilisterijski efekat, pokazuju ovakve ili slične biohemijske karakteristike, a neki od njih, kao što su nizin, bovicin HC5, enterocini CL35 i ST88Ch, lakticin 481, su se pokazali izuzetne rezultate u

kontroli listerije u pilot sistemima proizvodnje sira (Pingitore et al., 2012; Pimentel-Filho et al., 2014, Dal Bello et al., 2012).

U ovom radu, ispitivana je sposobnost bakteriocina laktolisterin BU1-4 u kontroli rasta *L. monocytogenes* u GM17 medijumu i modelu sistemu sistemu sira. Važno je napomenuti da je bakteriocin laktolisterin BU1-4 u kontroli *L. monocytogenes* u bujonu pokazao bakteriostatički efekat, dok je nizin pokazao bakteriocidni efekat. Međutim, u modelu sistemu sira, oba bakteriocina su pokazala bakteriostatički efekat sa malim međusobnim odstupanjima. Drugačiji efekat nizina u kontroli *L. monocytogenes* u model sistemu sira može biti posledica uticaja visokog sadržaja masti (Davies et al., 1999), proteolitičkog efekta, uticaj visoke koncentracije soli (Chollet et al., 2008) i niže temperature inkubacije. Slični rezultati su dobijeni prilikom korišćenja *L. lactis*, producenta nizina u proizvodnji „cottage“ sira (Dal Bello et al., 2012). Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da navedeni efekti sira nisu uticali na bakteriostatički efekat bakteriocina laktolisterin BU1-4. U nekim istraživanjima je pokazano da antilisterijski efekat najviše zavisi od bakteriocina koji se koristi, pa je tako na primer, u slučaju proizvodnje „cottage“ sira sa dodatkom enterocina RM6 dobijen bakteriocidni efekat na *L.monocytogenes* (Huang et al., 2013), dok je lakticin 481 u proizvodnji istog tipa sira pokazao bakteriostatički efekat *L.monocytogenes* (Dal Bello et al., 2012).

S obzirom da rezultati ovog istraživanja pokazuju da bakteriocin laktolisterin BU1-4 ima bakteriostatički efekat na *L.monocytogenes*, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ispitalo da li taj efekat može da se pojača. Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja, u kojima su dobijeni jako dobri rezultati pojačavanja efekta bakteriocinske aktivnosti (Pimentel-Filho et al., 2014; Gadotti et al., 2014; Arques et al., 2005), naredna istraživanja ispitivanja bakteriocina laktolisterin BU1-4 na *L. monocytogenes*, bi mogla biti usmerena na ispitivanje antilisterijskog efekta u kombinaciji sa drugim bakteriocinom, organskom kiselinom ili visokim pritiskom.

## **7. ZAKLJUČCI**

Na osnovu rezultata koji su prikazani u ovom radu, doneti su sledeći zaključci:

1. Na teritoriji Srbije, izolovano je 52 soja, čijom je selekcijom, na osnovu bakteriocinske aktivnosti, odabrano tri soja BGBM50, LMG2081 i BGBU1-4 koji su identifikovani kao *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.
2. Čišćenje plazmida se pokazalo kao pouzdana metoda u utvrđivanju lokacije gena za sintezu bakteriocina kod u soja BGBM50 i dobijen je derivat BGBM50-14 (Bac<sup>-</sup>, Bac<sup>s</sup>), na osnovu čega je zaključeno da se genetičke determinante za sintezu bakteriocina nalaze na plazmidu.
3. PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) analiza, se pokazala kao najpouzdaniji metod u kombinaciji sa čišćenjem plazmida za utvrđivanje lokacije gena i veličine plazmida na kojim se geni nalaze. U soju BGBM50 na osnovu PFGE analize je zaključeno da plazmid na kojem se nalaze sve genetičke determinante za sintezu laktokokcina G veličine 145,5 kb.
4. Korišćenjem većih broja specifičnih prajmera koji mapiraju u genima koji kodiraju poznate bakteriocine, mogli su se na brz način eliminisati svi sojevi koji sintetišu već opisane bakteriocine i tako je zaključeno da soj BGBM50 sintetiše bakteriocin laktokokcin G.
5. Bakteriocin laktokokcin G je termostabilan, sa maksimalnom aktivnošću u temperaturnom opsegu od 40°C-80°C, dok na temperaturi od 100°C, nakon 60 min inkubacije, gubi aktivnost. Pokazuje aktivnost u opsegu pH vrednosti od 1-12, pri čemu maksimalnu aktivnost pokazuje u opsegu pH vrednosti od 5-7, a 60% aktivnosti zadržava na vrednosti pH 1, odnosno 80% na vrednosti pH 12. Osetljiv je na delovanje proteolitičkih enzima.
6. Analizom sekvence i unakrsnim testovima sa sojem *L. lactis* ssp. *lactis* BGBM50, zaključeno je da soj *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081, pored sinteze laktokokcina G, sintetiše još jedan bakteriocin.



7. Za povezivanje kontiga u ovom radu je primenjena metoda inverznog PCR-a i pokazala se veoma uspešnom za sklapanje selokupnog operona za sintezu nepoznatog bakteriocina u soju LMG2081. Zaključeno je da se operon *lct*LMG sastoji od šest otvorenih okvira čitanja (ORF), nazvani *lmgA*, *lmgM*, *lmgT*, *lmgF*, *lmgE*, *lmgG* i ima najviše sličnosti sa operonima bakteriocina koji pripadaju lantibioticima lakticin-481 grupe.
8. Konstrukcija insercionih mutanata korišćenjem pGhost sistema je pokazala da soj *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081 poseduje dva funkcionalna operona za sintezu laktokocina G (bakteriocin Klase II) i novootkrivenog bakteriocina lakticina LMG, koji pripada Klasi I bakteriocina.
9. Analizom mase, korišćenjem MS/HPLC metode, zaključeno je da masa bakteriocina lakticin LMG2081 iznosi 2759 Da, što je omogućilo precizno mapiranje mesta isecanja i formiranja aktivnog bakteriocina od 25 aminokiselina.
10. Zaključeno je da se operon za sintezu bakteriocina lakticina LMG nalazi na plazmidu od 115 kb, a operon za sintezu bakteriocina laktokocin G na hromozomu.
11. Bakteriocin lakticin LMG je izuzetno termostabilan, pri čemu zadržava 90% aktivnosti temperaturi od 100°C nakon inkubacije od 60 min. Aktivan je u opsegu vrednosti pH 1-12, ali je maksimalnu aktivnost pokazuje u opsegu od vrednosti pH 5-10. Osetljiv na delovanje proteolitičkih enzima i uskog spektra delovanja.
12. Soj *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 sintetiše bakteriocin koji pokazuje širok spektar antimikrobnog delovanja. Pokazuje sposobnost delovanja na laktokoce, laktobacile, kao i na *Listeria monocytogenes*.

13. Čišćenjem plazmida, dobijene su dve grupe derivata BGBU1-4/8 (deluje na laktokoke ali ne deluje na *L. monocytogenes*) i BGBU1-4/29I (Bac<sup>-</sup>, Bac<sup>s</sup>) na osnovu čega je zaključeno je da soj BGBU1-4 sintetise najmanje dva bakteriocina, i da se genetički elementi za sintezu oba bakteriocina nalaze na plazmidima.
14. Bakteriocin laktolisterin BU1-4, je termostabilan bakteriocin, svoju aktivnost pokazuje u opsegu od 40°C-80°C, pri čemu na temperaturi od 80°C nakon inkubacije od 30 i 60 min gubi aktivnost. Zadržava 100% aktivnosti u opsegu vrednosti pH 4-10, pri čemu pri vrednosti pH 12 zadržava čak 90% aktivnosti, a pri vrednosti pH 1 zadržava 70% aktivnosti. Osetljiv je na delovanje proteolitičkih enzima.
15. Analizom aktivnosti bakteriocina laktolisterin BU-4 u GM17 bujonu, zaključeno je da pokazuje bakteriostatički efekat na *L. monocytogenes* ATCC19111, čiji se broj ćelija održao na nivou od 5 log cfu/mL tokom 48 h. Poređenjem sa kontrolnom varijantom (bez dodatog bakteriocina), utvrđeno je da bakteriocin laktolisterin BU1-4 kontroliše rast *L. monocytogenes* ATCC19111 snižavajući broj ćelija za 3,7 log cfu/mL.
16. Analizom aktivnosti bakteriocina laktolisterin BU1-4 model sistemu sira, zaključeno je da pokazuje bakteriostatički efekat na *L. monocytogenes* ATCC19111 pri temperaturnim režimima procesa proizvodnje i skladištenja. Broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 se održao na istom nivou od 5 log cfu/mL tokom celog perioda ispitivanja, što je bilo za 3,6 log cfu/mL niže u odnosu na kontrolnu varijantu, bez dodatka bakteriocina.

## **8. LITERATURA**

- Aso, Z., Okufa, K., Nagao, J., Kanemasa, Z., Thi Bich Phuong, N., Koga, H., Shioya, K., Sashihara, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2005): A novel type of immunity protein, NukH, for the lantibiotic nukacin ISK-1 produced by *Staphylococcus warneri* ISK-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69: 1403-1410.
- Allerbeger, F., Wagner, M (2009): Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiological Infection* 16:16-23.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Alegría, A., Delgado, S., Roces, C., López, B., Mayo, B. (2010): Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 143:61–66.
- Arques, J.L., Rodruiguez, E., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M. (2005): Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International Dairy Journal* 15: 893-900.
- Asaduzzaman, S.M., Nagao, J., Aso, Y., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2006): Lysine-oriented charges trigger the membrane binding and activity of nukacin ISK-1. *Applied and Environmental Microbiology* 72:6012–6017.
- Asaduzzaman, S.M., Sonomoto, K. (2009): Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107:475–87.
- Aso, Y., Okuda, K., Nagao, J., Kanemasa, Y., Thi Bich Phuong, N., Koga, H., Shioya, K., Sashihara, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2005): A novel type of immunity protein, NukH, for the lantibiotic nukacin ISK-1 produced by *Staphylococcus warneri* ISK-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69:1403–10.
- Appendini, P., Hotchkiss, J.H. (2002): Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3:113–126.
- Axelsson, L. T., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., Lindgren, S. E. (1989): Production of broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2: 131-136.

- Back, J.P., Langford, S.A., Kroll, R.G., (1993): Growth of *Listeria monocytogenes* in Camembert and other soft cheeses at refrigeration temperatures. *Journal of Dairy Research* 60: 421–429.
- Benmechernene, Z., Inmaculada, F-No., Kihal, M., Bohme, K., Calo-Mata, P., Barros-Velazquez, J. (2013): Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Patents on DNA And Gene Sequences* 7: 66-73.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, O., Jaillon, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., Sorokin, A. (2001): The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research* 11: 731-753.
- 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.
- Buyong, N., Kok, J., Luchansky, J.B. (1998): Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4842–4845.
- Cai, Y., Yang, H. Pang, Kitahara, M. (2010): *Lactococcus fujiensis* sp nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 1590-1594.
- Callewaert, R., de Vuyst, L. (1999): Expanded bed adsorption as a unique unit operation for the isolation of bacteriocins from fermentation media. *Bioseparation* 8: 159-168
- Cho, S. L. S. W., Nam, J. H., Yoon, J. S., Sukhoom, A., Kim, W. (2008): *Lactococcus chungangensis* sp. Nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1844-1849.
- Chopin, M., Chopin, A., Bidnenko, E. (2005): Phage abortive infection in lactococci: Variations on a theme. *Current Opinion in Microbiology* 8: 473-479.
- Chatterjee, C., Miller, L.M., Leung, Y.L., Xie, L., Yi, M., Kelleher, N.L., van der Donk, W.A. (2005): Lactacin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production. *Journal of American Chemical Society* 127: 15332-15333.

- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., van der Donk, W.A. (2005): Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Review* 105:633–84.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3577-3584.
- Cintas, L. Casaus, M.P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I., Havarstein, L.S. (1998): Enterocins 150a and 150b, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* 150, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology* 180:1988–94.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P.R. (2005): Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3: 777-788.
- Cuozzo, S. A., Sesma, F., Palacios, J. M., de Ruiz Holgado, A. P., Raya, R. R. (2000): Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705. *FEMS Microbiology Letters* 185: 157-161.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L. (2001): Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.
- Chen, H., Hoover, D.G. (2012): Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3: 82–100.
- Ceotto, H., Holo, H., da Costa, K.F.S., Nascimento, J.S., Salehian, Z., Nes, I.F., Bastos, M.C.F. (2010): Nukacin 3299, a lantibiotic produced by *Staphylococcus simulans* 3299 identical to nukacin ISK-1. *Veterinary Microbiology* 146: 124-131.
- Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., Degraeve, P. (2008): Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control* 19:982–989.
- Daly, C., Fitzgerald, G. F., Davis, R. (1996): Biototechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. In: G. Venema, J.H.J Huits and J.

- Hugenholtz (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Application*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp: 441-514.
- Dal Bello, B., Zeppa, G., Bianchi, D.M., Decastelli, L., Traversa, A., Gallina, S., Coisson, J.D., Locatelli, M., Travaglia, Cocolin, L. (2013): Effect of nisin producing *Lactococcus lactis* starter cultures on the inhibition of two pathogens in ripened cheeses. *International Journal of Dairy Technology* 66: 468-477.
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P.D., Hill, C. (2012): Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology Technological* 153: 58-65.
- Davies, E.A., Milne, C.F., Bevis, H.E., Potter, R.W., Harris, J.M.G., Williams, C., Thomas, L.V., Delves-Broughton, J. (1999): Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. *Journal of Food Protection* 62:1004–1010.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4761-4766.
- de Vuyst, L., Leroy, F. (2007): Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food application. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13: 194-199.
- 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. *Microbiology* 152: 1649-1659.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 104: 2384–2389.
- Dubernet, S., Desmasures, N., Gueguen, M. (2002): A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters* 10: 271-275.

- Dufour, A., Hindré, T., Haras, D., Le Penec, J.P. (2007): The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS of Microbiology Reviews* 31:134–67.
- Earnshaw, R. G. (1992): The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: Wood, B. J. B. (Eds.), *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Applied Science, Lnc., London and New York, pp. 211-232.
- Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P., Balasubramanian, T. (2014): Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pacific Journal of Tropic Biomedicine* 4: 305-311.
- Enan, G., el-Essawy, A.A., Uztendaele, M., Debevere, J. (1996): Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *International Journal of Food Microbiology* 30: 189-215.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I. (1991): *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55: 476-511.
- Faye, T., Holo, H., Langsrud, T., Nes, I., Brede, D. (2011): The unconventional antimicrobial peptides of the classical Propionibacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89:549–54.
- 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. *Journal of Peptide Science* 11:688–96.
- Fricourt, B.V. Barefoot, S.F., Testina, R.F., Hayasaka, S.S. (1994): Detection and activity of plantaricin F an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish. *Journal of Food Protection* 57: 698-702.
- Furtado, D.N., Todorov, S.D., Landgraf, M., Destro, M.T., Franco, B.D. (2015): Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: Application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas-type goat cheese. *Brazilian Journal of Microbiology* 46: 201-206.



- Gadotti, C., Nelson, L., Diez-Gonzales F. (2014): Inhibitory effect of combinations of caprylic acid and nisin on *Listeria monocytogenes* in queso fresco. *Food Microbiology* 39: 1-6.
- 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. *Archive of Biological Science* 51:69-78.
- Gabin-Gauthier, K., Gratadoux, J.J., Richard, J. (1991): Conjugal plasmid transfer between lactococci on solid surface matings and during cheese making. *FEMS Microbiology Letters* 85: 133-140.
- Gálvez, A., Lopez, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N.B. (2008): Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* 28:125–52.
- Galvez, A., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Valdivia, W. (1991): Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic as-48. *Journal of Bacteriology* 173: 886-892.
- Galvin, M, Hill, C, Ross, R.P. (1999): Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Letters in Applied Microbiology* 28: 355–358.
- Garde, S., Avila, M., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M. (2006): Proteolysis of Hispanic cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* INIA 639. *Journal of Dairy Science* 89:840–849.
- Garneau, S., Martin, N. I., Vederas, J. C. (2002): Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577–592.
- Gautam, N., Sharma, N., Ahlawat, O.P. (2014): Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus brevis* UN Isolated from Dhulliachar: a Traditional Food Product of North East India. *Indian Journal of Microbiology* 54: 189-189.
- Golić, N., Cadez, N., Terzic-Vidojevic, A., Suranska, H., Beganovic, J., Lozo, J., Kos, B., Suskovic, J., Raspor, P., Topisirovic, L. (2013): Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses

- from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International Journal of Food Microbiology* 166: 294-300.
- Gong, X., Martin-Visscher, L.A., Nahirney, D., Vederas, J.C., Duszyk, M. (2009): The circular bacteriocin, carnocyclin A, forms anion-selective channels in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788:1797–803.
- Gould, G.W. (1991): Antimicrobial compound. In: Goldberg, I., Williams, R. (Eds.), *Biotechnology and Food Ingredients*. Van Nostrand Reinhold, New York. pp: 461-483.
- Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A., de Valk, H. (2008): Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infectious Diseases* 14:734-740.
- Gratia, A. (1925): Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comptes Rendus Biologies* 93: 1040–1042.
- Hanahan, D. (1983): DNA Cloning. Glover, D.M., (Eds.) IRL Press, Oxford, 1, 109.
- Håvarstein, L. S., Diep, B. D., Nes, I. F. (1995): A Family of bacteriocin ABC transportes carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular Microbiology* 16: 229-240.
- Heng, N. C. K., Tagg, J. R. (2006): What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*. 4: doi:10.1038/nrmicro1273-c1.
- Hill, C. (1983): Bacteriophages and bacteriophage in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review* 12: 87-108.
- Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S. E., Aukrust, T., Blom, H. (1992): Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Journal of General Microbiology* 138: 2715-2720.
- Holo, H., Nes, I.F. (1989): High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Applied and Environmental Microbiol* 55: 3119–23.
- 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.

- Horn, N., Martinez, M.I., Martinez, J.M., Hernandez, P.E., Gasson, M.J., Rodriguez, J.M., Dodd, H.M. (1999): Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4443–4450.
- Huang, E., Zhang, L., Chung, Y.K., Zheng, Z., Yousef, A.E. (2013): Characterization and Application of Enterocin RM6, a Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* BioMed Research International Volume Article ID 206917, 6 pages
- Huttunen, E., Noro, K., Yang, Z. N. (1995): Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *International Dairy Journal* 5: 503-513.
- Jack, R.W., Carne, A., Metzger, J., Stefanović, S., Sahl, H.G., Jung, G., Tagg, J. (1994): Elucidation of the structure of SA-FF22, a lanthionine-containing antibacterial peptide produced by *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *European Journal of Biochemistry* 220:455–62.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. (1994): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews* 59:171-200.
- Jay, J. M. (1982): Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 525-532.
- Jiménez-Díaz, 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. *Applied and Environmental Microbiology* 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. *Journal of Bacteriology* 167: 439-446.
- Jovicic, B., Begovic, J., Lozo, J., Topisirovic, L., Kojic, M. (2009): Dynamic of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151, *Archive of Biological Science* 61 (2009) 159–165.
- Jung, G. (1991): Lantibiotics: a survey. In: Nisin and novel lantibiotics, Jung, G., Sahl H.G. (Eds.), ESCOM Science Publishers, BV Leiden.

- Kanatani, K., Tahara, T., Oshimura, M., Sano, K., Umezawa, C. (1995): Cloning and nucleotid sequencing of the gene for acidocin 8912, a bacteriocin from *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Letters of Applied Microbiology* 21: 384-386.
- 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. Baltimore (MD): Williams & Wilkins, pp: 1063-1065.
- Katic, V. (1995): The survival of *Listeria monocytogenes* in white brined cheese. *Acta Veterinaria* 45: 31-36.
- Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R.T., Mercier, P., Diaper, C.M., Zuber, P., Vederas, J.C. (2003): Structure of subtilosin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *Journal of American Chemical Society* 125: 4726-4727.
- Kilpper-Balz, R., Fischer, G., Schleifer, K. H. (1982): Nucleic acid hybridization of group Nadn group D streptococci. *Cuurent Microbiology* 7: 245-250.
- Kimura, H., Nagano, R., Matsusaki, H., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (1997): A bacteriocin of strain *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from Nukadoko, bed of fermented rice bran. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61: 1049–1051.
- 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. *Journal of Bacteriology* 192: 5906-5913.
- Kjos, M., Oppegard, C., Diep, D. B., Nes, I. F., Veening, J. W., Nissen-Meyer, J., Kristensen, T. (2014): Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis. *Molecular Microbiology* 92: 1177-1187.
- Klaenhammer, T.R. (1988): Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337–49.
- Klaenhammer, T.R. (1993): Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 39-85.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E. (2001): Peptide pheromone – dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptide* 22: 1579-1596.

- 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*. *Proceedings of the National Academy of Science 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. *Molecular Microbiology* 58: 1368-1380.
- Kojic, M., Fira D., Banina, A., Topisirovic, L. (1991): Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1753–1757.
- Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A., Topisirovic, L. (1991): Bacteriocin producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* S50. *Applied and Environmental Microbiology* 57:1835–1837.
- Kojic, M., Strahinic, I., Fira, D., Jovicic, B., Topisirovic, L. (2006): Plasmid content and bacteriocin production by five strains of *Lactococcus lactis* isolated from semi-hard homemade cheese. *Canadian Journal of Microbiology* 52:1110–1120.
- Kojic, M., Strahinic, I., Topisirovic, L. (2005): Proteinase PI and lactococcin A are located on the largest plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50. *Canadian Journal of Microbiology* 51:305–14.
- Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. (2003): Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnol.* 14: 232-237.
- Kubota, H., Tsuji, H., Matsuda, K., Kurakawa, T., Asahara, T., Nojimoto, K. (2010): Detection of human intestinal catalase-negative Dram-positive cocci by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 5440-5451.
- Law, J., Buist, G., Haandrikman, A., Kok, J., Venema, G., Leenhouts, K. (1995): A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *Journal of Bacteriology* 177:7011–8.
- Lay, C.L., Dridi, L., Bergeron, M.G., Ouellette, M., Fliss, I.L. (2016): Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination. *Journal of Medical Microbiology* 65: 169-175.

- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J. (1990): Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews* 87:149-164.
- Loessner, M., Guenther, S., Steffan, S., Scherer, S. (2003): a pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1854-1857.
- Lozo, J. (2008): Molekularna karakterizacija bakteriocina i agregacionih sposobnosti prirodnog izolata *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. Doktorska teza. Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Luders, T., Birkemo, G.A., Fimland, G., Nissen-Mezer, J., Nes, I.F. (2003). Strong synergy between a eucaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1797-1799.
- Macura, D., Townsley, P.M. (1984): Scandinavian ropy milk – Identification and characterization of endogenous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion. *Journal of Dairy Science* 67: 735-744.
- Maguin, E., Prévost, H., Ehrlich, S.D., Gruss, A. (1996): Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 178:931–935.
- Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S.R., Richard, J. (1992): Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter, *Lait* 72: 249–326.
- Majer, F., Schmid, D. G., Altena, K., Bierbaum, G., Kupke, T. (2002): The flavoprotein MrsD catalyzes the oxidative decarboxylation reaction involved in formation of the peptidoglycan biosynthesis inhibitor mersacidin. *Journal of Bacteriology* 184: 1234-1243.
- Makarova, K.S., Koonin, E.V. (2007): Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology* 189: 1199-1208.
- Martinez, B., Fernandez, M., Suarez, J.E., Rodriguez, A. (1999): Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology Society Journal* 145:3155–3161.

- Marugg, J.D., Gonzalez, C.F., Kunka, B.S., Ledebor, A.M., Pucci, M.J., Toonen, M.Y., Walker, S.A., Zoetmulder, L.C. and Vandenberg, P.A. (1992): Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC10. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2360-2367.
- Martinez, J.M., Kok, J., Sanders, J.W., Hernandez, P.E. (2000): Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies, *Applied and Environmental Microbiology* 66 :3543–3549.
- Marx, R., Stein, T., Entian, K.D., Glaser, S.J. (2001): Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by <sup>1</sup>H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Protein Chemistry* 20: 501-506.
- Mataraci, E., Dosler, S. (2012): *In vitro* activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56:6366–6371.
- Maqueda, M., Galvez, A., Bueno, M. M., Sanchez-Barrena, M. J., Gonzalez, C., Albert, A., Rico, M., Valdivia, E. (2004): Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Current Protein and Peptide Science* 5: 399-416.
- Maqueda, M., Sanchez-Hidalgo, M., Fernandez, M., Montalban-Lopez, M., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M. (2008): Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria *FEMS Microbiology Reviews* 32:2–22.
- 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. *Angewandte Chemie International Edition in English* 49: 1151-1154.
- Michaela, S., Reinhard, W., Gerhard, K., Christine, M. E. (2009): Cultivation of anaerobic and facultatively anaerobic bacteria from spacecraft-associated clean rooms. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 3484-3491.

- McAuliffe, O., Hill, C., Ross, R.P. (1999): Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology* 86: 251–256.
- McKay, L. L. (1983): Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 259-274.
- Mills, S., McAuliffe, O. E., Coffey, A., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. (2006): Plasmids of lactococci-genetic accessories of genetic necessities. *FEMS Microbiology Review* 30: 243-273.
- Miocinovic, J., Pudja, P., Radulovic, Z., Pavlovic, V., Miloradovic, Z., Radovanovic, M., Paunovic, D. (2001): Development of low fat UF cheese technology. *Mljekarstvo* 61: 33-44.
- Moraes, P.M., Perin, L.M., Júnior, A.S., Nero, L.A. (2013): Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 44: 109-112.
- Morgan, S.M., O'Connor, P.M., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2005): Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 2606–2611.
- Morgan, F., Bonnin, V., Mallereau, M.P., Perrin, G., (2001): Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology* 64:217–221.
- Moreira, J.L., Mota, R.M., Horta, M.F., Teixeira, S.M.R., Neumann, E., Nicol, J.R., Nunes, A.C. (2005): Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology* 23: 5-15.
- 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 Microbiology Letters* 145: 27-32.
- Motlagh, A.M., Bhunia, A.K., Szostek, F., Hansen, T.R., Johnson, M.C., Raz, B. (1992): Nucleotide and amino acid sequence of pap-gene (pediocin Ach production) in *Pediococcus acidilactici* H. *Letters of Applied Microbiology* 15: 45-48.



- Neve, H., Geis, A., Teuber, M. (1987): Conjugation, a common plasmid transfer mechanism in lactic acid streptococci of dairy starter cultures. *Systematic and Applied Microbiology* 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. *Journal of Bacteriology* 174: 5686-5692.
- Nissen-Meyer, J., Oppegard, C., Rogne, P., Haugen, H. S., Kristiansen, P. E. (2010): Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2: 52-60.
- Nishie, M., Nagao, J., Sonomoto, K. (2012): Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol. Sci.* 17: 1-16.
- Oh, S., Kim, S.H., Worobo, R.W. (2000): Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science* 83: 2747-2752.
- O'Sullivan, D. J., Klaenhammer, T. R. (1993): Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2730-2733.
- O'Sullivan, E., Condon, S. (1997): Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stress in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4210-4215.
- O'Sullivan, L., Morgan, S.M., Ross, R.P., Hill, C. (2002): Elevated enzyme release from lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic lacticin 481, produced by *L. lactis* DPC5552. *Journal of Dairy Science* 85:2130–2140.
- Oumer, A., Gaya, P., Fernández-García, E., Mariaca, R., Garde, S., Medina, M., Nuñez, M. (2001): Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with bacteriocin-producing adjunct starter. *Journal of Dairy Research* 68:117–129.
- 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. Marcel Dekker, Inc., New York p: 139-159.

- Papageorgiou, D.K., Marth, E.H. (1989): Fate of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture, Ripening and Storage of Feta Cheese. *Journal of Food Protection* 52: 82-87.
- Piard, J.C., Muriana, P.M., Desmazeaud, M.J., Klaenhammer, T.R. (1992): Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology* 58:279–284.
- Pimentel-Filho, N.J., Montovani, H.C., Carvalho, A.F., Disa, R.S., Vaneti, M.C.D. (2014): Efficacy of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. *International Journal of Food Science and Technology* 49:416-422.
- Pingitore, E.V., Todorov, S.D., Sesma, F., Gombossy de Melo Franco, B.D. (2012): Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. *Food Microbiology* 32: 38-47.
- 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. *Journal of Food Protection* 59: 370-373.
- Qiao, M., Ye, S., Koponen, O., Ra, R., Usabiaga, M., Immonen, T., Saris, P.E.J. (1996): Regulation of the nisin operons in *Lactococcus lactis* N8. *Journal of Applied Microbiology* 80: 626-634.
- Quadri, L.E.N., Sailer, M., Terebiznik, M.R., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E. (1995): Characterisation of the protein conferring immunity to antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *Journal of Bacteriology* 177: 1144-1151.
- Radulović, Z (2007): Izolacija i selekcija autohtonih bakterija mlečne kiseline i njihova primena u standardizaciji sireva u tipu Sjeničkog. Doktorska teza. Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Rao, D.R., Reddy, J.C. (1984): Effect of lactic fermentation of milk on milk lipids. *Journal of Food Science* 49: 748-750.
- Rea, M.C., Ross, R.P., Cotter, P.D., Hill, C. (2011): Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In: Drider, D., Rebuffat, S. (Eds.), *Prokaryotic*

- antimicrobial peptides from genes to applications. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, pp: 29-53.
- Riley, M. (2009): Bacteriocins, biology, ecology, and evolution. *Encyclopedia of Microbiology*. [http://works.bepress.com/margaret\\_riley/6/](http://works.bepress.com/margaret_riley/6/)
- Riley, M., Chavan, M. (2006): Bacteriocins: ecology and evolution. MA Riley & MA Chavan, (Eds.) Springer.
- Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodríguez, J.M., Nuñez, M., Medina, M. (2005): Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal* 15: 51–57.
- Rodríguez, E., Gonzalis, B., Gaya, P., Nunez, M., Medina, M. (2000): Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 10: 7–15.
- Ryser, E.T. (1999): Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. In: Ryser, E.T., Marth, E.H. (Eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dekker, New York, p. 411–503
- Ryser, E.T., Marth, E.H., Doyle, M.P. (1985): Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of Cottage cheese. *Journal of Food Protection* 48:746–750.
- Saavedra, L., Castellano, P., Sesma, F. (2004): Purification of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Methods in Molecular Biology* 268: 331-336.
- Salama, S., Mustafija-Jeknic, M., Sandine, T., William, E., Giovannoni, J. S. (1995): An ecological study of lactic acid bacteria: Isolation of new strain of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Journal of Dairy Science* 78: 10004-1017.
- Samelis, J., Kakouri, A., Rogga, K., Savvaidis, I., Kontominas, M. (2003): Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4 °C in vacuum packages. *Food Microbiology* 20: 661–669.
- 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 Microbiology Letters 270: 227-236.
- Sanz, B., Selgas, D., Parejo, I., Ordonez, J. A. (1988): Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology 6: 199-205.
- Schlech, W.F. (2000): Foodborne listeriosis. Clinical Infectious Disease 31:770-775.
- Schmid, D. G., Majer, F., Kupke, T., Jung, G. (2002): Electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry to reveal the substrate specificity of the peptidyl-cysteine decarboxylase EpiD. Rapid Communication in Mass Spectrometry 16:1779-1784.
- Shleifer, H.K., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bilz, R., Collins, D. M., Fisher, W. (1985): Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. Systematic and Applied Microbiology 6: 183-195.
- Siezen, R. J., Bayjanov, J., Renckens, B., Wels, M., van Hijum, S. A. F. T., Molenaar, D., van Hyckama, J. E. T. (2010): Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant-associated lactic acid bacterium. Journal of Bacteriology 192: 2649-2650.
- Sit, C.S., Vederas, J.C. (2008): Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. Biochemistry and Cell Biology 86: 116-123.
- Stackenbrandt, E, Teuber, M. (1988): Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. Biochemie 70: 317-324.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R. (1991): Nisin treatment for the inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. Applied of Environmental Microbiology 57: 3613-3615.
- Strahinic, I., Cvetanovic, D., Kojic, M., Fira, D., Tolinacki, M., Topisirovic, L. (2007): Characterization and antimicrobial activity of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGSM1-19. Acta Veterinaria 57: 509-521.
- Tagg, J. R. (1992): Bacteriocins of gram positive bacteria; an opinion regarding their nature, nomenclature and numbers. NATO ASI series. Berlin & New York: Springer.

- Terplan, G., Schoen, R., Springmeyer, W., Degle, I., Becker, H. (1986): Vorkommen, Verhalten und Bedeutung von Listerien in Milch und Milchprodukten. *Archiv Lebensmittelwissenschaften* 37: 131-137.
- Tichaczek, P.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.F. and Hammes, W.P. (1992): Characterization of the bacteriocin curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 460-468.
- Toba, T., Yoshioka, E., Itoh, T. (1991): Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. *Letters of Applied Microbiology* 12: 106-108.
- Turgis, M., Vu, K.D., Millette, M., Dupont, C., Lacroix, M. (2016): Influence of Environmental Factors on Bacteriocin Production by Human Isolates of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 8: 53-59.
- Ueda, K., Oinuma, K., Ikeda, G., Hosono, K., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., Beppu, T. (2002): AmfS, an extracellular peptidic morphogen in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology* 184: 1488-1492.
- Uguen, P., Le Pennec, J.P., Dufour, A. (2000): Lantibiotic biosynthesis: interactions between prelactacin 481 and its putative modification enzyme, LctM. *Journal of Bacteriology* 182:5262–6.
- Uzelac, G., Kojic, M., Lozo, J., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Kristensen, T., Nes I.F., Diep, D.B., Topisirovic, L (2013): Zn-dependant metallopeptidase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, *Journal of Bacteriology* 195:5614-5621.
- Van Belkum, M.J., Hayema, B.J, Jeeninga, R.E., Kok, J., Venema, G. (1991): Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Applied and Environmental Microbiology* 57:492–498.
- Van der Donk, W.A. (2005): The protein modification repertoire. *Nature Chemical Biology* 1: 243.

- Vaughan, E.E., Daly, C., Fitzgerald, G.F. (1992): Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 299-308.
- Vignolo, G., Palacios, J., Farias, E.M., Schilliner, U., Holzapfel, H. (2000): Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Current Microbiology* 41:410–416.
- von Wright, A. (2011): Genus *Lactococcus*. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 4th Ed. (Eds.) Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A., Inc., New York p: 63-76.
- Watson, D. C., Yaguchi, M., Bisailon, J.G., Beaudet, R., Morosoli, R. (1988): The amino acid sequence of a gonococcal growth inhibitor from *Staphylococcus haemolyticus*. *Biochemical Journal* 252:87–93.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., Sahl, H.G. (2001): Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 1772–1779.
- Willey, J.M., van der Donk, W.A. (2007): Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology* 61: 477-501.
- Xie, L., Miller, L.M., Chatterjee, C., Averin, O., Kelleher, N.L., van der Donk, W.A. (2004): Lacticin 481: *in vitro* reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science* 303:679–81.
- Xie, L., van der Donk, W.A. (2004): Post-Translational modifications during lantibiotic biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* 8: 498-507.
- Yoneyama, F., Imura, Y., Ohno, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., Sonomoto, K. (2009): Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 3211-3217.
- Zendo, T., Koga, S., Shigeri, Y., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2006): Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3383-3389.

**aPrilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisani Nemanja Mirković

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije 12/09

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom: KARAKTERIZACIJA I DETERMINACIJA  
BAKTERIOCINA AUTOHTONIH LAKTOKOKA

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 29.02.2016

---

**Prilog 2.**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske  
verzije doktorske disertacije**

Ime i prezime autora Nemanja Mirković

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije 12/09

Studijski program Prehrambena tehnologija

Naslov doktorske disertacije KARAKTERIZACIJA I DETERMINACIJA  
BAKTERIOCINA AUTOHTONIH LAKTOKOKA

Mentor prof. dr Zorica Radulović

Potpisani/a Nemanja Mirković

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

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

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 29.02.2016

---



### **Prilog 3.**

#### **Izjava o korišćenju**

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

KARAKTERIZACIJA I DETERMINACIJA BAKTERIOCINA AUTOHTONIH

LAKTOKOKA

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 29.02.2016

---

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

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

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

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

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

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

## BIOGRAFIJA AUTORA

**Nemanja L. Mirković** je rođen 12.06.1982. godine u Beogradu, Republika Srbija. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Prehrambena tehnologija animalnih proizvoda upisao je 2001. godine, a diplomirao 02.06.2008. godine sa prosečnom ocenom 8.06 (osam nula šest) u toku studija, i ocenom 10 (deset) na diplomskom radu „Mogućnost proizvodnje sira u salamuri od UF mleka sa sniženim sadržajem soli“

Doktorske akademske studije na istom fakultetu upisao je školske 2009/10. godine, smer Prehrambena tehnologija, uža naučna oblast istraživanja Tehnološka mikrobiologija. U zvanje istraživača saradnika prvi put je izabran 25.11.2010. godine odlukom naučnog veća Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a reizabran je 31.10.2013. godine odlukom naučnog veća Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Od 01.01.2013. godine zaposlen je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 01.01.2011. angažovan je na Nacionalnim projektima Ministarstva prosvete nauke i tehnološkog razvoja: „Razvoj novih inkapsulisanih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenti hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti" br. 046010 i „Unapređenje i razvoj higijenskih tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu“ br. 046009. Pored Nacionalnih projekata, angažovan je i na međunarodnim projektima: „FP7-REGPOT-Advancing Research in Agricultural and Food Sciences at Faculty of Agriculture, University of Belgrade, AREA“ i TEMPUS 544072-Tempus-1-2012-RS-Tempus-SHEMES4604 projekat „Building capacity of Serbian Agricultural Education to link with Society – CaSa“. U periodu od 2010-2012. godine bio je angažovan na Bilateralnom projektu sa Republikom Slovenijom, „Efficiency of encapsulation of lactic acid bacteria on their survival and performance in food and gastrointestinal conditions“ BI-SL/10-11-035.

Autor je i koautor deset radova sa ISI liste objavljenih u uglednim inostranim časopisima (dva rada iz doktorske disertacije) i preko 15 saopštenja na domaćim i međunarodnim kongresima.

Dobitnik je FEMS stipendije za mlade naučnike u 2013. godini.

Član je Udruženja mikrobiologa Srbije, Srpskog društva za molekularnu biologiju, Udruženja FEMS i Udruženja Prehrambenih tehnologa Srbije.