

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena M. Lozo

MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA
BAKTERIOCINA I AGREGACIONIH
SPOSOBNOSTI PRIRODNOG IZOLATA
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* BGSJ2-8



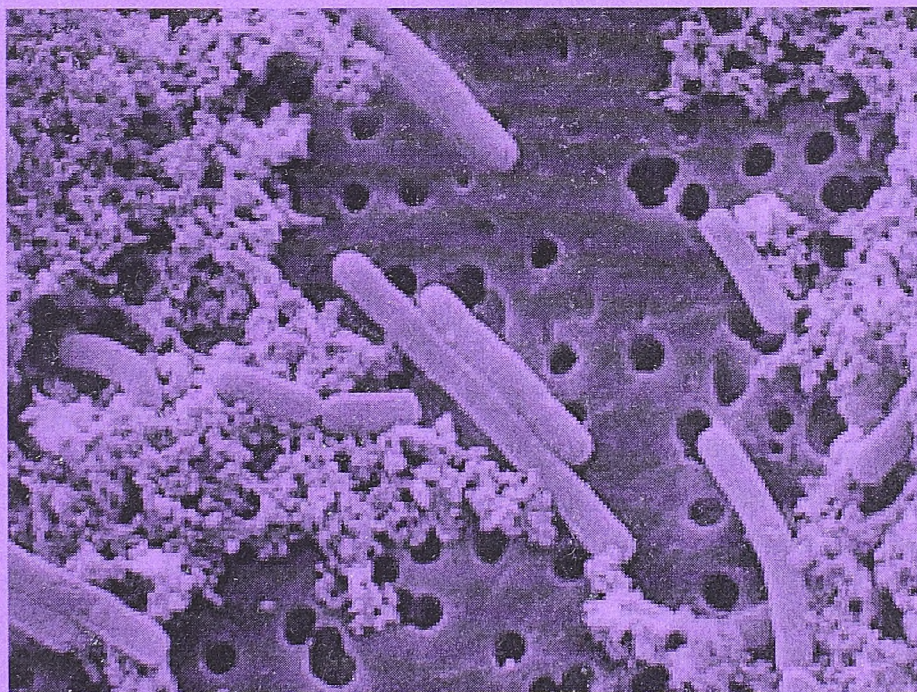
doktorska disertacija

Beograd, 2008.

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena M. Lozo

MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA
BAKTERIOCINA I AGREGACIONIH
SPOSOBNOSTI PRIRODNOG IZOLATA
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* BGSJ2-8



doktorska disertacija

Beograd, 2008.

MENTOR: dr **Ljubiša Topisirović**, redovni profesor
 Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr **Ljubiša Topisirović**, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr **Đorđe Fira**, docent
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

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

dr **Slaviša Stanković**, docent
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Prof. dr Ljubiši Topisiroviću, koji prati moj naučni rad od samog početka, na ukazanom poverenju, savetima i vremenu koje smo proveli diskutujući o dobijenim rezultatima što mi je pomoglo da ovaj rad dovedem do kraja, kao i za sugestije tokom pisanja i kritičku ocenu teze.

Dr Milanu Kojiću na nesebičnoj pomoći, savetima tokom eksperimentalne izrade ovog rada, za sve što me je naučio i izuzetno korisnim sugestijama koje su bile neophodne za finalno oblikovanje teze. Neizmerno sam mu zahvalna i na vremenu i trudu koje je sa mnom uložio u tumačenju dobijenih rezultata i kritičkoj oceni teze.

Dr Đorđu Firi na pomoći, kritičkoj oceni teze i svim e-mail porukama u kojima je brzo, detaljno i duhovito odgovarao na sva moja mnogobrojna pitanja vezana za izolovanje bakteriocina i tako moj rad u Francuskoj učinio mnogo lakšim.

Dr Slaviši Stankoviću na kritičkoj oceni teze.

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

Branko, Jelena, Kalina, Majo, Milice, Amarela, Ivana, Nataša,

sad je prilika da vam se zahvalim za sve divne trenutke ispunjene smehom, zanimljive razgovore, razumevanje i nesebičnu pomoć uz koju je posao u laboratoriji bio pravo uživanje. Sve teško sam lakše pregurala, a svaki uspeh smo zajedno proslavili. Bez vas bi eksperimentalni rad na ovoj tezi bio duži i mnogo teži, a sve što kažem je "mičkica", znate vi....LAB6 NAJBOLJI STE!

Posebno želim da se zahvalim mojoj porodici za podršku, razumevanje i ljubav koji su bili neophodni da se ovaj rad dovede do kraja.

APSTRAKT

Prirodni izolat BGSJ2-8 je izolovan iz sira napravljenog u domaćinstvu. Korišćenjem mikrobioloških i metoda molekularne determinacije ovaj prirodni izolat je determinisan kao *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Soj BGSJ2-8 sintetiše bakteriocin, označen kao BacSJ, proteinazu PI tipa i pokazuje agregacioni fenotip.

Čišćenjem plazmida soja BGSJ2-8 dobijena su dva tipa derivata. Jedan koji ima sposobnost agregacije ali je izgubio sposobnost sinteze i imunost na bakteriocin BacSJ i drugi koji je izgubio obe fenotipske karakteristike. Geni za sintezu, obradu i eksport bakteriocina BacSJ su locirani na plazmidu pSJ2-8. Sekvenciranjem plazmida pSJ2-8 i kompjuterskom analizom dobijene sekvence ustanovljeno je postojanje 15 otvorenih okvira čitanja (ORF). Bakteriocin BacSJ je izolovan korišćenjem katjonske jonoizmenjivačke hromatografije, reverzno-fazne hromatografije i reverzno-fazne hromatografije visokih performansi. Molekulska masa od 5372 Da je određena masenom spektrometrijom. N-terminalna sekvenca, YSYFGGSNGY je iskorišćena za određivanje ORF-a (ORF10) koji kodira strukturni gen za bakteriocin, *bacSJ2-8*. BacSJ čini 50 aminokiselina i tipičan lider peptid dvoglicinskog tipa od 18 aminokiselina. Na pSJ2-8 plazmidu se nalaze i geni za ABC transporter i pomoćni protein što ukazuje da su oni uključeni u obradu i eksport bakteriocina BacSJ. Bakteriocin, BacSJ je termostabilan molekul, aktivan u širokom opsegu pH vrednosti, osetljiv na delovanje proteolitičkih enzima, uskog spektra delovanja ograničenog na blisko srodne vrste. Biohemijska i genetička analiza je pokazala da je BacSJ nov bakteriocin, do sada neopisan u literaturi, koji spada u bakteriocine klase II.

Sposobnost agregacije soja BGSJ2-8 se spontano gubi pri svakoj rekultivaciji soja kada se dobija spontani derivat, označen kao BGSJ2-81 (Agg⁻). U sposobnost agregacije soja BGSJ2-8 je uključen i protein veći od 200 kDa koji verovatno deluje zajedno sa drugim površinskim proteinima, a nije prisutan kod derivata BGSJ2-81. Uporedna analiza soja divljeg tipa i njegovog spontanog derivata koji nema sposobnost agregacije je ukazala da faktor odgovoran za agregaciju utiče i na razliku koja je uočena u bakteriocinskoj i proteolitičkoj aktivnosti. Aktivnost i otpornost bakteriocina BacSJ prema delovanju različitih faktora je bila veća kod soja koji ima sposobnost agregacije. Nasuprot tome, proteolitička aktivnost je bila intenzivnija kod derivata koji nema sposobnost agregacije.

Ključne reči: Bakteriocin, plazmid, sposobnost agregacije, proteolitička aktivnost

ABSTRACT

Natural isolate BGSJ2-8 was isolated from homemade cheese. According to microbiological and molecular methods for the identification, this natural isolate was determined as *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. The strain BGSJ2-8 produces a bacteriocin, designated as BacSJ, proteinase similar to PI-type of lactococcal proteinases and showing the aggregation phenomenon.

After plasmid curing of the strain BGSJ2-8, two types of different derivatives are obtained. One derivative contained the aggregation ability but lost the ability to produce a bacteriocin and it was sensitive to BacSJ and the other who had lost both phenotypical characteristics. Genes that encoded synthesis, maturation and export of the BacSJ are located on the plasmid pSJ2-8. Sequencing and *in silico* analysis of the plasmid pSJ2-8 revealed 15 open reading frames (ORF). BacSJ was purified using cation exchange chromatography, reverse-phase (RP) chromatography and RP-high performance liquid chromatography. Mass spectrometry established molecular mass of the active peptide at 5372 Da. N-terminal sequence, YSYFGGSNGY was used to determine ORF10 as the one that encodes bacteriocin gene, *bacSJ2-8*. BacSJ is a 50-amino-acid peptide with the typical double-glycin leader containing 18 amino acids. Genes that encode ABC transporter and accessory protein are also located on the plasmid pSJ2-8 indicating their roll in bacteriocin maturation and export. Bacteriocin BacSJ is heat stable, active within broad pH range, protease sensitive and exhibits a narrow range of antimicrobial activity to the closely related bacteria. Biochemical and genetic analyses showed that BacSJ is a new bacteriocin that belongs to class II bacteriocin.

An aggregation phenotype of BGSJ2-8 was spontaneously lost during the recultivation Agg⁻ derivative, designated as BGSJ2-81, and was obtained. The aggregation phenotype of wild-type (wt) strain BGSJ2-8 was mediated by secreted protein of molecular mass > 200 kDa, probably acting in cooperation with other cell surface proteins and it is not detected in BGSJ2-81 derivative. Comparative study of wt and its spontaneous non aggregating derivative revealed that aggregation factor was responsible for the observed differences in the bacteriocin and proteinase activities. BacSJ activity and resistance to different stresses were higher in the presence of aggregating factor. In contrary, proteinase activity was stronger in the non aggregating derivative.

Key words: Bacteriocin, plasmid, aggregation phenomenon, proteinase activity

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. BAKTERIJE MLEČNE KISELINE - ROD <i>Lactobacillus</i>	1
1.1. Identifikacija vrsta iz roda <i>Lactobacillus</i>	3
1.2. Evolucija i transfer genetičkog materijala kod bakterija roda <i>Lactobacillus</i>	6
2. ANTIMIKROBNE KOMPONENTE BAKTERIJA MLEČNE KISELINE	7
2.1. Bakteriocini.....	10
2.1.1. Bakteriocini klase I – lantibiotici	11
2.1.2. Bakteriocini klase II	12
2.1.3. Bakteriocini klase III.....	13
3. OPŠTE KARAKTERISTIKE BAKTERIOCINA KLASE II.....	13
3.1. Genetička karakterizacija i regulacija proizvodnje bakteriocina	13
3.2. Bakteriocinski imuni proteini	15
3.3. Obrada i eksport bakteriocina	17
3.3.1. ABC – transporteri i pomoćni proteini.....	17
3.3.2. sec-zavisna translokacija proteina	18
3.4. Način delovanja bakteriocina.....	19
3.5. Izolovanje bakteriocina.....	20
4. NAJNOVIJA OTKRIĆA I BUDUĆE SMERNICE U IZUČAVANJU BAKTERIOCINA KOJE SINTETIŠU BMK.....	22
5. POVRŠINSKE OSOBINE BAKTERIJA RODA <i>Lactobacillus</i>	23
CILJ RADA.....	27
MATERIJAL I METODE	28
1. BAKTERIJSKI SOJEVI	28
2. KORIŠĆENI PLAZMIDI.....	29
3. MEDIJUMI ZA KULTIVISANJE BAKTERIJA	30
4. METODE RADA SA BAKTERIJAMA.....	31
4.1. Izolovanje i determinacija soja	31
4.2. Čišćenje plazmida iz laktobacila	31

4.3. Transformacija laktobacila elektroporacijom.....	31
4.4. Transformacija <i>E. coli</i>	32
4.4.1. Priprema <i>E. coli</i> kompetentnih ćelija	32
4.4.2. Transformacija kompetentnih <i>E. coli</i> ćelija temperaturnim šokom "Heat shock"	32
5. METODE ZA IZOLOVANJE DNK	33
5.1. Metoda za izolovanje ukupne DNK iz laktokoka i laktobacila	33
5.2. Mini metoda za izolovanje velikih plazmida iz laktokoka i laktobacila.....	33
5.3. Mini metoda za izolovanje plazmidne DNK iz <i>E. coli</i>	34
6. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK.....	35
6.1. Sečenje DNK restrikcionim enzimima	35
6.2. Ligacija DNK fragmenata	35
6.3. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metoda ("Polymerase Chain Reaction")..	35
7. ELEKTROFOREZA I ELUCIJA DNK.....	37
7.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu	37
7.2. Elucija DNK fragmenata.....	37
8. METODE RADA SA PROTEINIMA	37
8.1. Testiranje proteolitičke aktivnosti.....	37
8.1.1. Hidroliza kazeina	37
8.1.2. Elektroforeza proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).....	38
8.2. Analiza agregacionog fenotipa kod BMK	38
8.2.1. Merenje uticaja različitih faktora na gubitak sposobnosti agregacije kod BMK.....	38
8.2.2. Analiza uticaja katjona, pH sredine i različitih medijuma za rast na sposobnost agregacije kod BMK	39
8.2.3. Analiza proteina odgovornih za sposobnost agregacije kod BGSJ2-8.....	39
8.3. Metode rada sa bakteriocinima	39
8.3.1. Bakteriocinski test.....	39
8.3.2. Pripremanje bakteriocinskog preparata i određivanje arbitrarnih jedinica (AU)	40
8.3.3. Praćenje biosinteze bakteriocina	41
8.3.4. Testiranje termostabilnosti i pH opsega bakteriocina	41
8.3.5. Efekat delovanja različitih enzima na bakteriocine.....	42
8.3.6. Efekat katjona i redukujućih agenasa na bakteriocinsku aktivnost	42
8.3.7. Uticaj filtracije kroz bakteriološke filtre na aktivnost bakteriocina	43
8.3.8. Određivanje antibakterijskog spektra delovanja bakteriocina.....	43
8.4. Izolovanje bakteriocina.....	43
8.4.1. Katjonska jonoizmenjivačka hromatografija.....	43
8.4.2. Reverzno-fazna hromatografija.....	44
8.4.3. Reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (HPLC).....	44
8.4.4. Tricin SDS – PAGE	45
8.4.5. Masena spektrometrija	46
8.4.6. Određivanje aminokiselinskog sastava bakteriocina.....	46

REZULTATI.....	47
1. IZOLOVANJE, KARAKTERIZACIJA I DETERMINACIJA SOJA	47
2. PROIZVODNJA BAKTERIOCINA	50
2.1 Ekstrahromozomalna lokacija gena za sintezu bakteriocina BacSJ	51
3. BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOCINA	52
3.1. Termostabilnost, pH opseg aktivnosti i inaktivacija bakteriocina BacSJ.....	52
3.2. Uticaj katjona, redukujućih agenasa i filtracije kroz bakteriološke filtre na aktivnost bakteriocina BacSJ	53
3.3. Kinetika sinteze bakteriocina BacSJ	54
3.4. Antimikrobni spektar delovanja bakteriocina BacSJ.....	55
4. IZOLOVANJE BAKTERIOCINA BacSJ	56
5. GENETIČKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOCINA BacSJ.....	62
5.1. Lokacija gena za proizvodnju bakteriocina BacSJ	62
5.2. Proizvodnja bakteriocina BacSJ u različitim domaćinima	62
5.3. Sekvenciranje pSJ2-8 plazmida	63
5.4. Kompjuterska analiza sekvence pSJ2-8 plazmida	63
5.5. Kompjuterska predikcija sekundarne strukture bakteriocina BacSJ	67
6. SPOSOBNOST AGREGACIJE.....	68
7. PROTEOLITIČKA AKTIVNOST.....	69
DISKUSIJA	71
ZAKLJUČCI.....	83
LITERATURA.....	85

UVOD

UVOD

Bakterije mlečne kiseline (BMK) su heterogena grupa Gram-pozitivnih mikroorganizama za koje je zajedničko da proizvode mlečnu kiselinu kao rezultat fermentativnog metabolizma i na taj način zakiseljavaju sredinu u kojoj rastu. To su anerobne ili fakultativno anaerobne bakterije, što im omogućava da naseljavaju veoma različite ekološke niše. 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 članovi ove grupe bakterija su rodovi *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, i *Carnobacterium*.

1. BAKTERIJE MLEČNE KISELINE - ROD *Lactobacillus*

Laktobacili su bili među prvim organizmima koje je čovek koristio u proizvodnji hrane (Konings *et al.*, 2000) ili kao konzervanse za sprečavanje razvoja drugih mikroorganizama u hrani (Adams, 1999). Laktobacili su zahvaljujući svojim osobinama široko rasprostranjeni u prirodi i mogu se izolovati iz različitih prirodnih staništa. Sa površine biljnog materijala izolovani su *Lactobacillus plantarum*, *L. coryniformis*, *L. brevis*, *L. paracasei*, subsp. *paracasei* i *L. fermentum*. Za određeni broja vrsta kao što su *L. acidophils*, *L. salivarius*, *L. johnsonii* i *L. gasseri*, prirodno stanište predstavljaju različiti delovi digestivnog trakta čoveka i drugih sisara, dok su *L. rhamnosus*, *L. fermentum* i *L. salivarius*, zastupljeni u normalnoj mikroflori urogenitalnog trakta. U proizvodima od mesa prisutni su *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. curvatus* kao i *L. divergens*, koji se koriste i kao starter kulture u proizvodnji kobasica. U mleku i mlečnim proizvodima mogu se naći *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. plantarum*, *L. fermentum* i *L. brevis*. Prisustvo *L. helveticus* je karakteristično za mlečne proizvode i koristi se kao starter kultura za dobijanje sireva. Takođe *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *L. kefir*, su vrste koje su izolovane iz odgovarajućih kiselomlečnih proizvoda (jogurt i kefir).

Za neke laktobacile vaginalnog i gastrointestinalnog trakta ljudi pokazano je da imaju važne funkcije kao što je modulacija imunog odgovora, održavanje lokalne mikroflore i sprečavanje razvoja patogenih mikroorganizama. Pozitivan uticaj na zdravlje

ljudi koji ispoljavaju mikroorganizmi svrstava ih u grupu probiotika. Probiotici su živi mikroorganizmi koji kada se unesu u organizam u adekvatnim količinama ispoljavaju pozitivan efekat na zdravlje ljudi (Sanders, 2003). Različite uloge laktobacila podstiču i opravdavaju kako fundamentalna tako i istraživanja koja će dovesti do njihove primene u medicini i industiji.

Rod *Lactobacillus* je najbrojniji od svih rodova koji pripadaju BMK i obuhvata više od 100 do sada opisanih vrsta (Dellaglio *et al.*, 2005). Veoma je heterogen i uključuje vrste sa različitim fenotipskim, biohemijskim i fiziološkim osobinama. Laktobacili su Gram-pozitivne, nesporogene bakterije čije su ćelije u obliku dužih ili kraćih štapića, često povezanih u lance. Katalaza su negativne, mikroaerofilne bakterije i najbolji rast na površini čvrstih hranljivih podloga postižu u uslovima redukovanoeg parcijalnog pritiska kiseonika i pri koncentraciji CO₂ od 5–10%. Imaju fermentativan metabolizam, pri čemu mlečna kiselina predstavlja najmanje polovinu krajnjeg proizvoda fermentacije. Pored mlečne kiseline kao proizvodi fermentacije javljaju se i sirćetna kiselina, etanol, CO₂ ili mravlja kiselina. Bakterije roda *Lactobacillus* rastu na temperaturama od 2°C – 53°C, dok je optimalna temperatura za većinu vrsta od 30°C – 40°C. Optimalne pH vrednosti za rast laktobacila se kreću od 5.5 – 6.2 mada dobro rastu i kada je pH sredine 5 ili manji. Sastav njihove DNK varira od 33 – 55 mol% G+C (Coenye and Vandamme, 2003). U odnosu na sve ostale rodove BMK, laktobacili imaju veoma kompleksne nutritivne zahteve s obzirom da u podlozi za rast, pored ugljenih hidrata i soli zahtevaju i prisustvo brojnih aminokiselina, vitamina, nukleotida i mineralnih materija.

Rod *Lactobacillus* je prvi put definisan 1901. godine, da bi na osnovu novih istraživanja on pretrpeo mnoge promene i podele. Na osnovu povećanog broja novih vrsta svi predstavnici ovog roda su svrstani u tri grupe: a) obligatno homofermentativne, b) fakultativno heterofermentativne i c) obligatno heterofermentativne (Kandler and Weiss, 1986). Opštu podelu koja se zasniva na fiziološkim karakteristikama, DNK–DNK i DNK–RNK hibridizaciji i analizi G+C čine tri grupe: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei/Pediococcus* i *Leuconostoc* grupa (Stiles and Holzappel, 1997). Međutim, na osnovu sekvenciranja gena za 16S rRNK rod *Lactobacillus* je pretrpeo novu reklasifikaciju s obzirom da se dobijeni rezultati nisu slagali sa prethodnim, a uočeno je postojanje velike raznovrsnosti u okviru ovog roda koja je posledicu stalnog otkrivanja novih vrsta. Tako je na primer, tokom 2005 godine otkriveno je 12 novih vrsta laktobacila.

1.1. Identifikacija vrsta iz roda *Lactobacillus*

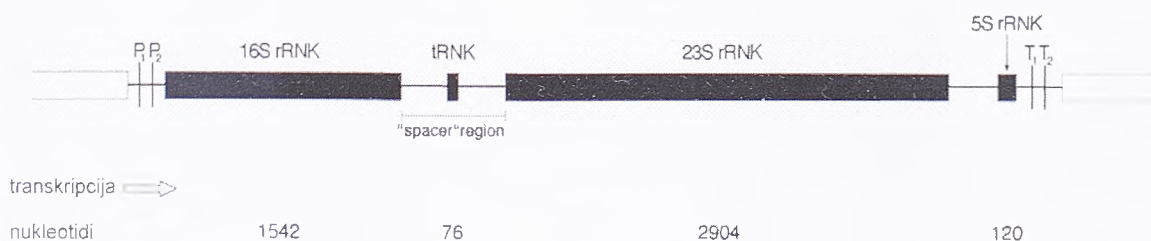
Metode koje se koriste za identifikaciju bakterija mogu se podeliti na klasične mikrobiološke metode i metode molekularne biologije. Klasične mikrobiološke metode obuhvataju analizu rasta bakterija u različitim medijumima, praćenje sposobnosti fermentacije šećera, sposobnost hidrolize arginina, sposobnost rasta na različitim temperaturama, u prisustvu različitih koncentracija soli, i druge. S obzirom da su fenotipske karakteristike između sojeva koji pripadaju istoj grupi veoma slične nije uvek moguće izvršiti njihovu tačnu identifikaciju i svrstati ih u određenu grupu na osnovu njihove morfologije i biohemijskih karakteristika.

Poslednjih godina došlo je do velike ekspanzije u razvoju molekularno bioloških metoda za identifikaciju 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 (Berthier and Ehrlich, 1999), ali i dalje nisu dovoljno diskriminativne za sve vrste iz roda *Lactobacillus*.

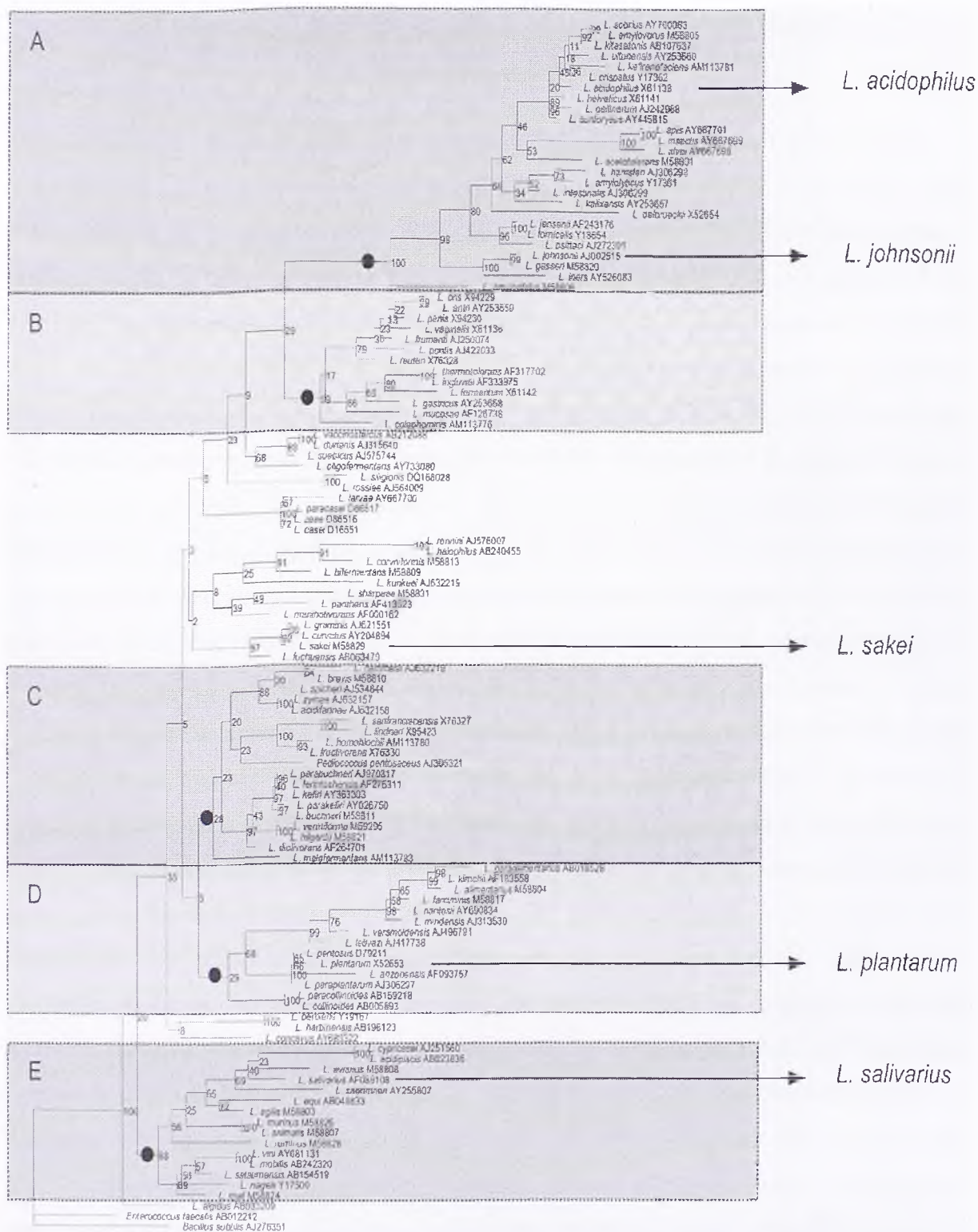
Široka rasprostranjenost repetitivnih sekvenci u bakterijskom genomu dovela je do razvoja metode koja je omogućila još tačniju identifikaciju bakterija do nivoa vrste. To je rep-PCR DNK "fingerprinting" metoda koja se bazira na korišćenju prajmera koji su komplemetarni konzerviranim repetitivnim sekvencama DNK, koje su u bakterijskom genomu prisutne u većem broju kopija (Lupski and Weinstock, 1992). Ova metoda podrazumeva tri grupe repetitivnih sekvenci: "repetitive extragenic palindromic" (REP) sekvence, "enterobacterial repetitive intergenic consensus" (ERIC) sekvence i BOX elemente (Versalovic *et al.*, 1994). Korišćenjem odgovarajućih oligonukleotidnih prajmera u PCR reakciji se umnožavaju invertovani ponovci (REP i ERIC) ili boxA subjedinica (BOX-a), koji nakon elektroforetske analize na agaroznom gelu daju rasporede traka koji su karakteristični za određenu bakterijsku vrstu. Ključna razlika između DNK "fingerprinting" metode i drugih metoda za identifikaciju bakterija koje se zasnivaju na umnožavanju fragmenata PCR metodom je da ova metoda zahteva istovremeno umnožavanje DNK fragmenata različite veličine. Ovaj zahtev je dodatni uslov koji utiče na rezultat reakcije (Versalovic *et al.*, 1991). S obzirom da se oligonukleotidna sekvenca

(GTG)₅, ponavlja veliki broj puta u bakterijskim genomima njeno korišćenje u rep-PCR reakcijama daje karakteristične rasporede traka koji se koriste za identifikaciju bakterija. Ovaj metod se može uspešno koristiti za identifikaciju BMK iz mlečnih fermentisanih proizvoda (Ouadghiri *et al.*, 2005) jer daje najveći broj traka koje su karakteristične za svaku vrstu (Gevers *et al.*, 2001).

Izučavanja 16S rRNK nukleotidnih sekvenci su pokazala postojanje velikog diverziteta i veoma kompleksne filogenije ovog roda BMK. Nukleotidna sekvenca 16S, 23S rRNK i sekvenca regiona između njih "Inter Genetic Spacer" – (IGC) sadrži visoko konzervirane regione koji su karakteristični za predstavnike određenog roda, vrste ili podvrste (Slika 1). Umnožavanjem gena za 16S rRNK pomoću PCR metode, sekvenciranje dobijenog proizvoda i pretraživanje baze podataka još uvek je najčešći način za identifikaciju bakterijskog soja do nivoa vrste (Slika 2). Ova metoda se i dalje smatra najpreciznijom u identifikaciji bakterija, iako i ona ponekad nije potpuno diskriminativna kada su u pitanju srodne vrste laktobacila. Poslednjih godina u porastu je broj potpuno sekvenciranih bakterijskih genoma što je metoda koja omogućava kompletnu taksonomsku i funkcionalnu analizu.



Slika 1 – Šematski prikaz rDNK operona bakterija. Odgovarajući geni koji čine ovaj operon su predstavljeni crno obojenim pravougaonicima. Strelicom je obeležen smer transkripcije. Brojevi na slici predstavljaju dužinu transkripta odgovarajućeg gena. P₁P₂-promotori; T₁T₂-terminatori.



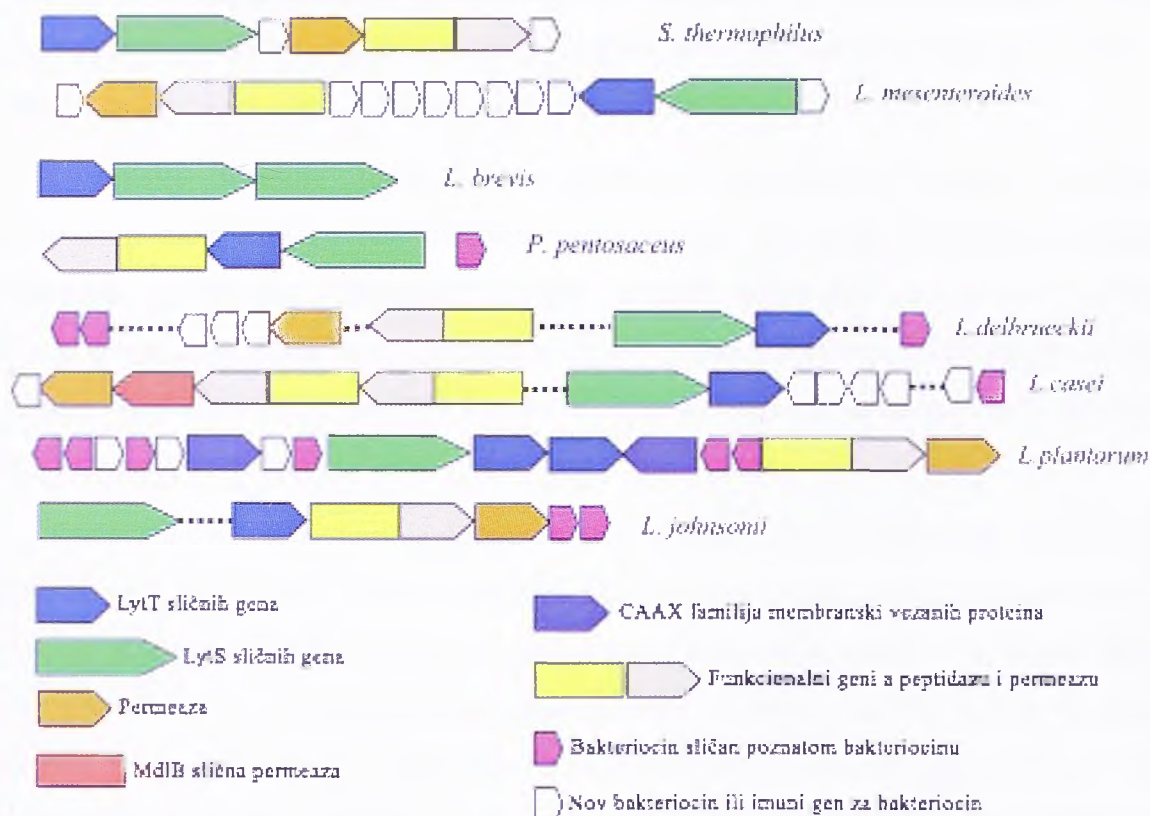
Slika 2 – Klasifikacija bakterija roda *Lactobacillus* na osnovu 16S rRNK analize. Crnim tačkama je označeno mesto grananja za pet glavnih grupa. Iza naziva svake vrste se nalazi broj pod kojim je ta vrsta zavedena u bazi podataka. Strelicama je označena pozicija vrste čiji je genom kompletno sekvenciran (Canchaya *et al.*, 2006).

1.2 Evolucija i transfer genetičkog materijala kod bakterija roda *Lactobacillus*

Izolovanje i karakterizacija novih vrsta laktobacila kao i pojava novih metoda za identifikaciju bakterija dovodi do stalne reklasifikacije vrsta u okviru ovog roda. Usled velike heterogenosti između vrsta koje čine ovaj rod dolazi do čestih taksonomskih promena, tako da neke prethodno identifikovane vrste laktobacila mogu i dalje da budu predmet nove reklasifikacije. S tim u vezi, Canchaya i saradnici (2006) sugerišu formiranje novih grupa u okviru roda *Lactobacillus* kao posledicu izuzetnog stepena diverziteta između predstavnika ove grupe. Jedan od uzroka tih promena je i sekvenciranje celokupnih bakterijskih genoma koje je dovelo do novog pristupa u filogenetskim analizama. Do sada je sekvenciran veliki broj bakterijskih genoma uključujući i rod *Lactobacillus*. Komparativna analiza bakterijskih genoma BMK je pokazala da među njima postoji značajan broj konzerviranih sekvenci. Glavni trend u evoluciji ovih bakterija bio je gubitak predačkih gena i pojednostavljivanje metaboličkih procesa. Gubitak predačkih gena se dogodio u ranoj fazi evolucije i blisko je povezan sa njihovom adaptacijom na novu sredinu u kojoj je smanjena koncentracija kiseonika i koja je bogata hranljivim materijama. Ovaj proces je moguće pratiti kod svih vrsta roda *Lactobacillus* mada *L. gasseri* i *L. johnsonii* prednjače u tome. Kod vrsta sa većim genomima, kao što su *L. plantarum* i *L. casei* gubitak predačkih gena je nadoknađen sticanjem novih gena. Procesu adaptacije na nove uslove sredine je doprinelo i sticanje novih gena duplikacijom ili horizontalnim transferom. Ove promene su se prvenstveno odnosile na gene koji su odgovorni za metabolizam šećera i aminokiselina i enzime i proteine koji učestvuju u transportu različitih materija. Genetičke determinante koje su odgovorne za sintezu različitih antibakterijskih agenasa, kao što su bakteriocini, su takođe posledica niza adaptivnih promena kojima su bakterije bile izložene tokom svoje evolucije. S bzirom da se bakterije iz roda *Lactobacillus* tokom svoje istorije najčešće nalaze u kompleksnim bakterijskim zajednicama to može biti objašnjenje za razvijanje antibakterijskog potencijala kod ovih bakterija. (Makarova *et al.*, 2006; Makarova and Koonin, 2007).

Najveći broj okarakterisanih bakteriocina su peptidi, male molekulske mase, međusobno veoma različiti što otežava njihovu identifikaciju putem konzerviranih aminokiselinskih sekvenci. Uporedna analiza genoma pruža mogućnost da se mnogo brže i efikasnije identifikuju potencijalni geni za sintezu, obradu i eksport bakteriocina odabrane

bakterijske vrste. Na osnovu te analize je konstatovano da geni za proizvodnju bakteriocina spadaju u grupu koja se često prenosi horizontalnim transferom. Na ovo dodatno upućuje analiza filogenetskog rasporeda bakterijskih vrsta i razlike koje postoje u organizaciji bakteriocinskih operona čak i kod srodnih vrsta (Slika 3) (Nes and Johnsborg, 2004; Makarova *et al.*, 2006).



Slika 3 – Predikcija gena za sintezu, obradu i eksport bakteriocina kod različitih vrsta roda *Lactobacillus* (Makarova and Koonin, 2007).

2. ANTIMIKROBNE KOMPONENTE BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

BMK čine osnovu za industrijsku proizvodnju mlečnih fermentisanih proizvoda, mesnih prerađevina, kiselog povrća, kiselog testa, vina, silaže, itd. Njihova metabolička aktivnost tokom procesa fermentacije utiče na kvalitet i trajnost proizvoda. Nagomilavanje organskih kiselina i snižavanje pH sredine kao posledica metabolizma BMK ima ulogu u konzervisanju hrane u čijoj proizvodnji učestvuju. Međutim, posledica njihovog



homofermentativnog, a posebno heterofermentativnog metabolizma je i sinteza drugih jedinjenja osim mlečne kiseline kao što su ugljen dioksid, sirćetna kiselina, mravlja kiselina i/ili etanol (Kleerebezem and Hugenholtz, 2003). Neke BMK imaju sposobnost sinteze jedinjenja male molekulske mase za koje je pokazano da imaju antimikrobnu aktivnost. Osim toga veliki broj BMK sintetiše inhibitorne supstance proteinske prirode koje se nazivaju bakteriocini, čija je antibakterijska aktivnost najčešće usmerena na blisko srodne vrste koje sa njima konkurišu za istu ekološku nišu.

Organske kiseline nastaju kao posledica fermentacije šećera. Korišćenje kompleksnih medijuma za rast bakterija može ciljano uticati na dobijanje drugačijeg fermentacionog balansa i formiranje drugih krajnjih proizvoda, prvenstveno sirćetne kiseline, jer jedinjenja kao što su organske kiseline, aminokiseline i šećeri mogu da utiču na fermentaciju. Takođe i prisustvo kiseonika ima značajan efekat na metabolizam BMK (Kandler and Weiss, 1986).

Snizavanje pH koje nastaje kao posledica sinteze organskih kiselina je primarna inhibitorna aktivnost BMK. Veoma mali broj drugih vrsta bakterija, kako patogenih tako i nepatogenih je sposobno da raste na pH sredine koji nastaje kao posledica aktivnosti BMK. Nizak pH utiče na održavanje membranskog potencijala ćelije, inhibira aktivni transport, smanjuje intracelularni pH i inhibira različite metaboličke funkcije (Ouwehand, 1998). Pokazano je da sirćetna kiselina ima jači inhibitorni efekat od mlečne kiseline, naročito na plesni i kvasce. Ovo može da se objasni time što je na niskom pH mnogo veći procenat sirćetne kiseline u nedisosovanom stanju nego mlečne kiseline.

Ugljen dioksid, (CO₂) nastaje u metabolizmu heterofermentativnih BMK. Inhibira ostale mikroorganizme tako što stvara anerobne uslove zamenom prisutnog kiseonika u sredini. Pored toga, CO₂ sprečava razvoj plesni tako da je veoma značajan u procesima fermentacije silaže i povrća. Mehanizam njegovog antimikrobnog delovanja je do sada nepoznat. Po jednoj teoriji on može dovesti do inhibicije enzimske dekarboksilacije, a po drugoj akumulira se u dvosloju membrane ciljnih ćelija i dovodi do promene njene propustljivosti (Ouwehand, 1998).

Vodonik peroksid, (H₂O₂) kod BMK nastaje u prisustvu kiseonika uz pomoć flavinskih oksidaza, NADH oksidaza ili superoksid dismutaze, pri čemu se kao najvažniji krajnji produkt izdvaja sirćetna kiselina. Njega sintetišu neki laktobacili tokom svog rasta, a akumulacija u medijumu i samim tim moguć antimikrobni efekat se postiže zato što laktobacili nemaju enzim katalazu koja redukuje H₂O₂ (Kandler and Weiss, 1986).

Antimikrobni efekat vodonik peroksida nastaje usled snažnog oksidujućeg efekta na bakterijske ćelije, destrukcije osnovnih molekulskih struktura, ćelijskih proteina i membranskih lipida (Ouwehand, 1998).

Diacetil je poznat po tome što daje karakterističnu aromu buteru, ali je poznat i po svojoj antimikrobnoj aktivnosti. Diacetil može da nastane kao krajnji proizvod u metabolizmu citrata kod pojedinih sojeva iz roda *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*. Najveću inhibitornu aktivnost pokazuje na pH vrednostima manjim od 7, a ta aktivnost se smanjuje u prisustvu glukoze, acetata i Tween-a 80. Diacetil je aktivniji kada deluje na kvasce, plesni i Gram-negativne bakterije nego na Gram-pozitivne bakterije (Ouwehand, 1998).

Neki sojevi vrste *Lactobacillus reuteri* imaju sposobnost sinteze rojterina, antimikrobne supstance male molekulske mase koja ima širok spektar delovanja usmeren na Gram-negativne, i Gram-pozitivne bakterije, kvasce, gljive i protozoe. Rojterin predstavlja smešu hidratisanog monomera i cikličnog dimera 3-hidroksipropionaldehida koji nastaje tokom anaerobnog katabolizma glicerola (Axelsson *et al.*, 1989).

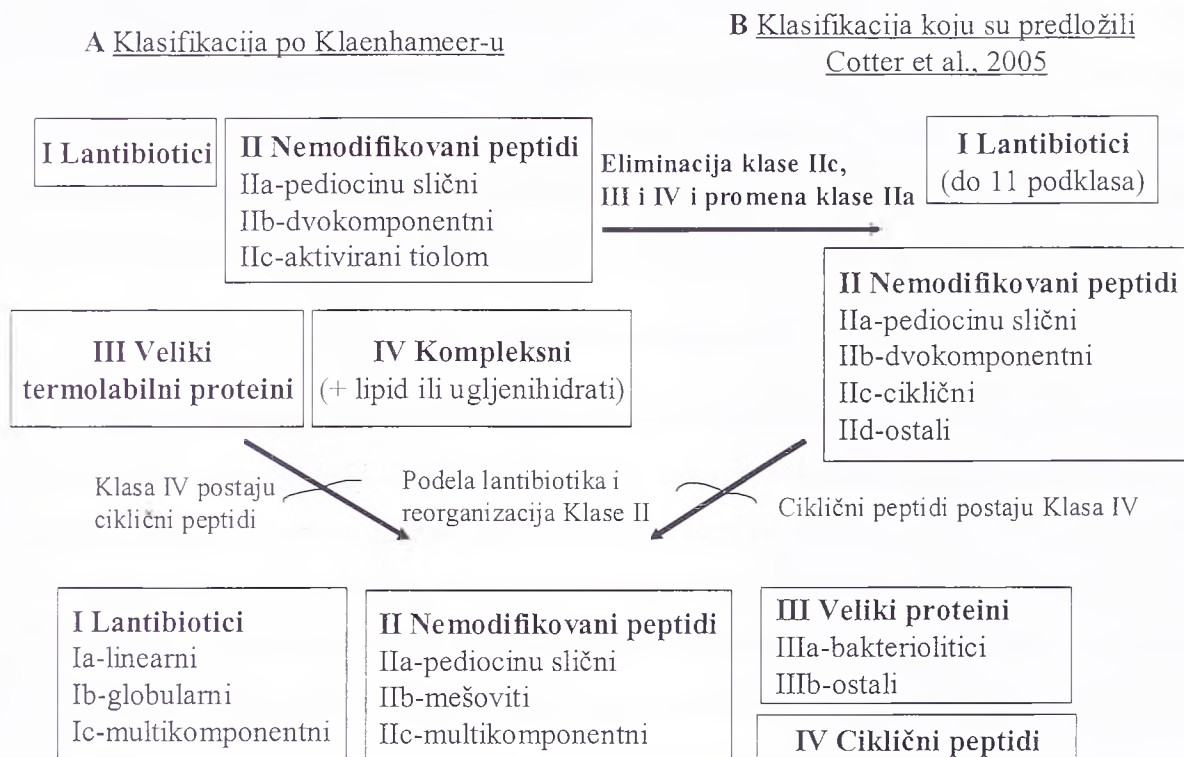
Piroglutamatsku kiselinu ili PCA sintetišu *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* i *Streptococcus bovis*. Pokazano je da ona ima antibakterijsku aktivnost prema sojevima *Bacillus subtilis*, *Enterobacter colacae* i *Pseudomonas putida* (Huttunen *et al.*, 1995).

Nedavno je otkriven i prvi antibiotik, rojterinociklin koji sintetiše *Lactobacillus reuteri* LTH2584 (Ganzle *et al.*, 2000). Rojterinociklin je antimikrobno jedinjenje male molekulske mase, negativno naelektrisana, hidrofobna i strukturno nova tetramerna kiselina. Inhibitorni spektar ovog antibiotika je potvrđen za Gram-pozitivne bakterije uključujući *Lactobacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Listeria innocua*. Zanimljivo je da inhibiciju rasta *Escherichia coli* i *Salmonella* sp. rojterinociklin ispoljava u uslovima kada je oštećena spoljašnja membrana, uključujući skraćeni LPS, nizak pH i visoku koncentraciju soli. S obzirom da je poznato da nizin deluje na Gram-negativne bakterije pod istim uslovima, moguće je da postoji sličnost u načinu delovanja nizina i rojterinociklina.

2.1. Bakteriocini

Prvi otkriveni bakteriocini su bili kolicini koje sintetiše soj *Escherichia coli* V. Supstance ovog tipa su pronađene kod mnogih bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* pa je za njih predloženo zajedničko ime kolicini. Međutim, otkrićem da antimikrobne supstance proteinske prirode sintetišu i druge, a ne samo koliformne bakterije, predloženo je ime "bakteriocin" za specifične antibakterijske proteine, koji su aktivni prema srodnim vrstama. Dalji tok savremenih istraživanja u ovoj oblasti usmeren je na intenzivno proučavanje bakteriocina BMK ne samo iz fundamentalnih razloga nego i zbog njihove moguće primene kako u prehrambenoj industriji tako i za prevenciju i zaštitu od bakterijskih infekcija (de Vuyst and Leroy, 2007).

Bakteriocini koje sintetišu BMK 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). Inhibitorna aktivnost nekada može da bude i širokog spektra, ali je najčešće usmerena ka Gram–pozitivnim vrstama. Rast *Escherichia coli* i drugih Gram–negativnih bakterija je najčešće inhibiran samo ukoliko im je prethodno subletalno oštećena spoljašnja membrana (Stevens *et al.*, 1991). Bakteriocini čine heterogenu grupu peptida i proteina čija se klasifikacija poslednjih godina često preispituje, što je posledica intenzivnih istraživanja u ovoj oblasti koja dovode do stalnog otkivanja novih bakteriocina. Bakteriocini se na osnovu svojih karakteristika mogu klasifikovati u tri klase (Nes *et al.*, 1996; Nissen-Meyer and Nes, 1997). Cotter i saradnici (2005a) predlažu novu klasifikaciju bakteriocina BMK u dve klase dok bi se nekadašnja klasa III odvojila kao posebna klasa koju su nazvali bakteriolizini. 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 baktericine (Slika 4). U daljem tekstu je obrađena klasifikacija bakteriocina (Nissen-Meyer and Nes, 1997) na koju se i dalje poziva najveći broj naučnika, a sa osvrtom na predložene izmene.



Slika 4 – Predložena univerzalna klasifikacija koja bi obuhvatila sve do sada okarakterisane bakteriocine (Heng and Tagg, 2006).

2.1.1. Bakteriocini klase I - lantibiotici

Lantibiotici su mali peptidi (<5 kDa) koji su karakteristični po tome što sadrže neke neuobičajene aminokiseline lantionin, β -metilantionin, dehidroalanin i/ili dehidrobutirin u aktivnoj formi molekula. Ove aminokiseline nastaju posttranslacionom modifikacijom u kojoj dehidratacijom serina nastaje dehidroalanin, a treonina dehidrobutirin i formira se aktivna forma proteina. Ovako dehidratisane aminokiseline učestvuju u formiranju disulfidnih mostova koji su odgovorni za formiranje prstenova i karakteristične tercijerne strukture. Klasa I se može podeliti na dve podklase na osnovu njihove strukture i načina delovanja. Podklasu Ia čine peptidi od 19 do preko 50 aminokiselina (npr. nizin) (Hurst, 1981), fleksibilni molekuli koji imaju pozitivno naelektrisanje i konzervirani deo disulfidnih mostova u svojoj strukturi. Ovi peptidi deluju tako što izazivaju depolarizaciju membrane ciljne ćelije i formiranje pora (Slika 5). Podklasu Ib čine globularni, manji (do 19 aminokiselina), nenaelektrisani, lantibiotici čiji mehanizam delovanja uključuje interakciju sa enzimskim reakcijama u ćeliji, (npr. mersakidin) (Altena *et al.*, 2000). Međutim, pokazano je da nizin svoje inhibitorno dejstvo može da ispolji koristeći oba mehanizma, dok je lakticin 3147 dvokomponentni lantibiotik koji svoje dejstvo ispoljava

sinergističkom aktivnošću oba peptida (Ryan *et al.*, 1999). Kompleksna struktura i stalno otkrivanje novih članova ove klase bakteriocina zahteva stalne izmene u njihovoj klasifikaciji. Po najnovijem predlogu na osnovu sekvence njihovih nemodifikovanih propeptida lantibiotici se mogu klasifikovati u 11 podklasa (Cotter *et al.*, 2005a), dok Heng i Tagg (2006) predlažu podelu na tri podklase (Slika 4).

2.1.2. Bakteriocini klase II

Opšte karakteristike bakteriocina ove klase je da su to mali (<10 kDa), termostabilni, nelantioninski, membranski aktivni bakteriocini. Iako je pokazano da se neki bakteriocini iz klase II sekretuju putem generalnog sekretornog puta (van Wely *et al.*, 2001), za većinu je karakteristično da poseduju lider peptid dvoglicinskog tipa na N-terminalnom kraju bakteriocinskog prekursora (-Gly²-Gly¹). Većina do danas okarakterisanih bakteriocina spada u ovu klasu, koja je na osnovu nekih konzerviranih osobina podeljena u tri podklase.

Podklasu IIa čine pediocinu slični bakteriocini, koji imaju uzak spektar delovanja, ali pokazuju jaku inhibitornu aktivnost prema jednom od najčešćih patogena hrane, *Listeria monocytogenes*. Svi bakteriocini ove podklase se karakterišu po konzerviranoj N-terminalnoj sekvenci YGNGVXCXXXXVXV (gde je X bilo koja aminokiselina) i formiraju jedan ili dva disulfidna mosta u N-terminalnom delu peptida. Sintetišu se sa vezanim lider peptidom koji se uklanja proteolitičkom obradom, obično posle dva glicina. Ovde spadaju Pediocin PA-1/AcH, prvi okarakterisan i najbolje proučen bakteriocin ove podklase koji sintetiše *Pediococcus acidilactici* (Motlagh *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992). Danas je poznato da postoji čitava grupa bakteriocina slična pediocinu kao što su: sakacin A koji sintetiše *Lactobacillus sake* Lb706 (Holck *et al.*, 1992a), leukocin A koji sintetiše *Leuconostoc geliduc* (Hastings *et al.*, 1991), mezentericin Y105 koji sintetiše *Leuconostoc mesenteroides* (Hécharad *et al.*, 1992), i drugi.

Podklasu IIb čine bakteriocini sastavljeni od dva različita peptida. U većini slučajeva odvojeni peptidi ispoljavaju bakteriocinsku aktivnost, ali je ona mnogo veća kada su prisutna oba peptida. Izuzetak su laktokokcin G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992) i laktocin 705 (Cuozzo *et al.*, 2000) čiji peptidi posebno nemaju antimikrobnu aktivnost. U ovu podklasu spadaju: laktacin F koji sintetiše *Lactobacillus johnsonii* VP11088 (Allison *et al.*, 1994) koji je prethodno klasifikovan kao *Lactobacillus acidophilus* VP11088, plantaricin EF i JK koje sintetiše *Lactobacillus plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1996), plantaricin S koje sintetiše soj *Lactobacillus plantarum* LPCO10 (Jiménez-Díaz *et al.*, 1995), laktokokcin M/N koji

sintetiše *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4 (van Belkum *et al.*, 1991a), acidocin J1132 koji sintetizira *Lactobacillus acidophilus* JCM1132 (Tahara *et al.*, 1996) i drugi.

Podklasa IIc obuhvata ciklične bakteriocinske peptide kao što su: AS-48 (Mendoza *et al.*, 1998), gasericin A (Kawaii *et al.*, 1998) i cirkularin A (Kawai *et al.*, 2004). Međutim, najnoviji predlog je da se ovi bakteriocini zbog svojih specifičnih karakteristika izdvoje u novu klasu, klasa IV (Slika 4).

Svi ostali bakteriocini klase II koji nemaju konzervirane sekvence ili specifične karakteristike koje bi ih svrstale u neku drugu podklasu spadaju u podklasu II d.

2.1.3. Bakteriocini klase III

Bakteriocini klase III su definisani kao veliki (>30 kDa), termolabilni proteini. Njihov mehanizam delovanja je različit u odnosu na druge bakteriocine s obzirom da oni svoje inhibitorno dejstvo ispoljavaju tako što izazivaju lizu senzitivne ćelije (Slika 5). Međutim, ima izuzetaka tako da neki bakteriocini, kao što je helveticin J ne deluju na navedeni način. To je još jedan razlog zašto se predlaže podela klase III na dve podklase, IIIa bakteriolitici i IIIb bakteriocini koji ne izazivaju lizu ćelije kao način svog delovanja (Slika 4). Za razliku od "pravih" bakteriocina bakteriocini klase III nemaju uvek imuni protein, nego se njihova imunost zasniva na modifikaciji ćelijskog zida bakterijske ćelije koja sintetizira bakteriocin. Klasu III bakteriocina čine: helveticin J koji sintetizira *Lactobacillus helveticus* 481 (Joerger and Klaenhammer, 1986), helveticin V-1829 (Vaughan *et al.*, 1992), acidofilucin A (Toba *et al.*, 1991).

3. OPŠTE KARAKTERISTIKE BAKTERIOCINA KLASE II

3.1. Genetička karakterizacija i regulacija proizvodnje bakteriocina

Relativno široko rasprostranjena osobina BMK da sintetizira bakteriocine je u velikoj meri posledica lokacije relevantnih gena na mobilnim genetičkim elementima kao što su plazmidi ili transpozoni. Komparativne analize sekvenci genoma laktobacila su pokazale da su tokom evolucije geni za sintezu bakteriocina često razmenjivani horizontalnim transferom između srodnih ili manje srodnih vrsta što je doprinelo njihovoj rasprostranjenosti (videti poglavlje 1, odeljak 1.2). Geni za sintezu bakteriocina se mogu naći i na hromozomalnoj DNK. Sinteza i eksport bakteriocina klase II uključuje veći broj

gena organizovanih u više različitih operona. U sastav *bac* operona ulaze jedan ili dva strukturna gena za sintezu bakteriocina, specifični gen za imunost, geni za sintezu ABC-transportera, pomoćnog proteina (osim za bakteriocine podklase IIc) i regulatorni geni. Gen za imunost je najčešće lociran uz gen za proizvodnju bakteriocina. Kod nizina (Ra *et al.*, 1999) i mikrocina B17 (Garrido *et al.*, 1988) ovu funkciju obavlja ABC transporter.

Geni za proizvodnju bakteriocina i imunost locirani na plazmidu su nađeni za laktokokcin A, B i M/N (van Belkum *et al.*, 1989; van Belkum *et al.*, 1991a; van Belkum *et al.*, 1992; Kojic *et al.*, 2006), karnobakteriocin B2 (Quadri *et al.*, 1995), acidocin 8912 (Kanatani *et al.*, 1995), acidocin B (Leer *et al.*, 1995), Bac501, LsbA i LsbB (Gajic *et al.*, 1999; Gajic *et al.*, 2003) i druge. Iz različitih sojeva laktobacila su izolovani i okarakterisani bakteriocini čije su genetičke determinante locirane na bakterijskom hromozomu. To su helveticin J (Joerger and Klaenhammer, 1986), plantaricin EF i JK (Diep *et al.*, 1996), plantaricin S (Jiménez-Díaz *et al.*, 1995), karnobakteriocin BM1 (Quadri *et al.*, 1995), gasericin A (Kawai *et al.*, 1998) i drugi.

Najveći broj bakteriocina klase II se sintetiše u obliku prepeptida koji na N terminalnom kraju ima lider peptid. Karakteristika lider peptida koji se javlja kod većine bakteriocina klase II i nekih lantibiotika su dva glicina na poziciji -1 i -2 (-Gly⁻²-Gly⁻¹) za koje je pokazano da su potpuno konzervirani dok dužina varira od 14 do 30 aminokiselina. Uloga lider peptida je da omogući da bakteriocin ostane u neaktivnoj formi unutar bakterijske ćelije koja ga sintetiše. Osim toga on olakšava interakciju prepeptida i transportera. Isecanje lider peptida se vrši tokom eksporta bakteriocina pomoću komponenti bakteriocin-transportnog ABC sistema ili u ređim slučajevima pomoću generalnog sekretornog puta. Do sada je okarakterisano i nekoliko bakteriocina klase II koji se sintetišu bez N-terminalnog lider peptida ili signalne sekvence i čiji se eksport vrši korišćenjem drugih mehanizama. Takvi su dvokomponentni bakteriocin L50 i enterocin Q koje sintetiše *Enterococcus faecium* L50 (Cinitas *et al.*, 1998; Cinitas *et al.*, 2000), aurocin A70 koji sintetiše *Staphylococcus aureus* A70 (Netz *et al.*, 2001) i LsbB koji sintetiše *Lactococcus lactis* BGMN1-5 (Gajic *et al.*, 2003).

Između različitih bakteriocina postoji homologija na aminokiselinskom nivou ne samo u okviru zrelog peptida nego i u okviru lider sekvence i u okviru proteina odgovornih za obradu i eksport bakteriocina. Postojanje ovakve homologije je doprinelo da se do danas razvije niz različitih sistema za heterologu ekspresiju bakteriocina BMK, koji koriste ili ABC-transportere ili generalni *sec*-zavisni transport. Na ovaj način je moguće prevazići

probleme koji se sreću pri proizvodnji bakteriocina BMK u toku procesa proizvodnje hrane, kao što je slab stepen adaptacije, niska proizvodnja ili genetička nestabilnost (Rodríguez *et al.*, 2002).

"Quorum sensing", je naziv za regulatorni mehanizam koji je široko rasprostranjen u bakterijskom svetu kojim bakterije u međusobnoj komunikaciji detektuju gustinu bakterijske populacije u svom okruženju. Većina ćelija u bakterijskoj populaciji konstantno sintetizuje odgovarajući molekul koji se zove feromon. Njegova koncentracija reflektuje gustinu bakterijske populacije tokom njenog rasta i deobe. Kada feromoni dostignu određenu koncentraciju dolazi do aktiviranja feromon zavisnih regulatornih sistema i inicijacije različitih ćelijskih procesa (Kleerebezem and Quadri, 2001). Proizvodnja nekih bakteriocina je regulisana preko "Quorum sensing" mehanizma koji čini dvokomponentni regulatorni sistem: i) transmembranska histidin kinaza (HPK) (receptor koji prepoznaje feromon) i ii) citoplazmatski regulatorni protein "Response Regulator" (RR). Feromon (indukcioni peptid) se ribozamalno sintetizuje kao prepeptid, koji se zatim posttranslaciono obrađuje i sekretuje pomoću ABC transportnog sistema. Kada dostigne određenu koncentraciju on dovodi do aktiviranja transmembranskog proteina HRK što pokreće ceo proces. Ova reakcija aktivira reakciju autofosforilacije HPK, a zatim se fosfatna grupa prenosi na RR protein. Fosforilisani RR protein deluje kao transkripcioni aktivator strukturalnog gena za bakteriocin čime otpočinje njegova sinteza. Mehanizam kojim indukcioni peptid aktivira histidin kinazu nije poznat, ali je pokazano da indukcioni peptid koji aktivira sintezu plantaricina A interaguje sa ćelijskom membranom na stereospecifičan način, najverovatnije sa histidin kinazom, što je neophodno da se izazove njen odgovor (Nissen-Meyer *et al.*, 1993). Osim kod plantaricina A ovakav tip regulacije sinteze bakteriocina opisan je kod karnobakteriocina (Quadri *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1995), enterocina A (Aymerich *et al.*, 1996), sakacina A (Diep *et al.*, 2000) i sakacin 674/sakacin P (Holck *et al.*, 1994; Tichaczek *et al.*, 1994).

3.2. Bakteriocinski imuni proteini

Bakterije koje sintetizuju bakteriocine poseduju i gene koji kodiraju takozvane imune proteine koji im obezbeđuju određen sistem samozaštite na delovanje tih bakteriocina. Do sada su okarakterisana dva glavna mehanizma koji ovim bakterijama obezbeđuju imunost. Prvi mehanizam čini imuni protein koji je transmembranski lociran i dovoljan je da obezbedi imunost na sopstveni bakteriocin (Nes and Holo, 2000). Drugi mehanizam je

kompleksniji i obuhvata ABC transportni sistem i transmembranski lociran imuni protein da bi se obezbedila potpuna zaštita ćelije proizvođača bakteriocina (McAuliffe *et al.*, 2001). Za bakteriocine klase I, lantibiotike, je karakteristično prisustvo jednog ili oba mehanizma zaštite (Stein *et al.*, 2005). Prvi mehanizam zaštite okarakterisan je kod bakteriocina klase II osim u slučaju klase IIc gde je prisutan drugi mehanizma koji obezbeđuje imunost na sopstveni bakteriocin.

Geni koji kodiraju imune proteine se kod većine bakteriocina klase II nalaze nizvodno, neposredno uz ili u istom operonu kao i strukturni gen za bakteriocin (Nes *et al.*, 1996). Kod enterocina B (Franz *et al.*, 1999) gen koji kodira protein za imunost se nalazi nizvodno od stukturnog gena za bakteriocin postavljen divergentno, dok je u slučaju bakteriocina karnobakteriocina A takođe postavljen divergentno, ali blizu stukturnog gena za bakteriocin (Franz *et al.*, 2000). Kod bakteriocina podklase IIb sintetiše se samo jedan imuni protein (Diep *et al.*, 1996) dok kod sojeva koji sintetišu više bakteriocina sintetišu imuni proteini za svaki od njih (Quadri *et al.*, 1997). Imuni proteini se sintetišu istovremeno sa bakteriocinom, ali se posttranslaciono ne modifikuju po čemu se razlikuju od bakteriocina za čije je formiranje aktivne forme neophodan sistem za obradu i eksport. Imuni proteini su obično mali proteini od 50-150 aminokiselina i imaju nizak stepen međusobne homologije. Bez obzira na nizak stepen homologije mehanizam koji obezbeđuje njihovo funkcionisanje je najverovatnije sličan. Iako je pokazano da postoji određen stepen unakrsne imunosti između različitih bakteriocina, za imune proteine je karakterističan visok stepen specifičnosti za određen bakteriocin (Stein *et al.*, 2005). Ovo pravilo ima izuzetke, u slučaju karnobakteriocin A za čiji je imuni protein pokazano da može da se zameni sa imunim proteinom enterocina B i u oba slučaja heterologi imuni proteini i dalje vrše svoju funkciju (Franz *et al.*, 2000).

Najbolje proučeni imuni protein bakteriocina klase II je imuni LciA protein za bakteriocin laktokokcin A. LciA protein je izolovan, prečišćen i pokazano je da ne dolazi do njegove posttranslacione obrade, a da se njegova lokacija vezuje za citoplazmatičnu membranu ćelija (Venema *et al.*, 1994). Eksperimenti sa lipozomima i membranskim vezikulama su pokazali da je za njegovo vezivanje za ćelijsku membranu potrebno prisustvo specifičnog receptora (van Belkum *et al.*, 1991b). Na taj način imuni protein štiti ćeliju od bakteriocina koji iako može da se veže za receptor, ne može da se insertuje u membranu i formira pore. Najnovija istraživanja su pokazala da se aktivnost laktokocina A zasniva na njegovoj interakciji sa komponentama manozno-fosfotransferaznog sistema

(man-PTS) senzitivnih ćelija. To su membranski locirane, proteinske komponente IIC i IID koje formiraju kompleks u citoplazmatskoj membrani. Imuni protein, LciA formira kompleks kako sa specifičnim receptorima tako i sa bakteriocinom što sprečava njegovo delovanje na ćeliju koja ga proizvodi. Formiranje kompleksa se dešava samo u prisustvu bakteriocina u ćeliji. Ovaj mehanizam delovanja i imunosti je potvrđen ne samo za laktokocin A nego i za neke druge bakteriocine klase II, laktokocin B, enterocin P, sakacin A, pediocin PA1 i penocin A (Diep *et al.*, 2006). Važnost ovog otkrića se ogleda i u tome što je man-PTS jedinstven za bakterije i nema ga kod eukariotskih ćelija. Zbog toga on može biti potencijalno ciljani sistem za razvijanje novih antimikrobnih jedinjenja. Tome doprinose i podaci koji pokazuju da man-PTS sistem može da služi kao target za nekoliko različitih antimikrobnih jedinjenja čiji se mehanizam delovanja ogleda u permeabilizaciji ćelijske membrane (Diep *et al.*, 2007).

Poseban mehanizam zaštite ćelije proizvođača bakteriocina je uočen kod soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5 gde se imunost na dva bakteriocina LsbA i LsbB ostvaruje preko jednog imunog proteina, LmrB proteina. LmrB protein, specifični ATP vezujući tip "multi drug resistant" (MDR) transporter protein je homolog LmrA proteinu soja *L. lactis* MG1363, prokariotskim ABC transporterima *Bacillus subtilis*, HorA proteinu soja *Lactobacillus brevis* kao i eukariotskom transporteru P-glikoproteinu. Pokazano je da LmrB protein učestvuje i u sekreciji oba bakteriocina, LsbA i LsbB. Prvi put je uočeno da jedan MDR transporter protein učestvuje u sekreciji bakteriocina, a u isto vreme obezbeđuje imunost na te bakteriocine (Gajic *et al.*, 2003).

3.3. Obrada i eksport bakteriocina

3.3.1. ABC – transporteri i pomoćni proteini

Eksport bakteriocina iz ćelije se najčešće vrši pomoću transmembranskog translokatora koji pripada ATP-vezujućoj kaseti (ABC-transporteri) i dodatnog pomoćnog proteina. Bakteriocini koji zavise od ABC-transportera mogu da se podele u dve velike grupe: bakteriocini sa lider peptidom dvoglicinskog tipa i bakteriocini sa drugačijim lider peptidom koji nije *sec*-zavisan. N-terminalno postavljen lider peptid dvoglicinskog tipa je nađen uglavnom među bakteriocinima klase II, ali i kod nekih lantibiotika (Håvarstein *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996). Geni koji kodiraju ABC-transporter su obično deo bakteriocinskog operona ili se nalaze u blizini u okviru posebnog operona. ABC-transporteri sadrže sledeće domene: hidrofobni transmembranski domen i dva

citoplazmatična domena, ATP-vezujući domen na C-terminalnom kraju i proteolitički domen na N-terminalnom kraju (Håvarstein *et al.*, 1995). 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. Obradjeni molekul bakteriocina se transportuje kroz ćelijsku membranu. Pokazano je da je aminokiselina Gly², u dvoglicinskom lider peptidu, u potpunosti konzervirana i da mutacija u tom regionu sprečava sintezu aktivne forme bakteriocina (Håvarstein *et al.*, 1995). ABC-transporteri koji sekretuju lantibiotike sa drugačijim tipom lider peptida nemaju N-terminalnu proteolitičku aktivnost, a uklanjanje lider peptida se vrši pomoću proteaze, serinskog tipa, kao što je NisP u nizinskom operonu (van der Meer *et al.*, 1993).

Nasuprot gore opisanom transportu bakteriocina iz ćelije kod soja *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* BGMN1-5, koji sintetiše tri bakteriocina pokazano je da se transport bakteriocina LsbA i LsbB, koji nema lider peptid, vrši pomoću MDR LmrB, proteina (Gajic *et al.*, 2003).

Za eksport bakteriocina klase II važno je i prisustvo pomoćnog proteina koji olakšava transport bakteriocina kroz membranu i/ili isecanje lider peptida. Međutim njegova tačna uloga još uvek nije utvrđena. Geni koji kodiraju pomoćne proteine su locirani odmah uz gene za ABC transporter. To su hidrofilni proteini koji na N-terminalnom kraju imaju hidrofobni transmembranski domen (van Belkum and Stiles, 1995). Najbolje su proučeni LcnC i LcnD proteini koji su neophodni za transport laktokokcina. LcnC protein pripada Hly-B familiji ATP-vezujućih kaseti, dok je LcnD pomoćni protein koji se sastoji od N-terminalnog transmembranskog dela i C-terminalnog dela koji je lociran ekstracelularno (Franke *et al.*, 1996). Pokazano je da LcnC i LcnD proteini međusobno interaguju u ćelijskoj membrani (Varcamonti *et al.*, 2001) i svrstani su u novu grupu proteina koji učestvuju u eksportu, a koja je nazvana proteini koji su fuzionisani sa membranom.

3.3.2. sec-zavisna translokacija proteina

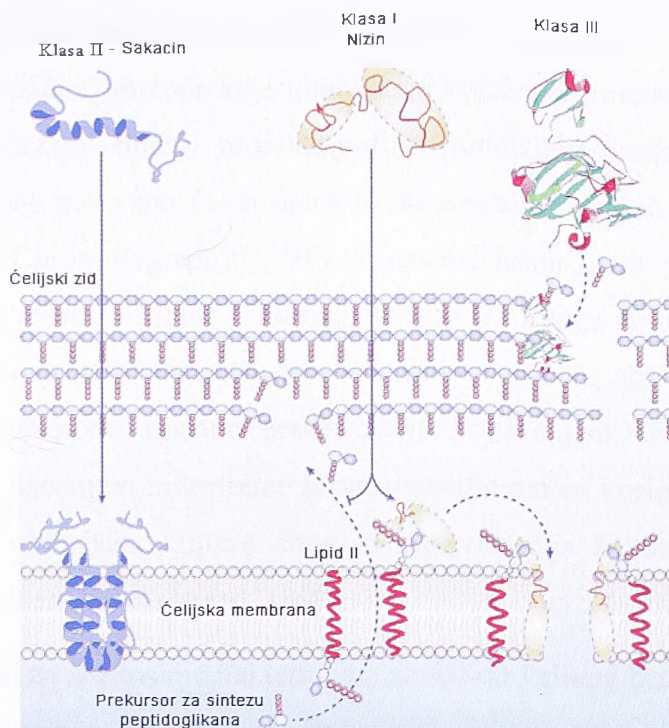
Za razliku od prethodno opisanih, izolovan je i okarakterisan mali broj bakteriocina koji se kroz membranu transportuju generalnim *sec*-zavisnim transportom u kome učestvuje kompleks Sec proteina, a ključnu ulogu ima N-terminalna signalna sekvenca. Lider peptid karakterišu 4 domena: polarni, pozitivno naelektrisani domen na N-

terminalnom kraju, niz od 7-10 nepolarnih aminokiselina koji čini hidrofobno jezgro, zatim niz polarnih aminokiselina koji obično počinje sa aminokiselinom koja narušava sekundarnu strukturu i sekvenca koju prepoznaje lider peptidaza. Proteini koji se sekretuju, bivaju usmereni u citoplazmatsku membranu gde ih obrađuje signalna peptidaza za vreme translokacije kroz membranu (van Wely *et al.*, 2001). Ovde spadaju bakteriocini: divergicin A, koga sintetiše *Carnobacterium divergensis* (Worobo *et al.*, 1995), acidocin 8912 koga sintetiše soj *L. acidophilus* 8912 (Kanatani *et al.*, 1995), bakteriocin 31, soja *Enterococcus faecalis* (Tomita *et al.*, 1996), enterocin P, koga proizvodi *Enterococcus faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997), laktokokcin 972 (Martínez *et al.*, 1999), propionicin T1 (Faye *et al.*, 2002), hiracin JM79/bakteriocin T8 (Sánchez *et al.*, 2007; de Kwaadsteniet *et al.*, 2006).

3.4. Način delovanja bakteriocina

Ribozomalno sintetisana, antimikrobna jedinjenja su široko rasprostranjena u prirodi s obzirom da je njihova sinteza pronađena kod životinja, biljaka i bakterija (Nissen-Meyer and Nes, 1997; Broekaert *et al.*, 1995; Zasloff, 2002). Za bakteriocine, antimikrobna jedinjenja bakterija je pokazano da imaju veći antimikrobni potencijal u odnosu na jedinjenja koja sintetišu biljke ili životinje. Razlozi za to su visok afinitet vezivanja za specifične receptore ili određeno mesto na membrani ciljne ćelije i niske koncentracije koje su dovoljne za antimikrobnu aktivnost (piko- ili nanomolarne koncentracije). Mehanizam kojim bakteriocini specifično prepoznaju ciljnu ćeliju, osim kod nizina i još nekoliko njemu sličnih lantibiotika, bakteriocina klase IIa i laktokocina A još uvek nije potpuno objašnjen.

Neki bakteriocini klase II, a posebno lantibiotici, inhibiraju ciljnu ćeliju tako što formiraju pore u membrani, menjaju transmembranski potencijal i/ili pH gradijent, što dovodi do curenja ćelijskog sadržaja. Nizin se vezuje za molekul lipid II, precursor u sintezi ćelijskog zida. Nakon toga nastupa smrt ciljne ćelije kao posledica inhibicije sinteze peptidoglikana usled interakcije sa lipid II molekulom i formiranja pora u citoplazmatskoj membrani. Za razliku od nizina, laktokokcini, najbolje proučeni bakteriocini klase II, zahtevaju prisustvo receptora na ciljnoj ćeliji. Oni deluju preko transmembranske α -heliks strukture koja se integriše u membranu senzitivne ćelije i dovodi do formiranja pora putem "barrel stave" mehanizma (Slika 5). Veličina pora zavisi od broja agregiranih molekula. Male pore omogućavaju izlazak protona i jona, dok su za aminokiseline i druge ćelijske konstituente neophodne pore većeg dijametra (Venema *et al.*, 1994).



Slika 5 – Način delovanja bakteriocina BMK (Cotter *et al.*, 2005a).

Bakteriocini klase II ne podležu posttranslacionim modifikacijama, ali je pokazano da je za formiranje njihove tercijerne strukture neophodno uspostavljanje disulfidinih mostova. Za formiranje pora u membrani je odgovoran C-terminalni deo bakteriocina koji sadrži alifatičnu α -heliks strukturu koja je ključna u ostvarivanju antimikrobne aktivnosti. Za bakteriocine klase IIa je pokazano da deluju preko interakcije sa membranskim komponentama manozno-fosfotransferaznog sistema (man-PTS), IIC I IID, pomoću kojih se pričvrste za membranu ciljne ćelije, a zatim preko svojih alifatičnih C-terminalnih heliksa formiraju pore (Drider *et al.*, 2006).

3.5. Izolovanje bakteriocina

Genetička karakterizacija bakteriocina je u velikoj meri nadmašila proučavanje njihovih biohemijskih karakteristika što je nastalo kao posledica velikih poteškoća na koje su naučnici nailazili tokom pokušaja izolovanja bakteriocina. Bakteriocini su proteini ili mali peptidi, najčešće pozitivno naelektrisani. Oni čine veoma heterogenu grupu jedinjenja sa vrlo različitim osobinama. Te se razlike ogledaju u različitoj rastvorljivosti u sonim ili organskim rastvaračima, veličini, pI i naelektrisanju, rasporedu hidrofobnih površina, afinitetu ka nekim ligandima, itd. Metode za izolovanje proteina, pa i bakteriocina se zasnivaju na jednoj ili više osobina datog proteina i njihov broj je u stalnom porastu. Ipak,

sve metode za izolovanje bakteriocina možemo podeliti u tri grupe (Saavedra *et al.*, 2004). Prvu grupu čine "klasične" metode koje obuhvataju taloženje proteina amonijum-sulfatom koje je praćeno nekim tipom hromatografije (jonoizmenjivačka, gel filtracija ili hidrofobna) i na kraju reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi ("High-Performance Liquid Chromatography"), HPLC (nekada tečna hromatografija pod visokim pritiskom, "High Pressure Liquid Chromatography"). Drugu grupu čini jednostavan protokol u kome nakon taloženja proteina amonijum-sulfatom sledi njegova ekstrakcija hloroformom ili metanolom i dodatno prečišćavanje korišćenjem HPLC-a. Bakteriocini se mogu izolovati i korišćenjem hidrofobne hromatografije nakon korigovanja pH medijuma u kojem je rasla bakterijska kultura čime je koncentracija bakteriocina dovedena do maksimuma (Callewaert and de Vuyst, 1999).

Odabir metoda za izolovanje bakteriocina zavisi od velikog broja faktora, specifičan je za svaki bakteriocin i određuje se empirijski. Proizvodnja bakteriocina i njihova koncentracija u medijumu je relativno niska i kod većine bakterija se ne može indukovati. Zbog toga je neophodno da se za izolovanje bakteriocina pripremi dovoljna količina polaznog materijala. Međutim, BMK se gaje u složenim medijumima za rast kao što su MRS, M17, i drugi koji u sebi već sadrže značajnu koncentraciju peptida. Osim toga i druge komponente iz medijuma mogu značajno da utiču kako na sintezu bakteriocina tako i na njihovo izolovanje (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). Pokazano je da se i pri kontrolisanoj proizvodnji bakteriocina u fermentoru može uočiti uticaj faktora sredine kao što su pH, temperatura, koncentracija natrijum hlorida i drugih na proizvodnju bakteriocina (de Vuyst and Leroy, 2007). Ova pojava se može objasniti činjenicom da proizvodnja bakteriocina zavisi od faze rasta bakterije proizvođača. Zbog svega prethodno navedenog veoma je važno da se pre pristupanja procesu izolovanja bakteriocina ustanove optimalni uslovi za njegovu proizvodnju kao i vremenski trenutak (faza rasta) kada je njegova koncentracija u medijumu za rast najveća.

Poslednjih godina pored fundamentalnih istraživanja kad su BMK u pitanju, veoma su intenzivna istraživanja vezana za njihovu moguću primenu u konzervisanju hrane. BMK su nezamenljive u proizvodnji raznih vrsta hrane i pića gde njihove fermentacione osobine daju jedinstven ukus i hranljivu vrednost tim proizvodima. Upotreba nizina u više od 80 zemalja, kao i upotreba lakticina 3147, kao konzervanasa hrane je dovela do potrebe da se razvijaju brze metode čijom upotrebom će biti moguće da se za kratko vreme izoluje dovoljna količina prečišćenog bakteriocina. Najnoviji podaci pokazuju da se efikasnost

može povećati ako se korak u kome se protein taloži amoniju-sulfatom zameni jonoizmenjivačkom hromatografijom (Uteng *et al.*, 2002). Naime, kada se radi sa velikom zapreminom početnog materijala centrifugiranje i taloženje amoniju-sulfatom je dug i zahtevan proces. Osim toga, usled različitog sastava medijuma u kojima se gaje bakterije dolazi do problema u skupljanju peleta nakon taloženja amonijum-sulfatom koji često ostaje na površini i nakon centrifugiranja što utiče na ukupan prinos istaloženog proteina (Muriana and Klaenhammer, 1991; Guyonnet *et al.*, 2000).

4. NAJNOVIJA OTKRIĆA I BUDUĆE SMERNICE U IZUČAVANJU BAKTERIOCINA KOJE SINTETIŠU BMK

Iako se istraživanja antimikrobnih jedinjenja vrše već više od pedeset godina i dalje je interesovanje za ovu oblast veliko. Tome doprinose nova otkrića koja daju smernice istraživanjima u ovoj oblasti. Značajna prekretnica, bilo je otkriće da bakteriocini nizin i lakticin 3147 ostvaruju svoju antimikrobnu aktivnost vezivanjem za molekul lipid II, prekursor u sintezi peptidoglikana. Ovaj molekul je ujedno i ciljni molekul za delovanje antibiotika vankomicina. Intenzivna upotreba antibiotika u poslednjih nekoliko decenija je dovela do porasta broja rezistentnih bakterija. Poseban problem prave sojevi meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus* (MRSA) i vakomicin rezistentne enterokoke (VRE) koje izazivaju sistemske infekcije u bolnicama (Cotter *et al.*, 2005b). Upravo je objašnjenje za mehanizam delovanja ovih bakteriocina iskorišćeno kao model za dizajniranje novih antibiotika koji će se na taj način vezivati za ciljni molekul i ispoljavati svoju antimikrobnu aktivnost (Sit and Vederas, 2008).

Druga strategija u borbi sa rastućom rezistencijom bakterija na antibiotike jeste pronalaženje zamene za antibiotike koja će efikasnije obavljati antimikrobnu ulogu. Kao moguće rešenje izdvojila se primena bakteriofaga, hidrolitičkih enzima i antimikrobnih peptida (Parisien *et al.*, 2008). Antimikrobni peptidi su heterogena grupa peptida koje sintetišu biljke, bakterije i eukariotski organizmi tako da se odlikuju velikom strukturnom i funkcionalnom raznovršnošću koja ih čini dobrim kandidatima kao alternativa antibioticima. Iako bakteriocini poseduju antibiotske karakteristike oni se ne nazivaju antibioticima, s jedne strane da bi se izbegla konfuzija, a sa druge zato što imaju niz

različitih karakteristika koje ih od njih odvajaju (Cleveland *et al.*, 2001). Za razliku od većine bakteriocina koji su uskog spektra delovanja na blisko srodne vrste i deluju u nanomolarnim koncentracijama, većina antimikrobnih jedinjenja eukariota su širokog spektra delovanja i deluju tek pri mikromolarnim koncentracijama. Postoje prednosti i mane u primeni antimikrobnih peptida kao alternative antibioticima, ali ono što je obećavajući pristup jeste kombinovana primena ova dva tipa antimikrobnih jedinjenja kojom se postiže sinergistički efekat (Lüders *et al.*, 2003).

Činjenica da bakteriocini klase II ne prolaze posttranslacionu obradu čini ih lakšim za manipulaciju, što je najbolje ilustrovano podacima koji govore o uspešno sintetisanim hibridnim bakteriocinima velike efikasnosti (Miller *et al.*, 1998). Njihova ekspresija se najčešće prati u sojevima koji su derivati soja koji sintetiše bakteriocin, homologim domaćinima. Međutim, ima podataka o uspešnoj ekspresiji bakteriocina klase II u heterologim domaćinima, kao što su Gram–negativne bakterije i kvasci (Richard *et al.*, 2004; Schoeman *et al.*, 1999).

Kombinovanje rezultata dobijenih proučavanjem odnosa između strukture i funkcije bakteriocina i njihove ekspresije u homologim ili heterologim domaćinima će dovesti do otvaranja potpuno novih pristupa u izučavanju bakteriocina koji će omogućiti dobijanje derivata sa većim antimikrobnim potencijalom i širim spektrom delovanja.

5. POVRŠINSKE OSOBINE BAKTERIJA RODA *Lactobacillus*

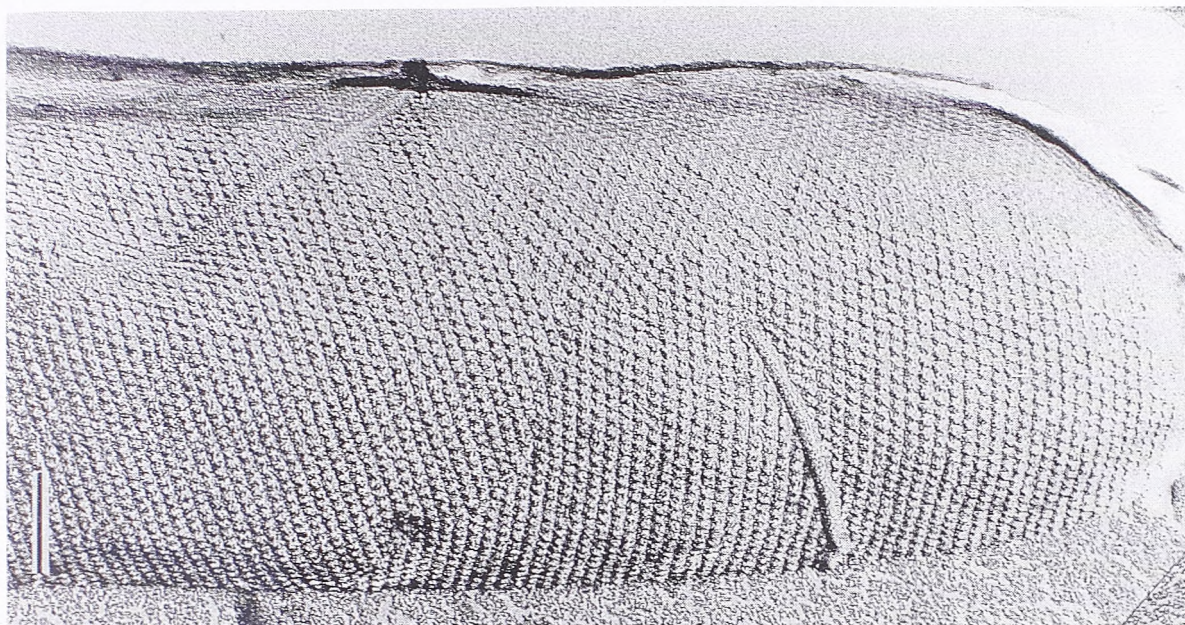
BMK su široko rasprostranjena heterogena grupa mikroorganizama koji naseljavaju različite ekološke niše. Ponašanje BMK u sredini koja ih okružuje, odgovor na uticaj različitih sredinskih faktora i njihova međusobna komunikacija zavisi od procesa koji se odvijaju na njihovoj površini pa samim tim i od fizičko-hemijskih osobina i hemijskog sastava te površine. Na osnovu velikog broja podataka o genetičkim i metaboličkim osobinama BMK otvorene su mogućnosti za njihovu sve veću primenu ne samo u prehrambenoj industriji nego i u druge svrhe. Tome doprinosi i činjenica da su to nepatogene bakterije koje imaju sposobnost da prežive veoma ekstremne uslove koji vladaju u gastrointestinalnom traktu (GIT). S tim u vezu su i istaživanja u kojima se BMK koriste kao živi vektori za prenošenje odgovarajućih biološki aktivnih molekula. Da bi ovaj

sistem mogao da funkcioniše na željeni način potrebno je što bolje okarakterisati komponente koje čine površinski sloj ovih bakterija.

Osnovni gradivni element bakterijskog zida je peptidoglikan. Na površini Gram-pozitivnih bakterija za razliku od Gram-negativnih bakterija ne postoji spoljašnja membrana nego se nalazi debeo sloj peptidoglikana. Osim peptidoglikana u zidu Gram-pozitivnih bakterija nalazi se i teihoična kiselina, lipoteihoična kiselina, teihoureična kiselina i lipoglikani koje su za peptidoglikan vezani fosfodiestarskim vezama (Navarre and Schneewind, 1999), a koji se jednim imenom zovu sekundarni (pomoćni) polimeri ćelijskog zida. Nasuprot originalnoj pretpostavci da peptidoglikan funkcioniše kao glavno vezivno mesto za proteine S-sloja, ekstracelularne enzime i proteine, pokazano je da tu ulogu obavljaju sekundarni polimeri ćelijskog zida (Ries *et al.*, 1997).

Površinske osobine BMK su značajne kako za proces proizvodnje hrane tako i za njihovu adheziju u GIT što je preduslov za ispoljavanje njihovog pozitivnog zdravstvenog uticaja koji se ogleda u smanjivanju broja crevnih patogenih bakterija (Castagliuolo *et al.*, 2005). Uticaj površinskih osobina bakterija na njihove probiotske karakteristike je izučavan kroz sposobnost adhezije ovih ćelija na površinu humanih intestinalnih ćelija (napr. Caco-2 ćelije). Osim toga pokazano je da u adheziji velikog broja laktobacila na enterobakterije takođe učestvuju površinski proteini (Boris *et al.*, 1998).

Do sada su kod laktobacila najviše proučeni spoljašnji površinski proteini tzv. proteini S-sloja ("S-layer" proteins). Ovaj sloj najčešće pokriva ceo ćelijski zid, a čine ga monomerne proteinske jedinice, mase od 40 do 60 kDa koje su nekovalentno vezane za ćelijski zid (Slika 6). N-terminalni region koji je odgovoran za vezivanje proteina S-sloja za ćelijski zid ima visok stepen sličnosti kod različitih organizama. Međutim, homologija C-terminalnih regiona koji su uključeni u proces formiranja pora i konformaciji ovih proteina je izuzetno niska (Sára and Sleytr, 2000). Do sada su ovi proteini okarakterisani u vrstama *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus* i *L. gallinarum* (Vidgren *et al.*, 1992; Boot *et al.*, 1996; Morelli and Callegari, 1997; Delcour *et al.*, 1999). Uloga proteina S-sloja u laktobacila je još uvek u velikoj meri nepoznata, a ono što se zna je da kod nekih vrsta učestvuje u procesu adhezije. S obzirom da pri kultivaciji Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija u laboratorijskim uslovima može doći do gubitka proteina S-sloja, da bi se ustanovila njihova tačna funkcija za svaki organizam ponaosob potrebno je imitirati originalne uslove sredine i faktore koji u njima vladaju.



Slika 6 – Elektronska mikrografija proteina S-sloja heksagonalnog oblika. Veličina vertikalne crte je 100 nm (Sára and Sleytr, 2000).

Sposobnost bakterija da se adsorbuju na različite površine je važna osobina koja im omogućuje da kolonizuju mukozne površine i da se tu zadrže. Pretpostavlja se da u ovom procesu bakterijama pomaže i sposobnost agregacije. Ova fenotipska karakteristika bakterija se može javiti u dva oblika, kao autoagregacija i koagregacija. Autoagregacija predstavlja specifičan rast bakterijskih ćelija istog soja koje se u tečnoj kulturi nalaze raspoređene na dnu epruvete. Za razliku od njih bakterijski soj koji nema sposobnost autoagregacije ima homogeno raspoređene ćelije u tečnoj kulturi. U slučaju koagregacije dolazi do kontakta između različitih bakterijskih vrsta koje se nalaze raspoređene na dnu epruvete u toku rasta u tečnoj kulturi (Roos *et al.*, 1999).

Do sada je opisan veliki broj faktora koji doprinose agregaciji ("aggregation promoting factors") – APF. Njihova veličina i osobine variraju od hidrofилnog peptida od 2 kDa koji sintetiše soj *L. gasseri* (Boris *et al.*, 1997), zatim protein od 32 kDa soja *L. gasseri* 4B2 (Jankovic *et al.*, 2003) koji je prethodno okarakterisan kao *L. plantarum* (Reniero *et al.*, 1992), do površinskog proteina od 56 kDa koji sintetiše soj *L. reuteri* 1063 (Roos *et al.*, 1999). Kod četiri soja vrste *L. johnsonii* i dva soja vrste *L. gasseri* su okarakterisani geni koji kodiraju ekstracelularni APF koji učestvuje u autoagregaciji ovih sojeva. U poređnom analizom aminokiselinskog sastava, fizičko-hemijskih osobina i organizacije gena, *apf1* i *apf2*, koji kodiraju ove proteine je pokazano da postoji određen stepen sličnosti između njih i proteina S-sloja (Ventura *et al.*, 2002). Mutacione i delecione

analize gena koji kodiraju ova dva proteina dovode do interesantnog otkrića s jedne strane da su ovi proteini esencijani za bakterijsku ćeliju, a sa druge da ove promene dovode do drastičnih promena u ćelijskom obliku, ali ne utiču na sposobnost agregacije (Jankovic *et al.*, 2003).

Fenomen autoagregacije, a posebno koagregacije kod laktobacila veoma je važan sa aspekta njihove primene. Soju *L. crispatus* M247 upravo njegova sposobnost agregacije omogućava kolonizaciju GIT *in vivo* odnosno adheziju za epitelijalne ćelije *in vitro* (Cesana *et al.*, 2001). Za površinski protein, Cpf, (19.9 kDa), soja *L. coryniformis* DSM 20001T je pokazano da omogućava autoagregaciju i koagregaciju ovog soja sa *E. coli* K88, *Campylobacter coli* i *Campylobacter jejuni* (Schachtsiek *et al.*, 2004). Osim toga, sposobnost laktobacila da koagregiraju sa patogenim bakterijama u GIT i urogenitalnom traktu *in vitro* i *in vivo* je posebno važna jer ta osobina laktobacila je njihov glavni mehanizam kojim organizam čoveka štite od bakterijske infekcije (Huis in't Veld *et al.*, 1994).

CILJ RADA

CILJ RADA

Istraživanja koja se vrše na BMK poslednjih godina su sve više usmerena ka izučavanju karakteristika prirodnih izolata. Prirodni izolati zahvaljujući specifičnim ekološkim nišama iz kojih su izolovani pokazuju brojne fenotipske karakteristike koje su se kod industrijskih sojeva najverovatnije izgubile. Na ovaj način se otvaraju novi pravci izučavanja BMK koji mogu da doprinesu boljem razumevanju različitih biosintetskih procesa, ali i da se stvore uslovi za bržu primenu nekih saznanja iz ove oblasti. Zbog toga je cilj ovog rada bio:

1. Karakterizacija i determinacija prirodnog izolata *Lactobacillus* sp. BGSJ2-8 korišćenjem klasičnih i molekularnih metoda determinacije do nivoa vrste.
2. Biohemijska karakterizacija bakteriocina, BacSJ koji sintetiše soj *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8.
3. Izolovanje bakteriocina, BacSJ.
4. Određivanje lokacije i kloniranje gena odgovornog za sintezu bakteriocina BacSJ.
5. Karakterizacija sposobnosti agregacije soja *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8.
6. Određivanje i karakterizacija proteolitičke aktivnosti soja *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8.

MATERIJAL I METODE

MATERIJAL I METODE

1. BAKTERIJSKI SOJEVI

Bakterijski sojevi korišćeni u ovom radu predstavljani su u Tabeli 1.

Tabela 1 – Sojevi BMK korišćeni u ovom radu

Bakterijski soj	Genotip ili fenotip	Izvor ili referenca
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>		
BGSJ2-8	BasSJ ⁺ , BacSJ ^{Im} , Prt ⁺ , Agg ⁺	Laboratorijska kolekcija
BGSJ2-81	BasSJ ⁺ , BacSJ ^{Im} , Prt ⁺ , Agg ⁻	Laboratorijska kolekcija
BGSJ2-82	Derivat soja BGSJ2-8 bez plazmida, BasSJ ⁻ , BacSJ ^{Im} , Prt ⁺ , Agg ⁺	Laboratorijska kolekcija
BGSJ2-83	Derivat soja BGSJ2-8 bez plazmida, BasSJ ⁻ , BacSJ ^{Im} , Prt ⁺ , Agg ⁻	Laboratorijska kolekcija
BGSJ2-8B5	Derivat BGSJ2-83 sa plazmidom pB5	ovaj rad
LMG10774	Izolat iz cerebrospinalne tečnosti	BCCM/LMG kolekcija
LMG13552	Izolat iz ementaler sira	BCCM/LMG kolekcija
LMG11459	Izolat iz karijesa	BCCM/LMG kolekcija
B4560	Izolat iz mašine za mleko	NRRL kolekcija
B4564	Izolat iz dečije salive	NRRL kolekcija
<i>Lactobacillus casei</i>		
ATCC393	Izolat iz sira	ATCC kolekcija
ATCC334	Izolat iz sira	ATCC kolekcija
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
ATCC4356	Humani izolat	ATCC kolekcija
V74	Komercijalni soj	Visby
NCDO1748	Humani izolat	NCDO kolekcija
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
IL1403	Derivat soja IL594 bez plazmida, Prt ⁻ , Bac ^{Im}	Chopin <i>et al.</i> , 1984
IL1403/pMB553	Em ⁺ , Derivat soja IL1403 koji nosi plazmid pMB553 sa kloniranim <i>lcnA</i> genom	van Belkum <i>et al.</i> , 1989

IL1403/pMB580	Em ^r , Derivat soja IL1403 koji nosi plazmid pMB580 sa kloniranim <i>lcnB</i> genom	van Belkum <i>et al.</i> , 1992
IL1403/pMB225	Em ^r , Derivat soja IL1403 koji nosi plazmid pMB225 sa kloniranim <i>lcnM/N</i> genom	van Belkum <i>et al.</i> , 1989

Pored navedenih BMK u Tabeli 1 bakterije mlečne kiseline korišćene u ovom radu su: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-5, BGBUK2-8, BGBUK2-16, BGKP20, BGLI4, BGLI15, BGHN14, BGUB9, BGPKM13, BGPV2-40, BGPV2-45a; *Lactobacillus rhamnosus* BGT10; *Lactobacillus plantarum* BGHN40, BGCG31, A112; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29, BGMN1-5, BGMN1-596, NP45; *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NS1, MG1363, MG7284; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50.

Za propagaciju plazmida i konstrukciju plazmidne biblioteke plazmida pSJ2-8 korišćena je *Escherichia coli* DH5 α (*supE44*, Δ *lacU169* (Δ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *andA1*, *gyrA96thi-1*, *relA1*) (Hanahan 1983).

2. KORIŠĆENI PLAZMIDI

Plazmidi korišćeni u ovom radu predstavljeni su u Tabeli 2.

Tabela 2 – Spisak korišćenih i konstruisanih plazmida

Plazmid	Relevantne karakteristike	Izvor ili referenca
pA13	Em ^r , <i>lacZ</i> , derivat plazmida pA1, 4601 bp	Laboratorijska kolekcija
pSJ2-8	14443 bp	Ovaj rad
pB5	Em ^r , BacSJ ⁺ , BacSJ ^{lm} , derivat plazmida pA13 sa kloniranim pSJ2-8 u <i>Bam</i> HI restrikciono mesto, veličine 19044 bp	Ovaj rad

Em^r - rezistencija na eritromicin

3. MEDIJUMI ZA KULTIVISANJE BAKTERIJA

Za kultivisanje laktobacila korišćen je MRS medijum (Merck, GmbH Dermštad, Nemačka) i modifikovani MRS medijum u odnosu na recepturu datu u de Man *et al.*, (1960), sastavljen od: bakto-proteaznog peptona No.3 (10 g/l), mesnog ekstrakta (10 g/l), ekstrakta kvasca (5 g/l), dekstroze (20 g/l), Tween-a 80 (1 g/l), amonijum citrata (2 g/l), Na-acetata (5 g/l), magnezijum sulfata (0.1 g/l), mangan sulfata (0.05 g/l) i natrijum fosfata (2 g/l); pH 6.8. Za rast laktokoka je korišćen GM17 medijum (Merck, GmbH Dermštad, Nemačka) sa 0.5% glukozom. Čvrste podloge za rast bakterija dobijane su dodavanjem (15 g/l) agara. Za dobijanje soft agara dodavano je (7 g/l) agara u medijum. Medijumi su sterilisani u autoklavu 15 min na 121°C osim modifikovanog MRS-a koji je sterilisan 18 min na 118°C. Bakterije su gajene mikroaerofino ili anaerobno korišćen je ANAEROCULT® A (Merck, GmbH Dermštad, Nemačka) na 30°C ili 37°C. Sojevi laktobacila sa vektorom gajeni su u MRS medijumu sa odgovarajućom koncentracijom antibiotika.

Hemijski definisan medijum (CDM) je korišćen za ispitivanje uticaja različitih medijuma za rast na sposobnost agregacije. CDM se sastoji od: glukoza (10 g/l), Na-acetat (6 g/l), NH₄-citrat (1 g/l), K₂HPO₄ (3 g/l), KH₂PO₄ (3 g/l), MgSO₄x7H₂O (0.5 g/l), MnSO₄xH₂O (0.032 g/l), FeSO₄x7H₂O (0.02 g/l), paraaminobenzoeva kiselina (0.2 mg/l), folna kiselina (0.1 mg/l), nikotinska kiselina (1 mg/l), pantoteinska kiselina (1 mg/l), piridoksin (2 mg/l), riboflavin (1 mg/l), biotin (1 mg/l) i tween 80 (1 mg/l).

Za ispitivanje proteolitičke aktivnosti bakterije su gajene na MCA (mlečno-citratni agar) podlozi koja sadrži: obrano mleko u prahu (44 g/l), Na-citrat x 2H₂O (8 g/l), ekstrakt kvasca (1 g/l), glukoza (5 g/l) i agar (17 g/l). Medijum je sterilisan u autoklavu 17 min na 117°C. Temperatura kultivacije bakterija na MCA podlozi bila je 30°C.

Sojevi bakterija mlečne kiseline su čuvani u odgovarajućem medijumu za rast sa 15% glicerola na -80°C.

Za rast *Escherichia coli* korišćen je LB (Luria broth) medijum koji sadrži: tripton (10 g/l), ekstrakt kvasca (5 g/l), NaCl (5 g/l). Čvrsta podloga je dobijena dodavanjem (15 g/l) agara. Medijum je sterilisan u autoklavu 15 min na 121°C. Temperatura za kultivisanje bakterija bila je 37°C uz aeraciju. Sojevi *E. coli* transformisani odgovarajućim vektorom su gajeni u LB medijumu sa dodatim antibiotikom (eritromicinom, 250 µg/ml).

4. METODE RADA SA BAKTERIJAMA

4.1. Izolovanje i determinacija soja

Sojevi bakterija mlečne kiseline su izolovani iz različitih mlečnih proizvoda (tvrdi, polutvrđi i meki sirevi, kiselo mleko, kajmak, kefir) dobijenih u domaćoj radinosti, klasičnom mikrobiološkom izolacijom. U cilju determinacije sojeva urađeni su mikrobiološko-biohemijski testovi po Collins-u i Lyne-u (1976). Sposobnost fermentacije različitih ugljenih hidrata je testirana korišćenjem API 50 CH sistema (Montelieu-Vercieu, France), koji su primenjeni prema upustvu proizvođača. Na osnovu dobijenih rezultata mikrobiološke analize kultura, izolati su determinisane pomoću Bergey-evog priručnika (1986). Dalja determinacija soja BGSJ2-8 je vršena korišćenjem metoda molekularne determinacije (videti Materijal i metode, poglavlje 6).

4.2. Čišćenje plazmida iz laktobacila

Čišćenje plazmida iz sojeva laktobacila je rađeno istovremenim delovanjem povišene temperature (42°C) i subletalne koncentracije antibiotika novobiocina (8 µg/ml). S obzirom da u ovom slučaju čišćeni plazmidi koji na sebi nose gene za sintezu bakteriocina i imunost na njega, da bi se izbegao letalni efekat sintetisanog bakteriocina na ćelije koje su izgubile plazmid, prekonoćna kultura tretiranog soja je razblažena svežim medijumom za rast koji je sadržavao subletalnu koncentraciju novobiocina (8 µg/ml) u zapreminskom odnosu tako da se postigne broj od 10³ ćelija/ml medijuma. Ćelije su inkubirane 2 h na 42°C, a zatim centrifugirane 15 min na 4000 rpm u kliničkoj centrifugi (5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) na sobnoj temperaturi. Talog bakterija je resuspendovan u istom volumenu svežeg medijuma koji je sadržavao novobiocin (8 µg/ml). Ovaj postupak je ponovljen više puta (5-6x). Nakon poslednjeg tretmana, alikvoti kulture (100 µl) su razmazivani na petri šolje i gajeni na optimalnoj temperaturi za rast soja (30°C). Utvrđivanje da li su neke kolonije izgubile sposobnost sinteze bakteriocina i u kom procentu rađeno je bakteriocinskim testom.

4.3. Transformacija laktobacila elektroporacijom

Priprema elektrokompetentnih ćelija i elektroporacija laktobacila je rađena prema proceduri koju su opisali Walker i saradnici (1996). Iz pojedinačne kolonije sa MRS petri šolje zasejana je kultura laktobacila u MRS medijum i gajena na 30°C preko noći. Zatim je

prekonoćna kultura razblažena 100 puta u MRS-u koji sadrži 1% glicin. Kultura je inkubirana na 30°C do $OD_{600nm} = 0.2-0.6$. Talog bakterija iz 10 ml kulture je ispiran dva puta u istoj zapremini HEB pufera (272 mM saharoza, 8 mM HEPES pH 7.5) i resuspendovan u 100 μ l istog rastvora. Nakon dodavanja 1 μ g plazmidne DNK, smeša je držana 5 min na ledu, a zatim je suspenzija mešana i prebacivana u kivete za elektroporaciju (dijametra 0.2 cm). Elektropulsiranje bakterija je rađeno u GENE PULSER aparatu (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) sa podešenim uslovima od 6.25 kV/cm, 25 μ F i 200 Ω . Odmah zatim u kivetu sa suspenzijom pulsiranih ćelija je dodavana smeša za regeneraciju (MRS, 20 mM saharoza, 10 mM $MgCl_2$) koja je inkubirana 5 min na ledu. Nakon toga smeša je inkubirana 3 h na 30°C a zatim su alikvoti transformacione smeše razmazivani na MRS selektivne podloge sa odgovarajućim antibiotikom (eritromicin, 5 μ g/ml), koje su inkubirane na 30°C do pojave transformanata (najčešće 2-3 dana).

4.4. Transformacija *E. coli*

4.4.1. Priprema *E. coli* kompetentnih ćelija

Kompetentne *E. coli* ćelije su pripremane po modifikovanoj proceduri sa rubidijum hloridom (Hanahan, 1985). LB medijum, 100 ml inokulisan je sa 1 ml kulture dobijene resuspendovanjem 10 kolonija sa sveže, prekonoćne, LA petri šolje i ćelije su gajene na 37°C uz intenzivnu areaciju na 180 rpm, do optičke gustine kulture od 0.4 na 600 nm. Rast bakterijske kulture je zaustavljen inkubacijom kulture 15 min na ledu. Nakon hlađenja bakterije su obarane iz medijuma 10 min na 5000 rpm u kliničkoj centrifugi (5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) na 4°C. Supernatant je odlivan, a talog resuspendovan laganim mešanjem u istom volumenu prethodno ohlađenog 0.1 M $CaCl_2$ i ostavljen na ledu 15 min. Ćelije su zatim ponovo obarane 10 min na 5000 rpm, a talog resuspendovan u 1/12.5 volumena RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2 \times 2H_2O$, 15% glicerol, finalno pH 6.8). Suspenzija ćelija je podeljena u alikvote od po 200 μ l, koji su naglo zamrzavani u tečnom azotu, a zatim čuvani na -80°C.

4.4.2. Transformacija kompetentnih *E. coli* ćelija temperaturnim šokom "Heat shock"

Transformacija kompetentnih *E. coli* ćelija vršena je izlaganjem ćelija temperaturnom šoku u prisustvu plazmidne DNK ili ligacione smeše. Pre dodavanja DNK zamrznute ćelije su otapane na ledu. Suspenziji otopljenih ćelija dodavana je DNK (u zapremini do 20 μ l, ukupne količine DNK ne više od 200 ng), a zatim je inkubirana 60

min na ledu uz povremeno mešanje. Nakon inkubacije ćelije su izlagane temperaturnom stresu u trajanju od 90 sekundi na 42°C, a zatim su inkubirane 5 min na ledu. Ćelije su posle transformacije oživljavane dodavanjem 300 µl LB medijuma i inkubirane uz intenzivnu aeraciju 30 do 60 min zavisno od ekspresije antibiotske rezistencije na 37°C. Ćelije su zatim razmazivane na selektivne LB podloge i inkubirane na 37°C do pojave transformanata.

5. METODE ZA IZOLOVANJE DNK

5.1. Metoda za izolovanje ukupne DNK iz laktokoka i laktobacila

Ukupna DNK iz laktokoka i laktobacila je izolovana po modifikovanoj mini metodi (Hopwood *et al.*, 1985) i rađena je na sledeći način. Talog dobijen centrifugiranjem bakterija iz 3 ml logaritamske faze kulture ($OD_{600nm}=0.6-0.8$) je opran u 500 µl TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM NaCl) i resuspendovan u 500 µl PP pufera (0,5 M saharoze, 40 mM NH_4 -acetata, 10 mM Mg-acetata, pH 7). Dodat je lizozim u koncentraciji 8 mg/ml (za laktobacile) ili 4 mg/ml (za laktokoke). Zatim je vršena inkubacija ćelija 30 min na 37°C, ili dok ćelije nisu postale translucetne, nakon čega je dodavano 250 µl 2% SDS-a i suspenzija intenzivno mešana na vorteksu u trajanju od jednog minuta ili dok viskozitet nije postao primetno manji. Posle ovog koraka vršeno je odstranjivanje proteina višestrukom (do potpunog gubitka međufaze) fenolskom ekstrakcijom, pri čemu je svaki put dodavano 250 µl neutralnog fenol-hloroforma, rastvor intenzivno mešan u trajanju od 30 sec i centrifugiran 2 min na 13000 rpm (5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Pažljivo sakupljenom supernatantu dodavana je 1/10 volumena 3M Na-acetata pH 4.8 i 1 volumen izopropanola, a zatim je lagano mešan i inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi. Ukupna DNK je taložena centrifugiranjem 2 min na 13000 rpm. Talog totalne DNK je ispran hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiran 2 min na 13000 rpm, sušen i resuspendovan u 50 µl bidestilovane vode. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1 µl RNaze (10 mg/ml) na 37°C u trajanju od 30 min. Ovako izolovana DNK je stabilna i pogodna za digestiju restrikcionim enzimima.

5.2. Mini metoda za izolovanje velikih plazmida iz laktokoka i laktobacila

Plazmidi iz BMK su izolovani po prethodno opisanoj proceduri (O' Sullivan and Klaenhammer, 1993). Talog dobijen centrifugiranjem bakterija iz 10 ml logaritamske kulture ($OD_{600nm}=0.6-0.8$) je opran u 500 µl TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM

EDTA pH 8, 50 mM NaCl) i resuspendovan u 200 μ l pufera koji sadrži (25% saharozu sa lizozimom (30 mg/ml). Smeša je inkubirana 1 h na 37°C, a zatim je dodavano 400 μ l alkalnog rastvora SDS-a (3% SDS, 0.2 M NaOH), nakon čega je smeša inkubirana 7 min na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja 300 μ l 3 M Na-acetata, pH 4.8, ohlađenog na ledu, uzorci su ostavljeni 10 min na -20°C, a zatim centrifugirani 20 min, 13000 rpm (5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Supernatant je prebacivan u nove mikrotube uz dodavanje 650 μ l 2-propanola i centrifugiran 15 min na 13000 rpm. Dobijeni talog je resuspendovan u 320 μ l vode i smeši je dodavano 200 μ l 7.5 M NH₄-acetata sa 0.5 mg/ml etidijum bromida, a zatim i 350 μ l smeše fenol-hloroforma. Ovako dobijena smeša je dobro vorteksovana i centrifugirana 10 min na 13000 rpm (5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Gornja (vodena) faza je prebacivana u nove mikrotube, a DNK iz rastvora je precipitirana dodavanjem hladnog etanola (96%, -20°C) i centrifugiranjem 20 min, 13000 rpm. Uzorak je zatim ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiran 5 min na sobnoj temperaturi, a talog je nakon odstranjivanja etanola sušen u Speed Vac-u i resuspendovan u 20 μ l dd H₂O. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1 μ l RNaze (10 mg/ml) na 37°C u trajanju od 30 min.

5.3. Mini metoda za izolovanje plazmidne DNK iz *E. coli*

Izolovanje male količine plazmidne DNK iz *E. coli* rađena je po modifikovanoj metodi koju je opisao Brown, 1997. Čelije *E. coli* iz prekononočne kulture su taložene centrifugiranjem 1 min, 13000 rpm u (5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), a zatim resuspendovane u 200 μ l rastvora za resuspendovanje ćelija (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, finalno pH 8.0) koji sadrži RNazu. Dobijena suspenzija je homogenizovana intenzivnim mešanjem, a zatim je dodavano 200 μ l rastvora za lizu ćelija (200 mM NaOH i 1% SDS). Neutralizacija liziranih ćelija je vršena dodavanjem 200 μ l rastvora za neutralizaciju (3.1 M kalijum acetat, sirćetna kiselina, finalno pH 5.5), smeša je intenzivno mešana i centrifugirana 10 min na 13000 rpm. Supernatant je prenošen u nove mikrotube u koje je dodato 200 μ l fenol-hloroforma, ova smeša je dobro vorteksovana i centrifugirana 10 min na 13000 rpm. Gornja (vodena) faza je prebacivana u nove mikrotube, a DNK iz rastvora je precipitirana dodavanjem 2-propanola i centrifugiranjem 20 min, 13000 rpm. Uzorak je zatim ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiran 5 min na sobnoj temperaturi, a talog je nakon odstranjivanja etanola sušen i resuspendovan u 50 μ l dd H₂O.

6. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK

6.1. Sečenje DNK restrikcionim enzimima

Sečenje restrikcionim enzimima (Maniatis *et al.*, 1982) je rađeno u 1 x Tango™ puferu (33 mM Tris-acetat, 10 mM Mg-acetat, 66 mM K-acetat, 0.1 mg/ml BSA). Uslovi za sečenje DNK restrikcionim enzimima, količina enzima, pufer i temperatura inkubacije, određivani su prema uputstvu proizvođača (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija).

6.2. Ligacija DNK fragmenata

Ligacija fragmenata DNK (Maniatis *et al.*, 1982) rađena je mešanjem DNK fragmenta i vektora sa komplementarnim lepljivim krajevima u ligacionom puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 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.

6.3. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metoda ("Polymerase Chain Reaction")

Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom je vršeno tako što su totalnoj ili plazmidnoj DNK (0.1-1 µg) u 1x reakcionom puferu (10xRP: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0.8% Nonidet P40 (NP40) finalno pH 8.8 na 25°C) dodavani 25 mM MgCl₂ u finalnoj koncentraciji 2.5 mM, dNTP smeša (svaki dNTP po 200 µM), prajmeri (svaki po 2.5 µM) i DNK Taq polimeraza (1 U/µl - Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija).

PCR reakcija u kojoj je korišćen BOX prajmer (Versalovic *et al.*, 1994) rađena je po sledećem programu: početna denaturacija 7 min na 95°C, umnožavanje DNK fragmenata u 33 ciklusa: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 53°C, polimerizacija 8 min na 65°C; poslednji ciklus polimerizacija 16 min na 65°C.

PCR reakcija u kojoj je korišćen (GTG)₅ (Versalovic *et al.*, 1994) prajmer rađena je po sledećem programu: početna denaturacija 7 min na 94°C, umnožavanje DNK fragmenata u 33 ciklusa: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 40°C, polimerizacija 8 min na 65°C; poslednji ciklus polimerizacija 16 min na 65°C.

PCR reakcija u kojoj su korišćeni prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence poreklom iz *prtP* gena i *prtP/prtM* intergenskog regiona rađena je po sledećem programu: početna denaturacija 5 min na 94°C, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 50°C, polimerizacija 1 min na 72°C; poslednji ciklus polimerizacije je 7 min na 72°C. Sekvence korišćenih prajmera u ovom radu date su u Tabeli 3.

Za sekvenciranje 16S rRNK umnožavanje željenog fragmenata je vršeno uz pomoć prajmera P1_{16S} i P2_{16S}. PCR reakcija je rađena po sledećem programu: početna denaturacija 7 min na 94°C, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 30 sek na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 55°C, polimerizacija 30 sek na 72°C; poslednji ciklus polimerizacije je 7 min na 72°C. Ovako dobijeni PCR produkti su nakon prečišćavanja propuštanjem kroz kolonice QIAquick PCR Purification KIT/250 (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) slati na sekvenciranje u centar za sekvenciranje Macrogen's sequencing service, Seul, Koreja. Sekvence su upoređivane uz pomoć NCBI baze podataka, "BLAST" programom (Altschul *et al.*, 1997) za pretraživanje homologe nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Tabela 3 – Sekvence prajmera korišćenih u ovom radu*

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera
P1 _{16S}	5'-GAATCTTCCACAATGGACG-3'
P2 _{16S}	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAG-3'
BoxA1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGAG-3'
GTG ₅	5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'
P _{15C} (<i>Bam</i> HI)	5'-CGGGATCCAACCAAATCTGATGTTG-3'
P _{06C} (<i>Eco</i> RI)	5'-GGAATTCTTTCAGCGGAAGCAACT-3'
PrtP700(<i>Bam</i> HI)	5'-CGGGATCCGTCGACGTATTTGCGAG-3'
PrtM700(<i>Eco</i> RI)	5'-GGAATTCAATGCACGATAAATGAG-3'

*Sekvence koje prepoznaju restrikcioni enzimi su podvučene

7. ELEKTROFOREZA I ELUCIJA DNK

7.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza totalne i plazmidne DNK je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u 1 x TAE puferu (40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA) uz dodavanje etidijum bromida (0.5 µg/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je 1 x TAE pufer. Korišćeni su 1% agarozni gelovi, a elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela.

Elektroforeza umnoženih DNK fragmenta pomoću (GTG)₅ ili BOX prajmera je rađena na horizontalnim 1,5% agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u 1 x TAE puferu (40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA) sa dodatim etidijum bromidom (0.5 µg/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je 1 x TAE pufer. Elektroforeza je tekla 20 sati na +4°C, pri konstantnom naponu od 60V.

Veličine linearnih DNK fragmenata dobijenih posle umnožavanja DNK ili sečenja restikcionim enzimima određivane su na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine pređenog puta DNK fragmenta koji se analizira u odnosu na dužinu puta koju su prešli DNK fragmenti poznate veličine (standard). Korišćen je komercijalni standard "Gene Ruler™" 100 bp DNA Ladder (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija).

7.2. Elucija DNK fragmenata

Elucija DNK fragmenata dobijenih PCR metodom vršena je korišćenjem QIAquick Gel extraction kit/250 po protokolu za MiniElute Gel Extraction (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka).

8. METODE RADA SA PROTEINIMA

8.1. Testiranje proteolitičke aktivnosti

8.1.1. Hidroliza kazeina

Analiza proteolitičke aktivnosti je vršena po modifikovanoj metodi koju su opisali Hill and Gasson (1986). Čelije za praćenje proteolitičke aktivnosti su gajene na čvrstoj MCA podlozi. Nakon 48 h inkubacije na 30°C čelije su sakupljane ezom (10 mg vlažne mase) prebacivane u mikrotube i resuspendovane u po 50 µl 100 mM Na-fosfatnog pufera,

pH 6.8. Suspenzija ćelija je mešana sa istom zapreminom rastvora supstrata α_{S1} , β i κ -kazeina (5 mg/ml u istom puferu) i inkubirana tri sata na 30°C. Nakon završene inkubacije smeša je centrifugirana 5 min na 13000 rpm (5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodavanjem supernatantu (50 μ l) iste zapremine 2x koncentrovanog pufera za uzorak (125mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 20% glicerol, 0.05% brom fenol plavo - BPB, 5% β -merkaptoetanol). Pre nanošenja na gel uzorci su inkubirani 2 min na 100°C.

8.1.2. Elektroforeza proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Razdvajanje proteina, α_{S1} , β i κ -kazeina i njihovih degradacionih proizvoda dobijenih aktivnošću proteinaze vršeno je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu po opisanoj proceduri (Laemmli *et al.*, 1970). Korišćena je aparatura za vertikalnu elektroforezu firme Hoeffler (Hoeffler SE 600, Amersham Biosciences, CA, USA). Pravljen je diskontinuiran sistem gelova, koji se sastojao iz gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje, debljine 1.5 mm. Koncentracije komponenti u gelu za koncentrovanje su bile sledeće: 7% akrilamid/bisakrilamid, 117 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% amonijum persulfat i 0.1% TEMED. Finalne koncentracije komponenti u gelu za razdvajanje su: 15% akrilamid/bisakrilamid 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% amonijum persulfat i 0.1% TEMED. Gel za razdvajanje je nalivan do oko 3/4 zapremine ploča, a u ostatak je nalivan gel za koncentrovanje.

Pufer za elektroforezu je sadržavao 25 mM Tris pH 8.3, 186 mM glicin i 0.1% SDS. Elektroforeza je tekla pri konstantnoj struji od 8 mA preko noći. Gelovi su bojeni komaziplavim (Comassie brilliant blue R250) u rastvoru sastava: 45% metanol, 45% voda, 10% sirćetna kiselina i 0.25% komasi plavo, 3-4 h uz mešanje. Odbojavanje gelova je vršeno u rastvoru sastava: 20% metanol, 70% voda i 10% sirćetna kiselina, uz mešanje. Rastvor za odbojavanje menjan je na svaka 3-4 h. Obnavljanje rastvora za odbojavanje je vršeno filtriranjem kroz aktivni ugalj, koji za sebe vezuje komasi plavo. Nakon odbojavanja, gelovi su čuvani u odbojivaču na 4°C.

8.2. Analiza agregacionog fenotipa kod BMK

8.2.1. Merenje uticaja različitih faktora na gubitak sposobnosti agregacije kod BMK

Prekonoćna bakterijska kultura soja BGSJ2-8 koja je pokazivala sposobnost agregacije je vorteksovana 1 min a zatim je mereno vreme koje je potrebno za potpunu

agregaciju ćelija u epruveti pri čemu se iznad tog ćelijskog taloga dobije potpuno prozračan medijum. Nakon toga bakterijska kultura je centrifugirana 5 min na 13000 rpm (5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i dobijeni pelet je pran MilliQ vodom do gubitka sposobnosti agregacije. Supernatant dobijan u svakom koraku je čuvan. Nakon toga supernatant dobijen u prvom pranju peleta vraćan je ćelijama i zatim je praćena pojava obnavljanja sposobnosti agregacije. Svi eksperimenti su rađeni paralelno sa BGSJ2-81 (Agg⁻ derivat) kao negativnom kontrolom.

8.2.2. Analiza uticaja katjona, pH sredine i različitih medijuma za rast na sposobnost agregacije kod BMK

Pelet prekonoćne bakterijske kulture soja BGSJ2-8 je pran MilliQ vodom do gubitka sposobnosti agregacije. Zatim je takav pelet resuspendovan u puferima koji su sadržali različite jone i imali različit pH: KCl (pH 3), HCl – glicin (pH 3), Na – citrat (pH 4 – 6), Tris – HCl (pH 7 – 10) i Tris – NaOH (pH 11 – 12), a analiziran je efekat sledećih jona: K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ i Fe³⁺ u koncentracijama 0.1, 1 i 10 mM. Sposobnost agregacije je praćena merenjem apsorbance na 600 nm. Soj BGSJ2-8 je gajen u MRS, GM17 i CDM medijumu da bi se ustanovio efekat različitih medijuma na sposobnost agregacije kod ovog soja.

8.2.3. Analiza proteina odgovornih za sposobnost agregacije kod BGSJ2-8

Po 250 ml prekonoćne bakterijske kulture sojeva BGSJ2-8 i BGSJ2-81 je centrifugirano na 8000 rpm 20 min u rotoru SS34 (Sorvall RC-5B) na 4°C i dobijeni pelet je opran u po 50 ml bidestilovane vode. Proteini dobijeni u supernatantu nakon pranja peleta su precipitirani sa 25% amonijum sulfata. Precipitirani proteini su resuspendovani u 10 mM Tris – HCl, pH 8.5 i analizirani na 10% SDS – PAGE gelu. Na gel je pored uzorka nanet i proteinski standard "Prestained protein marker, broad range" (2.34 – 212 kDa, BioLabs, New England). Nakon elektroforeze gel je bojen komazi – plavim da bi se vizualizovale dobijene proteinske trake na gelu.

8.3. Metode rada sa bakteriocinima

8.3.1. Bakteriocinski test

Za detekciju proizvodnje bakteriocina korišćene su dve metode: metod iskapavanja i dufuzioni metod u bunarčićima (Harris *et al.*, 1989):

1. **Metod iskapavanja** se sastoji u tome da se na dobro osušene petri šolje iskapa 5-10 μl prekonoćne kulture testiranog soja i ostavi da se kap osuši na sobnoj temperaturi. Posle sušenja, petri šolje se prelivaju sa 3 ml MRS soft-agara ohlađenog na 42°C , koji sadrži oko 10^5 - 10^6 ćelija indikatorskog soja/ml medijuma. Nakon očvršćavanja petri šolje se inkubiraju preko noći na 30°C , a bakteriocinska aktivnost se detektuje pojavom zone inhibicije rasta indikatorskog soja u soft agaru, koja se vidi kao svetla zona oko kolonije proizvođača.

Kod analize bakterijskih kolonija na sposobnost sinteze bakteriocina korišćen je nešto izmenjen metod. Izrasle bakterijske kolonije su sterilnim čačkalicama prenošene na nove, dobro osušene petri šolje. Nakon 15 min stajanja na sobnoj temperaturi, da bi se kolonije vezale za podlogu, petri šolje su prelivane sa 3 ml soft-agara ohlađenog na 42°C , koji sadrži oko 10^5 - 10^6 ćelija indikatorskog soja/ml medijuma. Petri šolje su inkubirane preko noći na optimalnoj temperaturi rasta za ispitivane sojeve.

2. **Difuzioni metod u bunarčićima** je rađen tako što su petri šolje sa čvrstom podlogom prelivane sa 7 ml MRS soft agara koji je inokulisan sa oko 10^5 - 10^6 ćelija indikatorskog soja/ml medijuma. U soft agaru su pravljene bunarčići prečnika 5 mm u koje je sipano po 50 μl supernatanta, oslobođenog ćelija centrifugiranjem i filtriranjem kroz sterilne filtere 0.45 μm (Sartorius) ili kuvanjem na 100°C (za termostabilne bakteriocinske molekule) i neutralisanog na pH 7 pomoću 1M NaOH. Prisustvo bakteriocina u supernatantu je detektovano na osnovu pojave svetle zone oko bunarčića u prečniku od nekoliko milimetara, kao posledica inhibicije rasta senzitivnog bakterijskog soja.

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

Za ispitivanje bakteriocinske aktivnosti soja BGSJ2-8 korišćen je sirovi preparat bakteriocina BacSJ, koji je pripreman na sledeći način. Prekonoćna kultura BGSJ2-8 i BGSJ2-81 gajena u MRS medijumu, je centrifugirana dva puta po 20 min na 8000 rpm u rotoru SS34 (Sorvall RC-5B) na 4°C . Dobijeni supernatant je oslobođan od ćelija inkubacijom na 100°C 15 min. Ovako dobijeni preparat je korišćen za dalje eksperimente. Aktivnost im je testirana bakteriocinskim testom, difuzionim metodom u bunarčićima.

Arbitrarne jedinice su određene po opisanoj metodi (Mayr-Harting *et al.*, 1972) na sledeći način. Supernatant proizvođača bakteriocina, pripremljen na prethodno opisan način je razblažen medijumom (1/2, 1/4, 1/8, 1/16...). Alikvoti (5 μl) odgovarajućih

razblaženja su naneti na dobro osušen soft-agar (5 ml) sa indikatorskim sojem BGBUK2-8 (10^5 - 10^6 bakterija/ml agara). Petri šolje su zatim inkubirane preko noći na 30°C. Recipročna vrednost najvećeg razblaženja, koja daje definisanu zonu inhibicije indikatorskog soja predstavlja količinu ili aktivnost bakteriocina izraženog u AU.

8.3.3. Praćenje biosinteze bakteriocina

Da bi se otklonio prethodno sintetisani bakteriocin, 16 h stara prekonocna kultura BGSJ2-8 rasla u MRS medijumu, je centrifugirana i dva puta oprana u istom volumenu medijuma. Oprane ćelije su razblažene 100x MRS medijumom (finalno MRS je inokulisan sa oko 10^7 ćelija/ml proizvođača bakteriocina), i po 5 ml je razliveno u epruvete i inkubirano na 30°C. Svakog sata je meren OD na 600 nm, određivan broj živih ćelija, CFU/ml (Colony Forming Units) titiranjem odgovarajućeg razblaženja na petri šolju sa MRS medijumom. Pored toga uziman je i alikvot kome je testirana antibakterijska aktivnost određivanjem AU.

8.3.4. Testiranje termostabilnosti i pH opsega bakteriocina

Termostabilnost BacSJ je testirana na sledeći način: bakteriocinski preparati, pripremljeni na prethodno opisan način su inkubirani 15 i 30 min na sledećim temperaturama: 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C i 100°C. Dodatno, termostabilnost bakteriocina je testirana 10, 15, 20, 30 i 60 min na 100°C. Nakon hlađenja (stajanjem na sobnoj temperaturi), uzorcima je ispitana bakteriocinska aktivnost difuzionim metodom u bunarčićima. U sledećem eksperimentu, bakteriocinski preparati su autoklavirani, tj. inkubirani 18 minuta na 118°C i 15 min na 121°C. Ovako tretiranim uzorcima je nakon hlađenja određena bakteriocinska aktivnost difuzionim metodom u bunarčićima. Očuvanje aktivnosti BacSJ na niskim temperaturama je analizirano tako što je supernatant čuvan na temperaturi od +4°C i -20°C i svake nedelje je testirana aktivnost u toku tri meseca. U svim navedenim eksperimentima indikatorski soj je bio BGBUK2-8.

Aktivnost BacSJ na različitim pH je testirana tako što je alikvotima bakteriocinskih preparata podešen pH na različite pH vrednosti (od pH 1 do pH 12) koristeći 1M HCl ili 1M NaOH sa razmakom od po jedne pH jedinice. Ovako tretirani uzorci su inkubirani 1 h na 30°C, a zatim im je određena bakteriocinska aktivnost. U sledećem koraku alikvotima bakteriocinskih preparata je podešen pH na pH 12, uzorci su inkubirani 5, 10, 15, 30 i 60 min na 30°C, a zatim je testirana antibakterijska aktivnost istom metodom kao i u prethodnom eksperimentu.

Da bi se proverilo da li će se antibakterijska aktivnost bakteriocina BacSJ restaurirati nakon inkubacije na pH 12, bakteriocinski preparati su inkubirani 1 h na 30°C, na pH 12, nakon čega su neutralisani na pH 7 i inkubirani na 30°C. Posle inkubacije od 5, 10, 15, 30 i 60 min alikvotima neutralisanih bakteriocinskih preparata je ispitana antibakterijska aktivnost bakteriocinskim testom. Paralelno sa supernatantom proizvođača bakteriocina, u svim prethodnim eksperimentima tretiran je i supernatant derivata koji ne sintetiše bakteriocine, BGSJ2-83 da bi se eliminisao efekat pH na rast indikatorskog soja (negativna kontrola). U svim opisanim eksperimentima, bakteriocinski test je rađen difuzionim metodom u bunarčićima na indikatorski soj BGBUK2-8.

8.3.5. Efekat delovanja različitih enzima na bakteriocine

Ispitivano je delovanje sledećih enzima na bakteriocin BacSJ: pronaze E (Sigma), proteinaze K (Sigma), pepsina (Calbiochem), tripsina (Calbiochem), lizozima (Sigma), lipaze (Calbiochem), DNaze (Sigma), RNaze (Sigma). Pronaza E i proteinaza K su rastvarane u 0.01 M Tris-HCl puferu, pH 8, tripsin i lizozim u 0.05 M Tris-HCl puferu, pH 8; a pepsin je rastvaran u 0.02 M HCl, pH 2. Ostali korišćeni enzimi rastvarani u 0.05 M Na-fosfatnom puferu, pH 6.5. Enzimi u odgovarajućim 2x puferima su dodavani bakteriocinskom preparatu pripremljenom na prethodno opisan način u odnosu 1:1 tako da je njihova finalna koncentracija bila 1 mg/ml. Smeša bakteriocina i enzima u odgovarajućem puferu je inkubirana 1 h na 37°C i nakon toga joj je testirana bakteriocinska aktivnost difuzionim metodom u bunarčićima. Soj BGBUK2-8 je korišćen kao indikatorski soj. Kao kontrole su korišćene: smeša bakteriocinskog preparata i odgovarajućeg pufera za ispitivani enzim, smeša enzima i pufera bez bakteriocinskog preparata i korišćeni puferi.

8.3.6. Efekat katjona i redukujućih agenasa na bakteriocinsku aktivnost

Testiran je uticaj sledećih katjona na bakteriocinsku aktivnost: Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , K^{+} i Na^{+} u koncentracijama od 5 mM, 10 mM, 15 mM i 20 mM. Bakteriocinski preparat je pripremljen isto kao i u prethodno navedenim testovima i posle mešanja sa različitim katjonskim rastvorima u odnosu 1:1 inkubiran 1 h na temperaturi od 37°C. Bakteriocinska aktivnost je testirana difuznom metodom u bunarčićima. Kao kontrola korišćeni su bakteriocinski preparati bez katjona i rastvori katjona bez bakteriocina. Pored ovog testa urađen je i test u kome je testiran uticaj 10 mM EDTA na aktivnost bakteriocinskog preparata koji je u sebi sadržao bakteriocin BacSJ. Uticaj

redukujućih agenasa je testiran mešanjem pripremljenog uzorka bakteriocina sa 1 mM, 2 mM i 5 mM DTT i inkubiranjem 1 h na 37°C. U ovako pripremljenim uzorcima bakteriocinska aktivnost je testirana difuznom metodom u bunarčićima. Kao kontrola korišćen je supernatant soja koji ne sintetiše bakteriocin, BGSJ2-83, koji je tretiran na isti način. Indikatorski soj je u svim testovima bio BGBUK2-8.

8.3.7. Uticaj filtracije kroz bakteriološke filter na aktivnost bakteriocina

Da bi se utvrdilo da li primena bakterioloških filtera ima uticaj na aktivnost bakteriocina BacSJ, urađen je sledeći eksperiment. Po 10 ml supernatanta proizvođača bakteriocina BGSJ2-8 i BGSJ2-81, pripremljen na prethodno opisan način su filtrirani kroz dva tipa bakterioloških filtera: celulozo-acetatni (0.45 μ m, Sartorius) i celulozo-nitratni (0.45 μ m, Sartorius). Nakon filtracije aktivnost bakteriocinskih preparata je testirana difuzionim metodom u bunarčićima. Indikatorski soj korišćeni u ovom testu bio je BGBUK2-8. Kao pozitivna kontrola su korišćeni netretirani bakteriocinski preparati.

8.3.8. Određivanje antibakterijskog spektra delovanja bakteriocina

Antibakterijska aktivnost soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, proizvođača bakteriocina BacSJ, testirana je na različite indikatorske sojeve difuzionim metodom u bunarčićima. Kao indikatorski sojevi korišćeni su različiti sojevi laktobacila i neki sojevi laktokoka. Uz ivicu bunarića uvek je dodavan kristal pronaze E. Da bi se analizirala unakrsna aktivnost BacSJ sa drugim bakteriocinima rađen je test unakrsne rezistencije. U ovom testu soj BGSJ2-8 i drugi sojevi proizvođači poznatih bakteriocina su korišćeni i kao indikatorski sojevi i kao proizvođači.

8.4. Izolovanje bakteriocina

8.4.1. Katjonska jonoizmenjivačka hromatografija

Katjonska jonoizmenjivačka hromatografija rađena je na Streamline SP koloni (26 x 100 mm, Amersham) na "Fast Protein Liquid Chromatography" (FPLC) (Biocad print system; Perkin-Elmer) aparatu. Izolovanje bakteriocina rađena je iz 250 ml supernatanta dobijenog iz 16 h stare prekončne kulture soja BGSJ2-8. Pre nanošenja uzorka na kolonu pH je podešen na pH 4. Za ekvibraciju kolone korišćen je pufer A (50 mM Na-acetatni pufer, pH 4). Nakon nanošenja uzorka na kolonu (250 ml) skupljena je frakcija koja prođe

kroz kolonu tzv. "Flowe through" (FT) frakcija koja pokazuje da li se bakteriocin vezao za kolonu, a zatim su uzorci eluirani korišćenjem step gradijenta pufera B (pufer A koji u sebi sadrži različite količine 1 M NaCl): 10:90 (B:A), 30:70 (B:A); i 100% B. Protok je bio 10 ml/min. Tokom elucije merena je apsorbanca na 220 i 280 nm. Skupljenim frakcijama, FT, 0.1 M, 0.3 M i 1 M NaCl, je testirana aktivnost difuzionim metodom u bunarčićima gde je kao indikatorski soj korišćen BGBUK2-8. Kontrola je bio početni uzorak koji je nanet na kolonu kao i prekonocna kultura BGSJ2-8.

8.4.2. Reverzno-fazna hromatografija

Reverznofazna hromatografija je rađena na Poros R1 koloni (20 x 200 mm; Applied Biosystems) na FPLC aparatu. Ukupan volumen aktivne eluirane frakcije dobijen nakon katjonske jonoizmenjivačke hromatografije je nanet na kolonu. Skupljena je FT frakcija a zatim je rađena elucija. Puferi za eluciju su bili pufer A (0.1% trifluorosirćetna kiselina (TFA)) i pufer B (0.09% TFA, 80% acetonitril). Elucija je rađena primenom linearnog gradijenta od 0% do 60% pufera B i zatim je kolona isprana 100% puferom B. Protok je bio 5 ml/min. Tokom elucije merena je apsorbanca na 220 i 280 nm. Frakcionim kolektorom su skupljane frakcije, zapremine 8 ml, koje su zatim 10x koncentrovane pod vakuumom (Speed-Vac Plus SC 110A Savant, SAD). Nakon koncentrovanja podešen je pH frakcija na pH 6.8 korišćenjem 1 M natrijum fosfatnog pufera i testirana im je aktivnost difuzionim metodom u bunarčićima gde je kao indikatorski soj korišćen BGBUK2-8.

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

U trećem koraku izolovanja bakteriocina SJ reverznofazna hromatografija je rađena na Nucleosil C₁₈ koloni (300 Å, 5 µm, 4 x 250 mm; Macherey Nagel, Francuska) na "High Performance Liquid Chromatography" (HPLC) aparatu. Nakon nanošenja 200 µl uzorka (aktivna frakcija iz prethodnog koraka prečišćavanja) elucija je rađena pomoću pufera A (0.1% TFA) i pufera B (0.09% TFA, 70% acetonitril). Protok je bio 0.8 ml/min. Za eluciju je korišćen linearni gradijent od 100% pufera A ka 100% puferu B u toku 30 min. Tokom elucije merena je apsorbanca između 210 i 350 nm korišćenjem detektora sa foto diodom (model 996, Waters). Frakcije koje su odgovarale piku su ručno skupljane u mikrotube. Skupljene frakcije su potpuno uparene pod vakuumom (Speed-Vac Plus SC 110A Savant, SAD), a zatim su resuspendovani u 40 µl MilliQ vode i testirana im je aktivnost metodom iskapavanja na indikatorski soj BGBUK2-8.

8.4.4. Tricin SDS - PAGE

Uzorci BacSJ, dobijeni prečišćavanjem na koloni su analizirani elektroforezom na poliakrilamidnom gelu koja je rađena po metodi koju su opisali Schägger i Jagow, (1987). Korišćena je mini aparatura za vertikalnu elektroforezu firme BIORAD. Pravljen je diskontinuiran sistem gelova, koji se sastojao iz gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje. Koncentracije komponenti u gelu za koncentrovanje su bile sledeće: 4% akrilamid/bisakrilamid, 744 mM Tris-HCl pH 8.45, 0.07% SDS, 0.08% amonijum persulfat i 0.08% TEMED. Finalne koncentracije komponenti u gelu za razdvajanje su: 16.5% akrilamid/bisakrilamid 1 M Tris-HCl pH 8.45, 0.1% SDS, 13.25% glicerol, 0.1% amonijum persulfat i 0.1% TEMED. Gel za razdvajanje je nalivan do oko 3/4 zapremine ploča, a u ostatak je nalivan gel za koncentrovanje.

Pufer za elektroforezu čine anodni pufer (0.2 M Tris pH 8.9) i katodni pufer (0.1 M Tris pH 8.2, 0.1 M Tricin i 0.1% SDS). Elektroforeza je tekla pri konstantnoj struji od 20 mA. Uzorak je pomešan u odnosu 1:1 sa puferom za uzorak (100 mM Tris pH 6.8, 1% SDS, 24% glicerol, 2% β -merkaptioetanol, 0.02% BPB), zatim je inkubiran 2 min na 100°C i nanošen na gel u duplikatu. Jedna polovina gela na kojoj je uzorak i proteinski standard "Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standard" (1423 – 26625 Da, BIO RAD) je bojena komazi-plavim (Comassie brilliant blue G250) po sledećoj proceduri. Gel se fiksira u 2% fosfornoj kiselini i 50% etanolu 2 x po 1 h. Zatim je ispiran 1 h u 2% fosfornoj kiselini. U sledećem koraku gel je tretiran 20 min u 17% etanolu, 1% amonijum sulfatu i 2% fosfornoj kiselini. Zatim je gel bojen dodavanjem 0.1% komazi plavog G250 u gore navedeni rastvor preko noći uz konstantno mešanje. Nakon bojenja gel je ispiran bidestilovanom vodom 2 x 10 min, zatim 10 min 20% etanolom i opet bidestilovanom vodom u kojoj je čuvan. Nakon odbojavanja, gelovi su čuvani u vodi na sobnoj temperaturi.

Drugi deo gela samo sa uzorkom bakteriocina je pran uz mešanje prvo u 0.5% Tween-u 80 u trajanju od 45 min, a potom 3 x 45 min u MiliQ vodi. Prisustvo bakteriocina u gelu je utvrđeno bakteriocinskim testom tako što je gel prenet u sterilnu petri šolju i preliven sa 10 ml MRS soft-agara, koji je inokulisan sa 10^4 - 10^5 ćelija/ml indikatorskog soja BGBUK2-8. Petri šolja je inkubirana na 30°C preko noći. Poređenjem pozicije zone inhibicije (prosvetljena zona) rasta indikatorskog soja sa pozicijama traka standarda približno je utvrđivana molekulaska masa bakteriocina.

8.4.5. Masena spektrometrija

Za određivanje mase izolovanog proteina, bakteriocina BacSJ, korišćena je kombinovana tehnika tačne hromatografije i masene spektrometrije (LC – ESI/MS) gde je kao maseni analizator korišćen jonski trap (LCQ Advantage, Thermo – Finnigan, San Jose, SAD). Jonski trap je radio u pozitivnom jonskom modu. Uzorak je bio rastvoren u 50 µl smeše vode i acetonitrila u odnosu 1:1 i koji je sadžavao 0.5% mravlju kiselinu. Protok je bio 2.5 µl/min. Tumačenje dobijenog spektra rađeno je korišćenjem X – Calibur 1.3 programa (Thermo – Finnigan) koji je analizirao u opsegu odnosa mase i naelektrisanja (m/z) 400 – 2000.

8.4.6. Određivanje aminokiselinskog sastava bakteriocina

Određivanje aminokiselinskog sastava izolovanog proteina je rađeno po metodi koju su opisali Bidlingmeyer *et al.*, (1984). Protein je hidrolizovan pod vakuumom i u prisustvu 6 N HCl koja je konstantno ključala na 110°C u toku 24 h (Pico-Tag aparat, Waters). Zatim su dobijene aminokiseline derivatizovane korišćenjem fenilizotiocijanata (PITC – “Edmanov reagnes”), i dobijeni uzorak analiziran korišćenjem reverznofazne C₁₈ Pico-Tag kolone (3 Å, 9 mm x 15 cm) na HPLC-u. Na kolonu je naneto 30 µl uzorka, merena je apsorbanca na 254 nm, a zatim je određena procentualna zastupljenost svake aminokiseline u proteinu (Dalgalarondo *et al.*, 1990).

N terminalno sekvenciranje proteinske trake koja je ispoljavala bakteriocinsku aktivnost isečene iz gela nakon Tricin SDS – PAGE je rađeno u Alta Bioscience, Univerzitet u Birmingemu, Velika Britanija. Urađeno je sekvenciranje prvih deset aminokiselina korišćenjem Edmanove reakcije.

Analiza dobijenog uzorka rađena je MALDI-TOF masenom spektrometrijom. Izolovani protein je analiziran metodom koja obuhvata sečenje polipeptidnog lanca na manje fragmente koji su zatim nezavisno analizirani. Dobijanje manjih fragmenata vršeno je hidrolizom proteina proteolitičkim enzimom tripsinom (Promega) i dobijeni peptidi su dalje analizirani korišćenjem MALDI – TOF aparata u Plateforme B.I.B.S. – Spectrométrie de Masse, Unité BIA, INRA, Nant, Francuska.

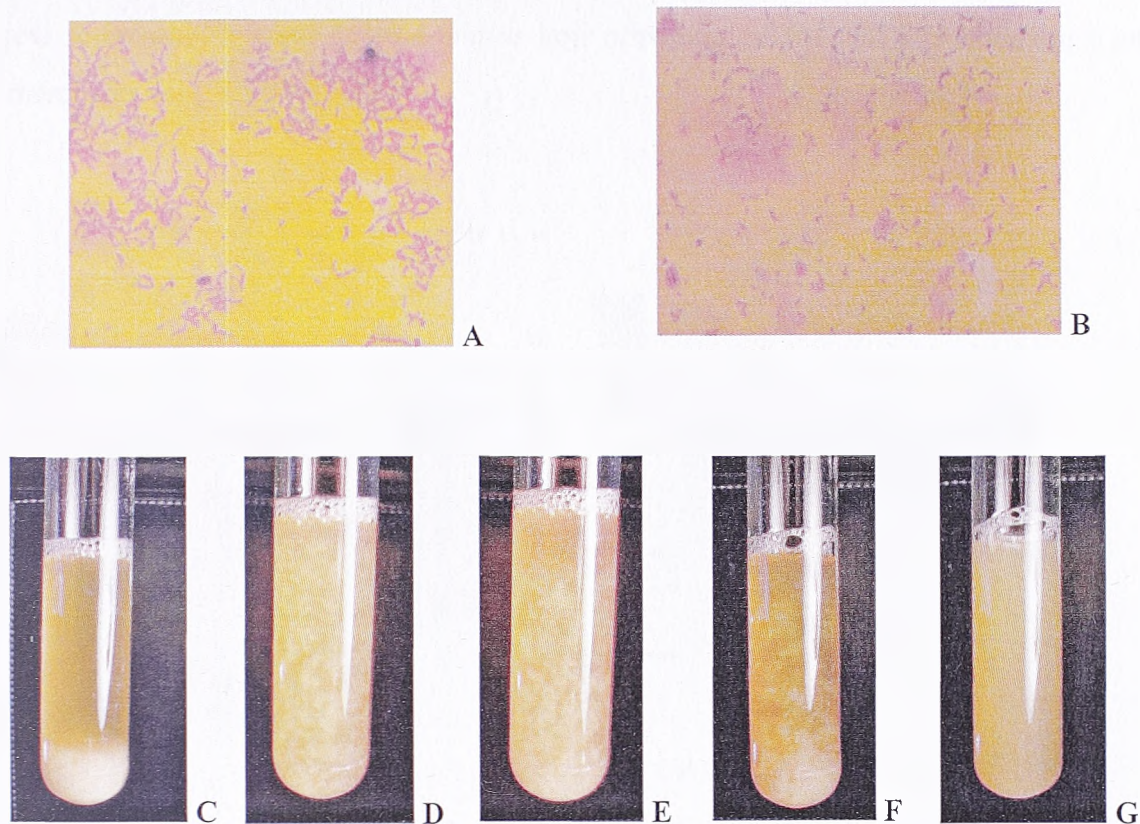
REZULTATI

REZULTATI

1. IZOLOVANJE, KARAKTERIZACIJA I DETERMINACIJA SOJA

Soj *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 je prirodni izolat, izolovan klasičnim mikrobiološkim metodama za izolovanje laktobacila iz belog, polutvrdog sira napravljenog od kravljeg mleka. Sir je proizveden u domaćinstvu bez upotrebe starter kultura, u Sjenici, Peštarska visoravan, Srbija. To je Gram-pozitivna (Slika 7A i 7B), katalaza negativna bakterija koja sintetiše mlečnu kiselinu. Soj sintetiše bakteriocin uskog spektra delovanja i serinsku proteinazu, koja je slična PI tipu laktokokalnih proteinaza (degradije samo β -kazein). Pored toga, soj pokazuje i sposobnost agregacije, koja prekonocnoj kulturi daje karakterističan izgled, (kultura nije homogena već su ćelije istaložene na dnu, slika 7C). Uočeno je da pri svakoj rekultivaciji soja iz stoka sa -80°C na 30°C , na petri šolji mogu se uočiti dva tipa kolonija. Jedan tip su male bele kolonije, jasnih ivica dok drugi tip predstavljaju nešto veće prozračne kolonije, difuznih ivica. Tečne kulture napravljene od ova dva tipa kolonija pokazuju dva različita fenotipa. Bele kolonije imaju sposobnost agregacije (Agg^+) za razliku od prozračnih koje nemaju ovu osobinu (Agg^-) (Slika 7G). Nakon vorteksovanja kulture (mada i tada nije homogena nego ima pahuljast izgled, neravnomerno raspoređen po epruveti) (Slika 7D), kada se ostavi da miruje odmah otpočinje agregacija kulture na dno epruvete (Slika 7E i 7F). Osim toga jednom stokirane kulture napravljene od prozračnih kolonija nakon svake rekultivacije iz stoka sa -80°C ostaju istog izgleda i bez sposobnosti agregacije. S druge strane, stok napravljen od belih kolonija pri svakoj rekultivaciji daje osim belih i 4-5% prozračnih kolonija. Na osnovu toga je zaključeno da soj divljeg tipa BGSJ2-8(Agg^+) daje spontanog derivata BGSJ2-81(Agg^-).

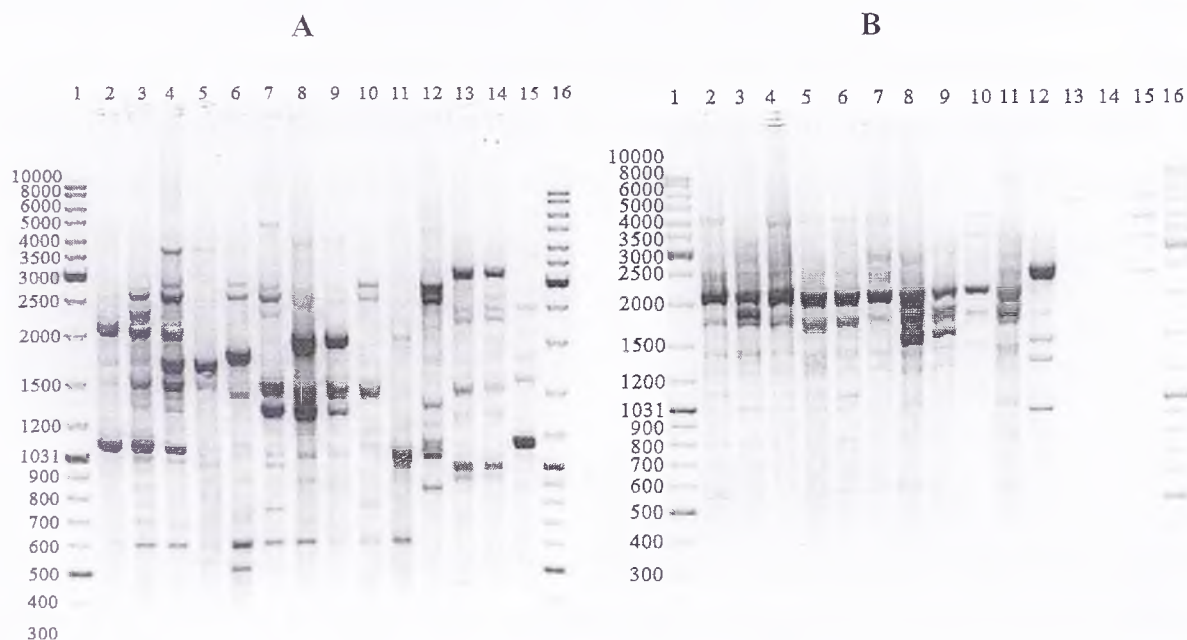
Nakon izolovanja soja na selektivnim podlogama, rađena je njegova identifikacija. Klasične mikrobiološke metode, biohemijski testovi i analiza sposobnosti soja da fermentiše različite šećere korišćenjem API 50 CH (API System S.A.; Montelieu-Vercieu, France) sistema su omogućile preliminarnu identifikaciju soja koja je ukazivala da izolat BGSJ2-8 pripada vrsti *Lactobacillus paracasei*.



Slika 7 – Mikroskopski preparat prirodnog izolata (A) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 i (B) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-81 dobijen bojenjem ćelija po Gramu; (C) Izgled prekonoćne tečne kulture BGSJ2-8; (D) Tečna kultura BGSJ2-8 posle vorteksovanja; (E) Agregacija ćelija BGSJ2-8 posle vorteksovanja; F Izgled kulture BGSJ2-8 u kojoj su ćelije skoro potpuno agregirale posle vorteksovanja; (G) Izgled tečne kulture BGSJ2-81.

Da bi se potvrdila definitivna pripadnost određenoj vrsti dalja determinacija soja je vršena korišćenjem metoda molekularne determinacije. Molekularna detrmnacija je urađena na osnovu rezultata dobijenih rep-PCR metodom korišćenjem totalne DNK izolovane iz odabranih sojeva, koja je poslužila kao matrica za PCR (GTG)₅ i BoxA1R prajmerima. (GTG)₅ motiv je veoma zastupljen u genomu bakterija tako da se primenjivanjem PCR metode sa ovim prajmerom dobija raspored traka za koji možemo reći da je „species“ specifičan. Upoređivanjem dobijenih rasporeda traka ispitivanog soja sa rasporedom traka koje daju referentni sojevi dolazi se do zaključka o pripadnosti određenoj vrsti. Radi poređenja u ovom eksperimentu su korišćene totalne DNK izolovane iz referentnih sojeva BCCM i NRRL kolekcije koji su već okarakterisani kao *L. paracasei* subsp. *paracasei*, sojevi referentni za vrstu *L. casei* koji pripadaju ATCC kolekciji, kao i

sojevi referentni za vrstu *L. acidophilus* koji pripadaju ATCC, NCDO kolekciji i jedan komercijalni soj (Slika 8A i 8B).



Slika 8 – Rep-PCR-om umnoženi fragmenti korišćenjem (A) $(GTG)_5$ prajmera i (B) BoxA1R prajmera i totalne DNK izolovane iz sojeva: 2. BGBUK2-16, 3. LMG13552, 4. B4564, 5. BGHN14, 6. LMG10774, 7. LMG11459, 8. BGSJ2-8, 9. BGSJ2-81, 10. B4560, 11. ATCC334, 12. ATCC393, 13. NCDO1748, 14. V74, 15. ATCC4356, 1. i 16. "Gene Ruler™" 100 bp DNA Ladder.

Na osnovu dobijenih rezultata je zaključeno da je grupa *L. casei* / *L. paracasei* veoma heterogena kada se analizira raspored i intenzitet traka dobijen korišćenjem $(GTG)_5$ prajmera. Rezultati dobijeni za soj BGSJ2-8 i BGSJ2-81 korišćenjem $(GTG)_5$ prajmera pokazuju da raspored traka odgovara rasporedu traka koje su dobijene za referentne sojeve iz grupe *L. paracasei* subsp. *paracasei* LMG11459, B4564 i B4560. Ta slika je manje heterogena kada se analiziraju rezultati dobijeni korišćenjem BoxA1R prajmera gde svi pripadnici ove dve vrste daju skoro identičan raspored traka. Na osnovu rezultata dobijenih nakon rep-PCR-a sojevi BGSJ2-8 i BGSJ2-81 se mogu okarakterisati kao vrsta *L. paracasei* subsp. *paracasei*.

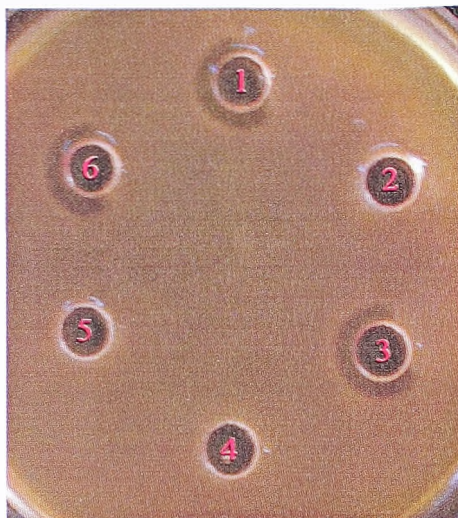
S obzirom na veliku heterogenost u grupi *L. casei* / *L. paracasei*, stalne promene kada je u pitanju savremena sistematika BMK, a posebno sistematika roda *Lactobacillus* za definitivnu determinaciju soja BGSJ2-8 i BGSJ2-81 urađeno je umnožavanje 16S rDNK

PCR-om korišćenjem totalne DNK izolovane iz soja BGSJ2-8 i BGSJ2-81 kao matrice i prajmera P1_{16S} i P2_{16S} koji su dizajnirani na osnovu konzerviranog regiona gena za 16S rRNK roda *Lactobacillus*. Kao produkt amplifikacije dobijen je fragment očekivane dužine od 1047 bp koji je nakon prečišćavanja sekvenciran (Macrogen's sequencing service, Seul, Koreja). Upoređujući rezultat dobijen sekvenciranjem sa NCBI bazom podataka dobijen je rezultata koji je pokazao da 16S rRNK soja BGSJ2-8 pokazuje identičnost od 99% sa istim regionom poreklom iz vrsta *L. paracasei* / *L. casei* / *L. zae* čime je dodatno potvrđena determinacija soja urađena klasičnim i molekularnim metodama.

2. PROIZVODNJA BAKTERIOCINA

BMK koje sintetišu bakteriocine su široko rasprostranjene u prirodi. S obzirom da bakteriocini mogu da inhibiraju rast i različitih patogenih bakterija koje izazivaju kvarenje hrane ili zdravstvene probleme ljudi, sve veća je njihova primena kao prirodnih konzervanasa ili probiotika (Cotter *et al.*, 2005a). Bakteriocini koje sintetišu BMK su supstance proteinske prirode sa baktericidnom ili bakteriostatskom aktivnošću, koja je ograničena na blisko srodne vrste (Tagg *et al.*, 1976).

Preliminarni eksperimenti testiranja antimikrobne aktivnosti soja BGSJ2-8 na standardnim indikatorskim sojevima *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NS1 i *Lactobacillus plantarum* A112 su pokazali da izolat ima sposobnost sinteze antimikrobnog jedinjenja. Dalja analiza je podrazumevala korišćenje većeg broja indikatorskih sojeva s obzirom da je iz literature poznato da se na taj način može ne samo odabrati najbolji senzitivni soj već ovakav pristup daje mogućnost da se utvrdi da li soj sintetiše jedan ili više bakteriocina (Lozo *et al.*, 2004). Za dalju analizu antimikrobne aktivnosti soja BGSJ2-8 odabran je senzitivni soj *Lactobacillus paracasei* BGBUK2-8 zato što su zone inhibicije rasta ovog soja bile najveće pa se anitmikrobna aktivnost može lako pratiti. Antimikrobna aktivnost soja BGSJ2-8, se zadržava i kada se supernatant neutrališe ili tretira katalazom čime je potvrđeno da ova inhibitorna aktivnost ne potiče ni od mlečne kiseline niti od vodonik peroksida. Proteinska priroda inhibitorne supstance potvrđena je testom sa pronazom E na petri šolji. U prisustvu kristala pronaze u blizini bunarčića dolazi do pojave karakterističnog polumesečastog izgleda zone inhibicije usled odsustva antimikrobne aktivnosti u blizini pronaze, koja degraduje proteine, bakteriocine (Slika 9). Ovaj test je potvrdio da soj BGSJ2-8 sintetise bakteriocin, nazvan BacSJ.



Slika 9 – Sposobnost sinteze bakteriocina soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 i njegovih derivata. Prekonoćna kultura: 1. BGSJ2-8; 2. BGSJ2-82; 3. BGSJ2-81; 4. BGSJ2-83; 5. BGBUK2-8, negativna kontrola; 6. BGSJ2-8B5 transformanta.

2.1 Ekstrahromozomalna lokacija gena za sintezu bakteriocina BacSJ

Na osnovu dosadašnjih istraživanja pokazano je da se geni za sintezu i imunost na bakteriocine koje sintetišu BMK mogu nalaziti kako na hromozomu (Quadri *et al.*, 1995; Diep *et al.*, 1996; Kawaii *et al.*, 1998) tako i na bakterijskim plazmidima (Quadri *et al.*, 1995; Kanatani *et al.*, 1995; Leer *et al.*, 1995; Kojić *et al.*, 2006). Gubitak sposobnosti sinteze bakteriocina je osobina koja se lako prati u eksperimentu čišćenja plazmida ako su genetičke determinante smeštene na njima.

Metodom izolovanja velikih plazmida iz laktobacila utvrđeno je da soj BGSJ2-8 i njegov derivat BGSJ2-81 poseduju jedan plazmid, nazvan pSJ2-8 veličine oko 15 kb. Da bi utvrdili da li se geni za sintezu i imunost na bakteriocin BacSJ nalaze na tom plazmidu rađeno je čišćenje plazmida istovremenim tretiranjem povišenom temperaturom, (42°C) i subletalnom koncentracijom antibiotika novobiocina, (8 µg/ml). Nakon čišćenja plazmida iz soja BGSJ2-8, od 100 analiziranih kolonija izolovane su 22 kolonije, a kod derivata BGSJ2-81, 68 kolonija koje su izgubile sposobnost sinteze bakteriocina. U prvom slučaju frekvencija čišćenja plazmida je 22%, a u drugom slučaju 68%. Za dalji rad izabrani su soj BGSJ2-8 (BasSJ⁺, BacSJ^{lm}, Agg⁺), njegov spontani derivat BGSJ2-81 (BasSJ⁺, BacSJ^{lm}, Agg⁻), i derivati dobijeni čišćenjem plazmida BGSJ2-82 (BacSJ⁻, BacSJ^{lm}, Agg⁺) i BGSJ2-83 (BacSJ⁻, BacSJ^{lm}, Agg⁻). Bakteriocinskim testom, difuzionim metodom u bunarčićima,

pokazano je da derivati BGSJ2-82 i BGSJ2-83 ne daju zonu inhibicije rasta indikatorskog soja čime je potvrđeno da su ovi derivati izgubili sposobnost sinteze bakteriocina BacSJ (Slika 9). Kada su dobijeni derivati korišćeni kao senzitivni sojevi u bakteriocinskom testu za delovanje soja BGSJ2-8 mogla se uočiti svetla zona inhibicije rasta što ukazuje da su dobijeni derivati pored gubitka sposobnosti sinteze BacSJ izgubili i imunost na njega. Upoređivanjem plazmidnih profila odabranih derivata uočeno je da derivatima koji su izgubili sposobnost sinteze i imunost na bakteriocin BacSJ nedostaje plazmid pSJ2-8 (Slika 10). Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da se geni koji su odgovorni za sintezu i imunost na BacSJ nalaze na plazmidu pSJ2-8 dok kada je u pitanju agregacioni fenotip to najverovatnije nije slučaj.



Slika 10 – Elektroforeza plazmida na 1% agaroznom gelu soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 i njegovih odabranih derivata izolovanih po proceduri koju su opisali O'Sullivan i Klaenhammer: 1. BGSJ2-8, 2. BGSJ2-82, 3. BGSJ2-81, 4. BGSJ2-83.

3. BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOCINA

Za sve biohemijske testove korišćeni su supernatanti šesnaestočasovnih prekonoćnih kultura soja BGSJ2-8 i njegovog derivata BGSJ2-81, osim ako drugačije nije naglašeno.

3.1. Termostabilnost, pH opseg aktivnosti i inaktivacija bakteriocina BacSJ

Bakteriocin BacSJ spada u grupu termostabilnih bakteriocina, s obzirom da zadržava antimikrobnu aktivnost nakon inkubacije 60 min na 100°C. BacSJ koji sintetiše soj BGSJ2-8 zadržava ~70% aktivnosti inkubiranjem 18 min na 118°C, dok BacSJ koji

sintetiše njegov derivat BGSJ2-81 u tim uslovima gubi svoju aktivnost. Inkubiranjem oba uzorka 15 min na 121°C aktivnost se potpuno gubi. Kod uzoraka koji su čuvani na +4°C i -20°C tokom tri meseca konstatovana je nepromenjena antimikrobna aktivnost za BacSJ dobijen od soja BGSJ2-8. Međutim, BacSJ poreklom od soja BGSJ2-81 inkubiran na +4°C i -20°C zadržava svoju aktivnost samo tokom dva meseca.

Testiranjem bakteriocinske aktivnosti na različitim pH vrednostima pokazano je da BacSJ zadržava svoju aktivnost u opsegu pH vrednosti od 2 do 11. Aktivnost bakteriocina bila je najveća na pH 5. Na pH 12 BacSJ je zadržavao svoju aktivnost do 15 min inkubacije nakon čega se ona gubi i više se ne može obnoviti i nakon ponovnog podešavanja pH vrednosti na 7.

Uzorak bakteriocina izložen dejstvu različitih proteolitičkih enzima (pronaza E, proteinaza K, pepsin i tripsin) potpuno je gubio antimikrobnu aktivnost čime je potvrđena proteinska priroda antimikrobne supstance koju sintetishe soj BGSJ2-8. Testiranjem uticaja enzima kao što su: lizozim, DNaza i RNaza pokazano je da ovi enzimi nemaju uticaja na bakteriocinsku aktivnost (Tabela 4).

Tabela 4 – Uticaj različitih enzima na bakteriocinsku aktivnost bakteriocina BacSJ izražena kroz veličinu zone inhibicije rasta indikatorskog soja BGBUK2-8

	Aktivnost BacSJ*
Bez enzima	4
Pronaza E	–
Proteinaza K	–
Pepsin	–
Tripsin	–
Lizozim	4
DNaza	4
RNaza	4

*širina zone inhibicije data je u milimetrima.

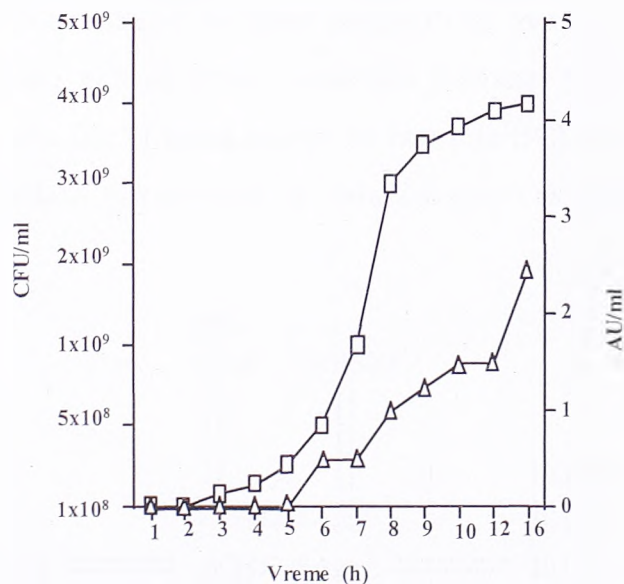
3.2. Uticaj katjona, redukujućih agenasa i filtracije kroz bakteriološke filtre na aktivnost bakteriocina BacSJ

Nakon tretmana bakteriocinskog uzorka različitim katjonima Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , K^{+} i Na^{+} u koncentracijama od 20 mM i trajanju od 1 h inhibitorna aktivnost bakteriocina BacSJ je ostala nepromenjena. Takođe, nije dolazilo do promene u aktivnosti pri tretmanu bakteriocina 10 mM helirajićim agensom EDTA ili redukujućim agensom ditiotreitolum.

Rezultat filtracije kroz dva različita tipa bakterioloških filtera pokazao je da nakon filtracije kroz celuložnoacetatni filter aktivnost ostaje nepromenjena za razliku od filtracije kroz nitrocelulozni filter gde dolazi do gubitka 50% aktivnosti. Do delimične inaktivacije molekula bakteriocina dolazi, verovatno, usled adsorpcije dela bakteriocinskih molekula na nitrocelulozni filter.

3.3. Kinetika sinteze bakteriocina BacSJ

Sineza bakteriocina BacSJ praćena je u bogatom MRS medijumu nakon svakog sata u toku 24 h na temperaturi od 30°C. Kolićina sintetisanog bakteriocina je izražena u arbitrarnim jedinicama (AU). Proizvodnja bakteriocina BacSJ poćinje nakon trećeg sata rasta bakterijske kulture BGSJ2-8 na 30°C. Sinteza bakteriocina BacSJ je najintenzivnija između 10 i 16 h inkubacije. Vreme u kome poćinje sinteza bakteriocina BacSJ se poklapa sa poćetkom eksponencijalne faze rasta, a maksimum sinteze sa prelazom iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta bakterija (Slika 11).

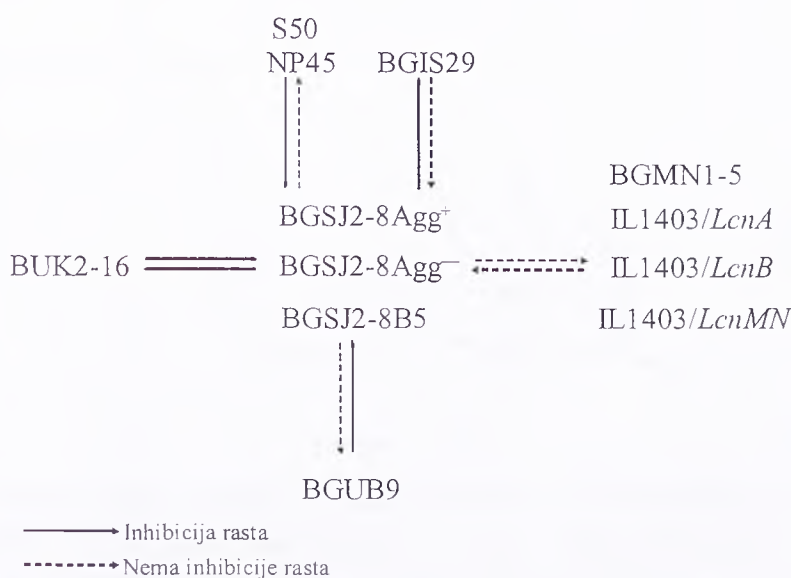


Slika 11 – Sinteza bakteriocina BacSJ soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 na 30°C u MRS medijumu u zavisnosti od faze rasta; Δ - AU/ml; \square - CFU/ml.

3.4. Antimikrobni spektar delovanja bakteriocina BacSJ

Bakteriocin BacSJ uglavnom inhibira rast sojeva iz grupe *Lactobacillus* pa se može svrstati u grupu bakteriocina sa relativno uskim spektrom delovanja. Pokazano je njegovo inhibitorno dejstvo na rast sojeva *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-8, BGKP20, BGLI4, BGLI15, BGHN14, BGCG31, BGPKM13, BGPV2-40, BGPV2-45a, *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 i *Lactobacillus plantarum* A112. Od analiziranih sojeva iz roda *Lactococcus*, bakteriocin BacSJ deluje na sojeve, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-596 i BGIS29 i *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NS1.

Testom unakrsne inhibicije ispitano je međusobno delovanje različitih BMK proizvođača bakteriocina. Rezultati su pokazali da bakteriocin BacSJ pokazuje inhibitorno dejstvo na sojeve koji pripadaju rodu *Lactobacillus* i na samo jedan soj iz roda *Lactococcus* (Slika 12). Ovo je još jedna potvrda uskog spektra delovanja ovog bakteriocina. S obzirom da postoji unakrsna inhibicija između soja *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16 i BGSJ2-8 možemo zaključiti da ova dva soja sintetišu različite bakteriocine i da između njih ne postoji unakrsna imunost. Soj BGUB9 deluje na soj BGSJ2-8 dok bakteriocin BacSJ nema uticaja na rast soja BGUB9. Interesantno je da od svih testiranih proizvođača bakteriocina iz roda *Lactococcus* bakteriocin BacSJ deluje samo na soj BGIS29.

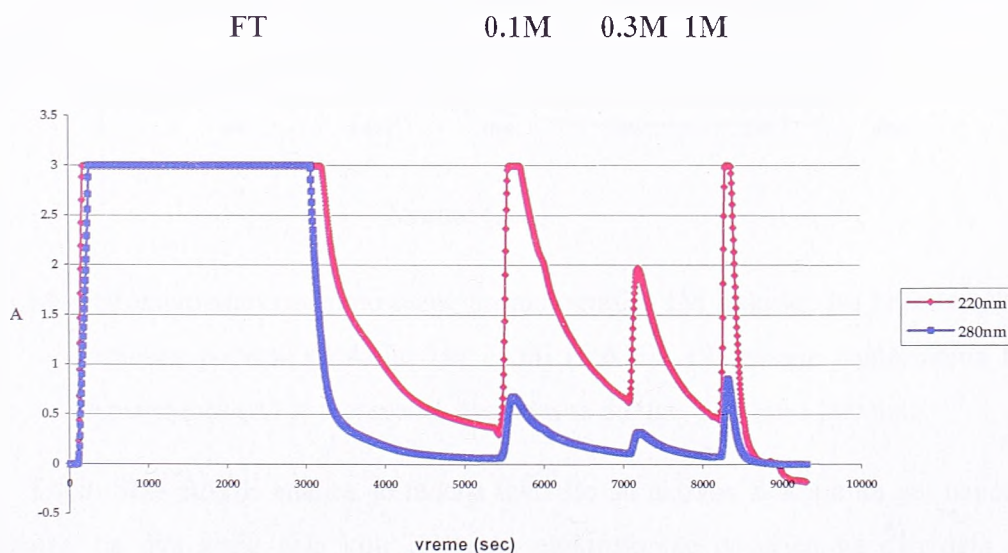


Slika 12 – Šematski prikaz unakrsne aktivnosti i imunosti između različitih sojeva proizvođača bakteriocina.

4. IZOLOVANJE BAKTERIOCINA BacSJ

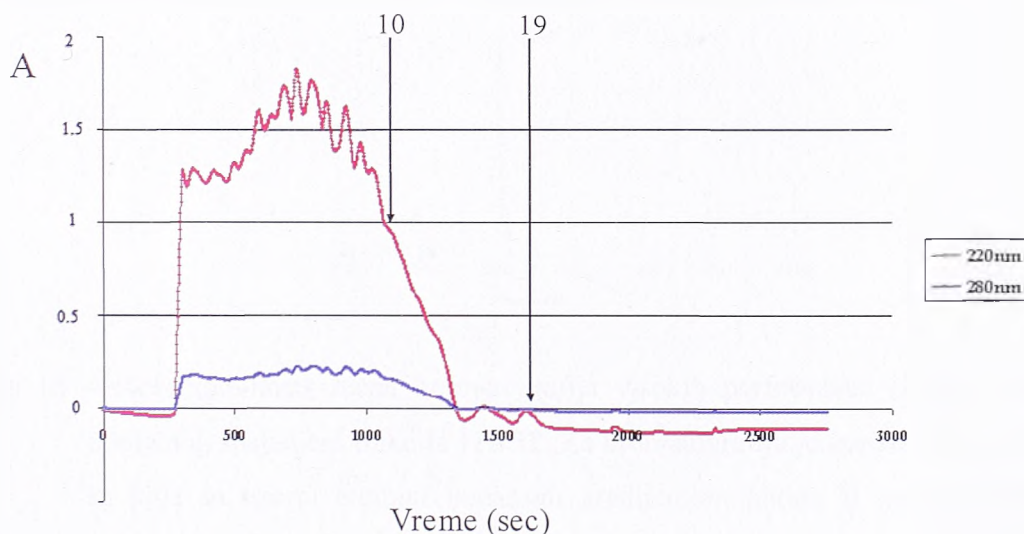
Bakteriocini koje sintetišu BMK su najčešće amfipatični ili hidrofobni peptidi katjonske prirode. Oni se međusobno razlikuju po svojoj molekulskoj masi, aminokiselinskom sastavu, pI vrednosti, ukupnom pozitivnom naelektrisanju i posttranslacionoj modifikaciji određenih aminokiselina. Postojanje ovakvih 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, a zatim slede različite kombinacije jonoizmenjivačke hromatografije, gel filtracije i reverzno-fazne tečne hromatografije visokih performansi (HPLC).

Izolovanje bakteriocina BacSJ je rađeno iz supernatanta šesnaestočasovne prekonocne kulture čiji je pH podešen na 4. U prvom koraku izolovanja korišćena je katjonska jonoizmenjivačka hromatografija (Slika 13). Uzorak je nanet na ekvilibrisanu SP-Streamline kolonu i nakon elucije step gradijentom 0.1M, 0.3M i 1 M NaCl dobijeni eluati su testirani na prisustvo bakteriocinske aktivnosti. Analiza uzoraka difuzionim metodom u bunarčićima na indikatorski soj BGBUK2-8 je pokazala prisustvo bakteriocinske aktivnosti u prekonocnoj kulturi, supernatantu, 0.3M i 1M frakciji. Sve dobijene zone su bile osetljive na delovanje pronaze E što potvrđuje prisustvo proteinske komponente odgovorne za antimikrobnu aktivnost, bakteriocina BacSJ.



Slika 13 – Hromatogram katjonske jonoizmenjivačke hromatografija na SP Streamline koloni supernatanta prekonocne kulture *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. Apsorbanca (A) je merena na dve talasne dužine, 220 nm i 280 nm.

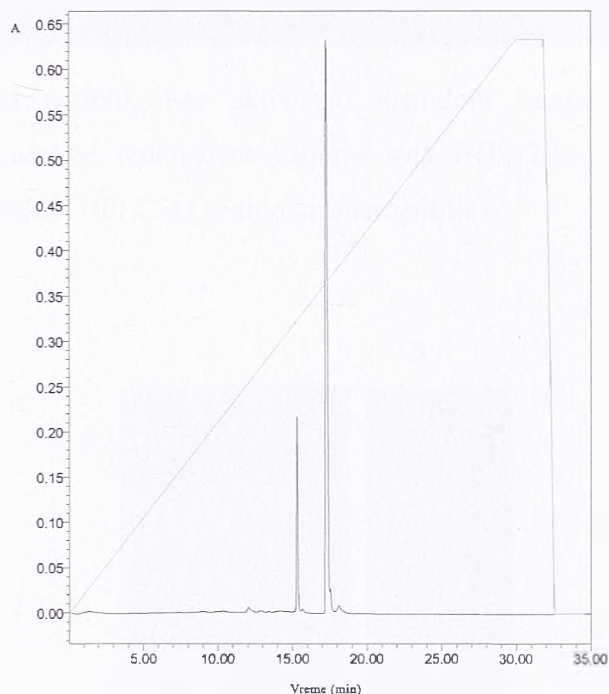
Najveća zona inhibicije rasta senzitivnog soja od 5 mm dobijena je za 1M frakciju što ukazuje da je u ovom koraku eluirana najveća količina bakteriocina BacSJ. Zona inhibicije rasta senzitivnog soja uzorkom eluiranim pri 0.3M NaCl je bila 2 mm pa ovaj uzorak nije uzet u dalje razmatranje. Izolovanje bakteriocina nastavljeno je iz 1M frakcije koja je naneta na reverzno-faznu Poros R1 kolonu (Slika 14). Za eluciju uzorka korišćen je linearni gradijent od 0 do 60% pufera B (0.09% TFA, 80% acetonitril), a zatim 100% pufera B. Frakcionim kolektorom skupljeno je 28 frakcija, zapremine 8 ml, koje su koncentrovane 10X pod vakuumom i pH im je podešen korišćenjem 1 M natrijum fosfatnog pufera pH 6.8. Sve frakcije su testirane difuzionim metodom u bunarčićima. U svim frakcijama od 10. do 19. dobijena je zona inhibicije rasta indikatorskog soja BGBUK2-8. Najveću zonu inhibicije od 4 mm dale su frakcije 10, 11 i 12. Frakcija 13 dala je zonu od 3mm, dok je u slučaju ostalih frakcije veličina zone bila 1 mm. U sledećem koraku sve aktivne frakcije su analizirane korišćenjem tricin-SDS PAGE.



Slika 14 – Hromatogram reverzno fazne hromatografije 1M frakcije. Na hromatogramu je označen početak (frakcija 10) i kraj (frakcija 19) elucije bakteriocina BacSJ. Apsorbanca (A) je merena na dve talasne dužine, 220 nm i 280 nm.

Tricin-SDS PAGE analiza je rađena tako što su aktivne frakcije na gel nanošene u duplikatu, na dva kraja gela koji je nakon elektroforeze podeljen na dva dela. Jedna polovina na kojoj se pored frakcija nalazio i proteinski marker je bojena komazi-plavim, a druga polovina gela je prelivena soft agarom inokulisanim indikatorskim sojem BGBUK2-8. Dobijeni rezultati su pokazali da su dve frakcije (11 i 12) davale jasnu zonu inhibicije

rasta indikatorskog soja. Frakcije 11 i 12 su spojene u jedan uzorak koji je u sledećem koraku dodatno prečišćen reverzno-faznom tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC) na C₁₈ koloni. Na kolonu je naneto 200 µl uzorka koji je zatim eluiran linearnim gradijentom od 0 do 100% pufera B (0.09% TFA, 70% acetonitril) u toku 30 min. Tok hromatografije praćen je UV detektorom na odabranoj apsorbanca od 220 nm. Eluati su skupljeni ručno u predelu pojave pika na hromatogramu (Slika 15).

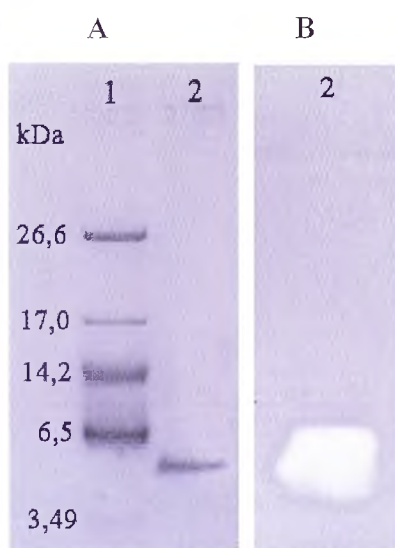


Slika 15 – Reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) uzorka dobijenog spajanjem frakcija 11 i 12. Za hromatografiju je korišćena C₁₈ kolona sa koje su uzorci eluirani linearnim gradijentom pufera B (zeleni linija na hromatogramu). ApSORBANCA (A) je merena na 220 nm.

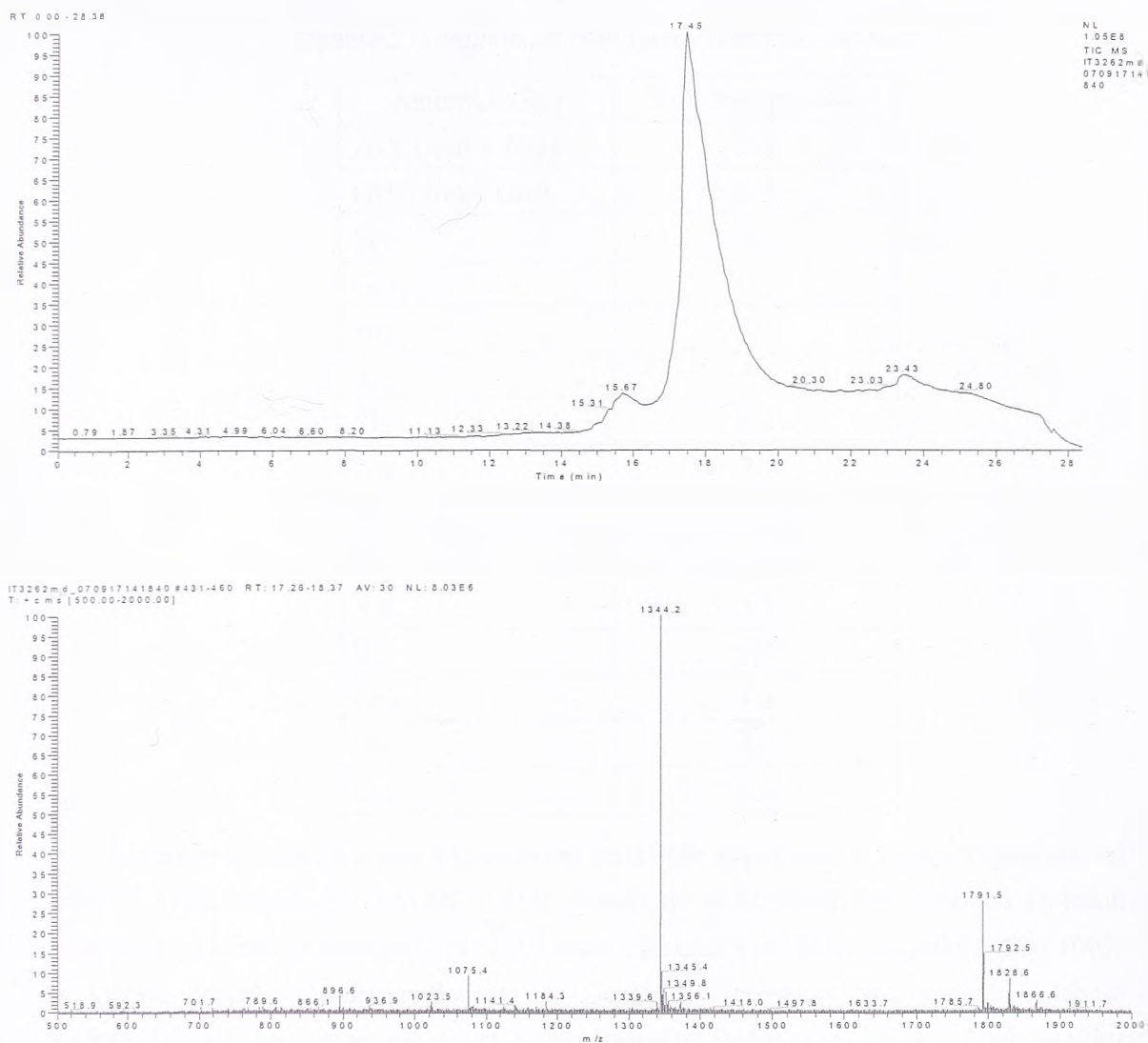
Dobijeni eluati su u potpunosti upareni pod vakuumom, resuspendovani u 40 µl MilliQ vode, pH im je podešen korišćenjem 1 M natrijum fosfatnog pufera pH 6.8 i testirani na prisustvo bakteriocinske aktivnosti metodom iskapavanja. Zonu inhibicije rasta indikatorskog soja dao je uzorak koji je odgovarao piku koji se javlja u 15 min hromatografije (Slika 16). Tricin-SDS PAGE analiza ovog uzorka je pokazala da se u uzorku nalazi jedan protein (Slika 17A) i da je on odgovoran za bakteriocinsku aktivnost koja dovodi do inhibicije rasta senzitivnog soja BGBUK2-8 (Slika 17B).



Slika 16 – Analiza antimikrobne aktivnosti metodom iskapavanja: 1. Supernatant šesnaestočasovne prekonoćne kulture soja BGSJ2-8; 2. Bakteriocin BacSJ, izolovan nakon HPLC-a (15 min hromatografije).



Slika 17 – Tricin SDS – PAGE prečišćenog bakteriocina BacSJ (A) i detekcija bakteriocinske aktivnosti na gelu (B). A: 1. Proteinski standard, 2. Proteinska traka bakteriocina BacSJ. B: Gel preliven soft agarom inokulisanim indikatorskim sojem BGBUK2-8 sa zonom inhibicije rasta u nivou proteinske trake bakteriocina BacSJ.



Slika 18 – Masena spektrometrija izolovanog bakteriocina BacSJ.

Dalja analiza uzorka vršena je masenom spektrometrijom koja je potvrdila da se u uzorku nalazi jedan prečišćen protein čija molekulska masa iznosi 5372 Da (Slika 18). Dobijeni protein, bakteriocin BacSJ, je podvrgnut daljoj analizi kojom je određen njegov aminokiselinski sastav (Tabela 5).

Na osnovu dobijenih rezultata aminokiselinskog sastava bakteriocina BacSJ pokazano je da je najzastupljenija aminokiselina glicin što je karakteristično za veliki broj do sada okarakterisanih bakteriocina. Procenat hidrofilnih aminokiselina je nešto veći i iznosi 39.1% u odnosu na hidrofobne čija zastupljenost iznosi 31.1%.

Tabela 5 – Aminokiselinski sastav bakteriocina BacSJ

Aminokiselina	Količina (pmol%)
AsX (Asn + Asp)	2,6
GIX (Gln + Glu)	6,4
Ser	7,0
Gly	23,1
His	4,5
Arg	6,1
Thr	6,4
Ala	7,4
Pro	7,0
Tyr	3,2
Val	5,5
Ile	5,4
Leu	4,6
Phe	5,0
Lys	6,1

Izolovan protein je zatim hidrolizovan enzimom tripsinom na manje fragmente od kojih je svaki analiziran MALDI – TOF masenom spektrometrijom. Dobijen je jedan fragment koji je nakon poređenja sa NCBI bazom podataka pokazivao identičnost od 100% sa jednim delom proteina acidocina M (GenBank Accession No., protein database BAB86318) čiji gen se nalazi na pLA103 plazmidu izolovanom iz soja *Lactobacillus acidophilus* TK8912 (Kanatani *et al.*, 1995). Region koji se poklapa sa delom bakteriocina BacSJ je od 33. do 46. aminokiseline u sekvenci acidocina M. Nakon toga je urađena teorijska digestija acidocina M tripsinom kojom je dobijen još jedan fragment koji je pokazivao identičnost sa drugim delom acidocina M. Pozicija ovog fragmenta je od 50. do 58. aminokiseline u aminokiselinskoj sekvenci acidocina M (Slika 19).

Acidocin M:

SRDLLLFSNF GGGAVLLSYK ELDTAKLQEI SGGYSYFGGS

NGYSWRDKRG HWHYTVTKGG FETVIGIIGD GWGSAGAPGP GQH

Slika 19 – Aminokiselinska sekvenca acidocina M. Plava i crvena boja obeležavaju aminokiselinske sekvence fragmenata koje su dobijene nakon analize BacSJ na MALDI – TOF aparatu. Crvenom bojom je označena sekvenca prvih deset aminokiselina dobijena posle N-terminalnog sekvenciranja.

Utvrđivanje N-terminalne sekvence prečišćenog bakteriocina BacSJ, korišćenjem metode Edmanove degradacije dobijena je sekvenca prvih deset aminokiselina ovog proteina: **YSYFGGSNGY**. Pretraživanje baze podataka NCBI/BLAST je još jednom ukazalo na postojanje homologije od 100% sa delom aminokiselinske sekvence acidocina M (Slika 19). Da bi smo potvrdili da li je bakteriocin BacSJ identičan sa proteinom acidocinom M ili su u pitanju samo sličnosti u određenim delovima pristupilo se genetičkoj karakterizaciji lokusa na kom se nalazi gen za sintezu bakteriocina BacSJ.

5. GENETIČKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOCINA BacSJ

5.1. Lokacija gena za proizvodnju bakteriocina BacSJ

Metodom čišćenja plazmida je potvrđeno da se geni za sintezu bakteriocina nalaze na plazmidu pSJ2-8 (vidi poglavlje 2, odeljak 2.1). Da bi se odredila lokacija gena za proizvodnju i imunost na bakteriocin BacSJ, plazmid pSJ2-8 je sečen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III i *Pst*I restrikcionim enzimima. Eluirani DNK fragmenti su ligirani sa vektorom pA13 sečenim odgovarajućim enzimima. Ligacionom smešom transformisane su kompetentne ćelije *E. coli* DH5a. Transformanti su selektovani rastom na čvrstoj LA podlozi u koju su prethodno dodati eritromicin (250 µg/ml) i X-gal (0.4%). Iz dobijenih belih, Em^r transformanata su izolovani plazmidi koji su restrikciono provereni. Plazmidi sa fragmentima očekivane veličine su elektroporacijom ubačeni u ćelije heterologog domaćina *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14, koji je senzitivan na delovanje BacSJ. Selekcija transformanata je rađena na čvrstoj MRS podlozi sa eritromicinom (5 µg/ml). Dobijeni Em^r transformanti su testirani na sposobnost sinteze bakteriocina BacSJ korišćenjem BGHN14 soja kao indikator soja. Proizvodnja bakteriocina je bila očuvana jedino u transformantima koji su imali plazmid pA13 sa kloniranim pSJ2-8 plazmidom u *Bam*HI restrikciono mesto (pB5). Dobijeni pB5 plazmid je korišćen za dalje analize.

5.2. Proizvodnja bakteriocina BacSJ u različitim domaćinima

Da bi se ustanovila proizvodnja bakteriocina u različitim domaćinima plazmid pB5 je korišćen za elektroporaciju homologog *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-83 i heterologog *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-596 domaćina, koji su senzitivni na delovanje bakteriocina BacSJ. Transformanti su selektovani na čvrstoj MRS odnosno GM17 podlozi sa eritromicinom (5 µg/ml). Sposobnost proizvodnje i imunost na bakteriocin BacSJ im je testirana difuzionim metodom u bunarčićima pri čemu je soj BGBUK2-8 korišćen kao

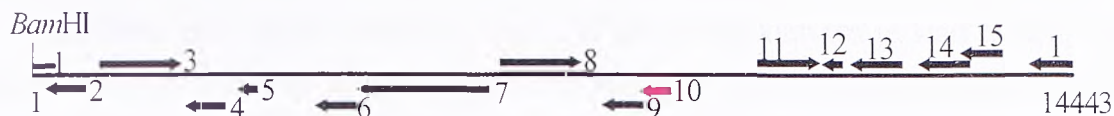
senzitivni soj. Transformanti su dobijeni u homologom domaćinu, označeni kao *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8B5, i svi su proizvodili i bili imuni na bakteriocin BacSJ što je ukazivalo na činjenicu da je kompletna genetička informacija za proizvodnju i imunost smeštena na pB5 tj. pSJ2-8 plazmidu. Pored toga proizvodnja bakteriocina kao i njegove karakteristike su potpuno odgovarale aktivnosti koju daje originalni soj, BGSJ2-8 (Slika 9 i 12). Činjenica da klonirani DNK fragment obezbeđuje ekstracelularni bakteriocin BacSJ kako u homologom, *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-83, tako i u heterologom, *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14, domaćinu ukazuje da se na njemu nalaze sve genetičke determinante potrebne za proizvodnju, imunost, obradu i eksport bakteriocina BacSJ.

5.3. Sekvenciranje pSJ2-8 plazmida

S obzirom da se kompletna genetička informacija za proizvodnju, imunost, obradu i eksport bakteriocina BacSJ nalazi na pSJ2-8 plazmidu veličine 14443 bp, određena je njegova nukleotidna sekvenca (Prilog 1). Sekvenciranje je vršeno "by primer walking" metodom u centru za sekvenciranje Macrogen's sequencing service, Seul, Koreja.

5.4. Kompjuterska analiza sekvence pSJ2-8 plazmida

Za kompjutersku analizu sekvence korišćen je program "DNA Strider", a za pretraživanje homologije sa već poznatim sekvencama u banci gena korišćen je "BLAST" program (Altschul *et al.*, 1997) dostupan na "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Korišćenjem "DNA Strider" programa sekvenca je analizirana u obe orijentacije. Na osnovu pretraživanja banke podataka okarakterisano je 15 potencijalnih otvorenih okvira čitanja (ORF). Analizom ORF-ova korišćenjem "BLAST" programa za većinu je dobijen određen stepen homologije sa dosada sekvenciranim, okarakterisanim ili potencijalnim genima, dok pet ORF-ova sadrži potencijalne gene koji kodiraju proteine nepoznate funkcije. Na slici 20 je prikazan redosled i orijentacija ORF-ova na linearnoj formi plazmida pSJ2-8 koja se dobije nakon digestije *Bam*HI enzimom. Za svaki ORF dat je početak i kraj i stepen homologije sa odgovarajućim genima čije je poreklo takođe naznačeno.



Slika 20 – Raspored i orijentacija ORF-ova na pSJ2-8 plazmidu veličine 14443 bp. Legenda: 1. Mobilizacioni protein, MobA, *L. plantarum* (296-13345 bp, 43%); 2. Mobilizacioni protein, MobC, *L. plantarum* (278-589 bp, 48%); 3. Transpozaza, *L. casei* ATCC 334, plasmid 1 (1103-1786 bp, 99%); 4. Protein nepoznate funkcije pLA103_10 (1895-2272 bp, 100%); 5. acidocin 8912 pLA103_09 (2603-2743 bp, 100%); 6. Pomoćni protein pLA103_08, skraćen (3493-4581 bp, 99%); 7. ABC transporter pLA103_07 (4592-6685 bp, 98%); 8. Transpozaza, *L. casei* ATCC 334, genom (6921-7937 bp, 99%); 9. Protein nepoznate funkcije pLA103_06 (8333-8644 bp, 99%); 10. Bakteriocin SJ, BacSJ pLA103_05 (8644-8850 bp, 99%); 11. Replikacioni protein, RepB (9772-10281 bp, 46%), *L. paracasei*; 12. Protein nepoznate funkcije (10706-10356 bp); 13. Replikacioni protein, RepB, *L. plantarum* (10960-11892 bp, 57%); 14. Protein nepoznate funkcije (12248-12871 bp); 15. Protein nepoznate funkcije (12853-13332 bp).

Na osnovu N-terminalne sekvence izolovanog bakteriocina BacSJ definisan je region koji kodira BacSJ na pSJ2-8 plazmidu. Ovaj region odgovara ORF10. Protein koji kodira ovaj ORF ima 68 aminokiselina. Uporednom analizom nukleotidne sekvence u bazi podataka pokazana je homologija ORF10 sa genom *acdM* na plazmidu pLA103 koji kodira protein acidocin M. Ova homologija se može uočiti kako na nukleotidnom tako i na aminokiselinskom nivou (Slika 21).

Acidocin M	TCTAGAGACCTATTATTATTTCTAATTTGGAGGAGGTGCTGTTTTGCTTAGTTATAAA	60
BacSJ	TCTAGAGATCTATTATTATTTCTAATTTGGAGGAGGTGCTGTTTTGCTTAGTTATAAA	60
Acidocin M	GAATTGGATACTGCAAAACTTCAAGAAATTTCCGGTGGATATAGCTATTTTGGAGTTCT	120
BacSJ	GAATTGGATACTGCAAAACTTCAAGAAATTTCCGGTGGATATAGCTATTTTGGAGTTCT	120
Acidocin M	AATGGCTATTCTTGGAGAGACAAGAGGGGTCATTGGCATTATACTGTTACCAAGGGTGGC	180
BacSJ	AATGGCTATTCTTGGAGAGACAAGAGGGGTCATTGGCATTATACTGTTACCAAGGGTGGC	180
Acidocin M	TTCGAAACCGTTATTGGAATAATTGGAGATGGCTGGGGTAGTGCTGGTGCACCAGGACCT	240
BacSJ	TTCGAAACCGTTATTGGAATAATTGGAGATGGCTGGGGTAGTGCTGGTGCACCAGGACCT	240
Acidocin M	GGGCAACATTAA	252
BacSJ	GGGCAACATTAA	252
BacSJ	MLSYKELDTAKLQEISGGYSYFGGSNGYSWRDKRGHWHYTVTKGGFETVIGIIGDGWGSAGAPGPGQH	
Acidocin M	LLSYKELDTAKLQEISGGYSYFGGSNGYSWRDKRGHWHYTVTKGGFETVIGIIGDGWGSAGAPGPGQH	

Slika 21 – Uporedna analiza nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci BacSJ i acidocina M.

Analizom nukleotidne sekvence *bacSJ2-8* gena okarakterisan je start kodon, ispred koga se nalazi potencijalno mesto za vezivanje ribozoma "ribosom binding site"- RBS, i -10 i -35 konzervirani promotorski regioni (Slika 22). Od 68 aminokiselina 18 čini lider peptid, a preostalih 50 aminokiselina ulazi u sastav zrelog bakteriocina. Baktericin, BacSJ ima lider peptid dvoglicinskog tipa što ukazuje da se njegova obrada i eksport vrše pomoći ABC transportera i pomoćnog proteina. Potencijalni geni za ove proteine su locirani nizvodno od *bacSJ2-8* gena. Aminokiselinska sekvenca lider peptida pokazuje prisustvo aminokiselina koje su konzervirane kod većine lider peptida bakteriocina klase II (Slika 23).

```

1      ATTACGCATTACCATATCAGTGCCTTGTGACAACATCAGGCCAGCTTTCCACCAGCCACTGC
61     TTAGTGATCAGAAATGGAAAAATAATTGTAGCTACAAGAGCAAAAAATATTAGCTATAGTC
121    TTTTTTTCGATCTTTATTCAAACATAAAATCCCCAGATAAGAAAGTTTGCATTAGTTTTTTC
181    ACGTTAAAGGGGGTTGACTTTTTTGGCATGTGTAATACTCTAGAGACCTATTATTATTTT
                                     -35                               -10

241    CTAATTTTGGAGGAGGTGCTGTTTTTGCTTAGTTATAAAGAATTGGATACTGCAAAACTTC
                                     RBS                               M L S Y K E L D T A K L

301    AAGAAATTTCCGGTGGATATAGCTATTTTGGAGGTTCTAATGGCTATTCTTGGAGAGACA
Q E I S G G Y S Y F G G S N G Y S W R D
361    AGAGGGGTCATTGGCATTATACTGTTACCAAGGGTGGCTTCGAAACCGTTATTGGAAATAA
K R G H W H Y T V T K G G F E T V I G I
421    TTGGAGATGGCTGGGGTAGTGCTGGTGCACCAGGACCTGGGCAACATTAATGTTTGGGAA
I G D G W G S A G A P G P G Q H *
```

Slika 22 – Nukleotidna sekvenca fragmenta od 480 bp koji sadrži strukturni gen za bakteriocin BacSJ, *bacSJ2-8*. Odgovarajuća aminokiselinska sekvenca je označena ispod nukleotidne sekvence. RBS, -10 i -35 sekvence promotora su podvučene. Vertikalna strelica označava mesto gde se vrši isecanje lider peptida.

BacSJ		M	L	S	Z	K	E	L	D	T	A	K	L	Q	E	I	S	G	G	-				
Acidocin 8912		M	I	S	S	H	Q	K	T	L	T	D	K	E	L	A	L	I	S	G	G	-		
Laktacin F		M	K	Q	F	N	Y	L	S	H	K	D	L	A	V	V	V	G	G	-				
Planataricin A	M	K	I	Q	I	K	G	M	K	Q	L	S	N	K	E	M	Q	K	I	V	G	G	-	
Sakacin A		M	N	N	V	K	E	L	S	M	T	E	L	Q	T	I	T	G	G	-				
Sakacin 674/SakacinP		M	E	K	F	I	E	L	S	L	K	E	V	T	A	I	T	G	G	-				
Laktocin 705α		M	D	N	L	N	K	F	K	K	L	S	D	N	K	L	Q	A	T	I	G	G	-	
Laktocin 705β	M	E	S	N	K	L	E	K	F	A	N	I	S	N	K	D	L	N	K	I	T	G	G	-

Slika 23 – Uporedna analiza aminokiselinskih sekvenci lider peptida BacSJ i drugih bakteriocina klase II. Aminokiseline koje su zaokružene su identične kod analiziranih bakteriocina. Ove aminokiseline pokazuju visok procenat konzerviranosti kod lider peptida ovog tipa.

Stop kodon za *bacSJ2-8* gen je deo start kodona za ORF9 koji sadrži potencijalni gen koji kodira protein nepoznate funkcije. Njegova neposredna lokacija uz *bacSJ2-8* gen ukazuje da je moguća uloga ovog proteina da obezbeđuje imunost na bakteriocin BacSJ. Međutim, rezultat dobijen transformacijom soja *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14

delom plazmida koji sadrži ORF9 i ORF10 je pokazao da ORF9 nije gen za imunost na BacSJ. Dobijeni transformanti korišćeni kao indikatorski sojevi za delovanje bakteriocina BacSJ su bili senzitivni na BacSJ. Nizvodno od *bacSJ2-8* gena, udaljen 1959 bp se nalazi ORF7 koji kodira ABC transporter. Šesti ORF, ORF6, lociran 4063 bp od stop kodona *bacSJ2-8* gena kodira pomoćni protein. Za ORF5, koji je udaljen 5901 bp od stop kodona *bacSJ2-8* gena je pokazano da kodira strukturni gen za bakteriocin acidocin 8912, *acdT* gen (Kanatani *et al.*, 1995). Analiza ORF5 sa nuleotidnom sekvencom *acdT* gena i njegove okoline, sa plazmida pLA103, pokazuje da je ona u potpunosti očuvana kako promotorski region tako i sekvenca koja sledi posle gena. ORF koji je orjentisan konvergentno u odnosu na *bacSJ2-8* gen i nalazi se 6372 bp od njegovog stop kodona je ORF4 koji kodira protein nepoznate funkcije.

Za ovaj region pSJ2-8 plazmida i ORF-ove koje sadrži ustanovljen je visok stepen homologije i identičan raspored gena sa delom pLA103 plazmida. Homologija se odnosi na region koji počinje oko 1000 bp uzvodno od *bacSJ2-8* gena, a završava se neposredno posle ORF4. Međutim, uočeno je da se u okviru ovog dela na plazmidu pSJ2-8 nalazi region od 1192 bp koji ne poseduje homologiju ni sa jednim delom na pLA103 plazmidu. Interesantno je da taj region čini deo između ORF9 i ABC transportera i da je upravo to razlika koja dovodi do veće udaljenosti ABC transportera kod *bacSJ2-8* gena u odnosu na njegovu udaljenost od *acdm* gena na pLA103 plazmidu. ABC transporter je od stop kodona *acdm* gena udaljen 767 bp, a od stop kodona *bacSJ2-8* gena 1959 bp. U tom regionu pSJ2-8 plazmida, divergentno orjentisan nalazi se ORF8 za koji je pokazana homologija sa transpozazom lociranom u genomu soja *L. casei* ATCC 334.

Interesantno je da je pomoćni protein prisutan na pSJ2-8 plazmidu kraći za 97 aminokiselina u odnosu na onaj prisutan na plazmidu pLA103. Naime, na pSJ2-8 plazmidu nakon stop kodona za pomoćni protein došlo je do insercije sekvence od 345 bp koja je uokvirena duplikacijom koju čini 14 aminokiselina i koja pokazuje 87% sličnosti sa delom pomoćnog proteina na plazmidu pLA103. Sekvenca koja sledi nakon insercije na pSJ2-8 plazmidu pokazuje visok stepen homologije (99%) sa krajem pomoćnog proteina na plazmidu pLA103.

Na plazmidu pSJ2-8 nalazi se još jedna transpozaza, divergentno orjentisana u odnosu na *bacSJ2-8* gen, homologa transpozazi plazmida 1 soja *L. casei* ATCC 334 i čini ORF3. ORF2 i ORF1 pokazuju homologiju sa mobilizacionim proteinima MobC odnosno MobA, poreklom iz soja *L. plantarum*. Oba ORF-a su orjentisana konvergentno u odnosu

na *bacSJ2-8* gen. U okviru ORF1 se nalazi *Bam*HI restrikciono mesto koje je iskorišćeno za kloniranje pSJ2-8 plazmida. ORF11, orjentisan divergentno u odnosu na *bacSJ2-8* gen, pokazuje homologiju sa replikacionim proteinom, RepB soja *L. paracasei*. Homologija sa RepB proteinom soja *L. plantarum* 423 je ustanovljena za ORF13. ORF12, ORF14 i ORF15 kodiraju proteine nepoznate funkcije koji su kao i ORF13 orjentisani konvergentno u odnosu na *bacSJ2-8* gen.

5.5. Kompjuterska predikcija sekundarne strukture bakteriocina BacSJ

Korišćenjem "Phyre" programa (Bennett-Lovsey *et al.*, 2008) urađena je predikcija sekundarne strukture zrelog, obrađenog proteina bakteriocina BacSJ koji se dobija nakon isecanja lider peptida (Slika 24). Predviđena sekundarna struktura obuhvata jedan α -heliks i tri β -naborane ploče. Aminokiseline N-terminalnog dela učestvuju u formiranju α -heliks strukture dok aminokiseline C-terminalnog dela učestvuju u formiranju β -naboranih ploča. Aminokiseline koje ulaze u građu α -heliksa su odgovorne za interakciju sa ćelijskom membranom ciljne ćelije i formiranju pora na njoj. Predloženi mehanizam podrazumeva da hidrofobni deo heliksa interaguje sa lipidima u ćelijskoj membrani, dok je hidrofilni deo odgovoran za formiranje unutrašnjosti jonskog kanala ili pore. Za inicijalnu interakciju neophodno je i prisustvo odgovarajućeg receptora u membrani ciljne ćelije.



Slika 24 – Sekundarna struktura bakteriocina BacSJ dobijena kompjuterskom predikcijom korišćenjem "Phyre" programa. Crvenom bojom je obeležen α -heliks, žuta, zelena i plava boja obeležavaju β -naborane ploče.

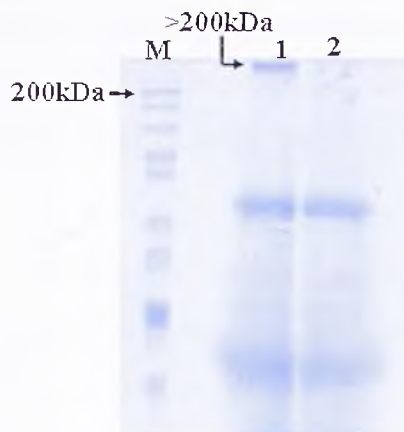
6. SPOSOBNOST AGREGACIJE

Do sada je okarakterisano više različitih proteina koji su odgovorni za pojavu agregacije kod laktobacila. Veličina tih proteina veoma varira i kreće se od 2 kDa kod soja *L. gasseri* (Boris *et al.*, 1997) do 56 kDa kod soja *L. reuteri* 1063 (Roos *et al.*, 1999). Osim toga ovi proteini se razlikuju po svojim karakteristikama, koje menjaju njihovu osetljivost na delovanje različitih faktora koji mogu da dovedu do gubitka sposobnosti agregacije ili koagregacije sa sojevima unutar iste vrste ili pripadnicima različitih vrsta.

Eksperimentima izolovanja, karakterizacije i determinacije soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 pokazano je da ovaj soj ima i svog derivata koji se dobija spontano, čije se kolonije po svom izgledu razlikuju na petri šolji i koji nema sposobnost agregacije, BGSJ2-81. U cilju detaljnije karakterizacije ove osobine ćelije koje su dobijene centrifugiranjem prekonoćne kulture soja BGSJ2-8 su oprane MilliQ vodom. Ovaj test je pokazao da nakon tri pranja ćelije gube sposobnost agregacije. Ako se takvim ćelijama doda supernatant izdvojen nakon prvog pranja one obnavljaju sposobnost agregacije. S druge strane, ćelije koje su poreklom od prekonoćne kulture soja BGSJ2-81, koje nemaju sposobnost agregacije, tu osobinu ne mogu da steknu ni kada im se doda supernatant dobijen pranjem ćelija koje imaju sposobnost agregacije. Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da je agregacija kod soja BGSJ2-8 najverovatnije rezultat aktivnosti dvokomponentnog sistema čija se jedna komponenta nalazi vezana za ćeliju, dok se druga oslobađa u medijum u kom soj raste.

Da bi smo utvrdili da li postoji razlika u proteinima koji se oslobađaju u medijum tokom rasta ova dva soja urađeno je izolovanje proteina iz supernatanta i analiza na SDS-PAGE. Proteini iz supernatanta prekonoćnih kultura soja BGSJ2-8 i BGSJ2-81 su precipitirani amonijum sulfatom sa 40% zasićenja. Dobijeni peleti su resuspendovani u 10 mM Tris-HCl puferu, pH 8.5. Analiza ukupnih proteina na SDS-PAGE je pokazala da postoji razlika između BGSJ2-8 i BGSJ2-81 soja, koja se ogleda u postojanju dodatne proteinske trake čija je molekulska masa veća od 200 kDa, kod soja BGSJ2-8 (Slika 25). Dobijeni rezultati ukazuju da je ovaj protein najverovatnije jedna od dve komponente odgovorne za sposobnost agregacije soja BGSJ2-8.

U sledećem koraku analiziran je uticaj različitih medijuma za rast bakterija, pH vrednosti i katjona na sposobnost agregacije kod soja BGSJ2-8. Variranjem koncentracije pojedinačnih jona utvrđeno je da samo Fe^{3+} joni utiču tako što indukuju sposobnost agregacije. Osim ovog faktora, za sve ostale analizirane faktore je pokazano da ne utiču na sposobnost agregacije kod soja BGSJ2-8.



Slika 25 – SDS-PAGE analiza proteina skinutih pranjem sa površine ćelija soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 i njegovog derivata BGSJ2-81; M: proteinski marker; 1. BGSJ2-8; 2. BGSJ2-81.

7. PROTEOLITIČKA AKTIVNOST

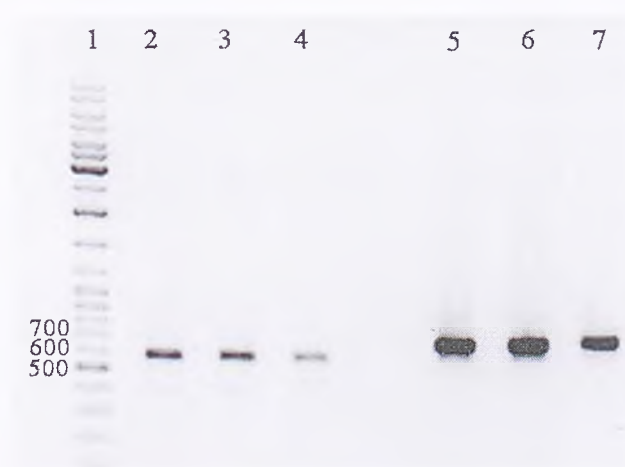
Bakterije roda *Lactobacillus* zahtevaju prisustvo velikog broja različitih hranljivih materija u podlozi za rast. Oni su auksotrofi za različit broj aminokiselina pa njihovo preživljavanje zavisi od prisustva složenog proteolitičkog sistema, koji im obezbeđuje neophodne aminokiseline i peptide za rast. Za testiranje proteolitičke aktivnosti sojeva BGSJ2-8 i BGSJ2-81, ćelije su gajene na MCA podlozi 48 h na 30°C. Proteolitička aktivnost je praćena preko degradacije α_{S1} , β i κ -kazeinske frakcije inkubacijom celih ćelija i supstrata, u natrijum fosfatnom puferu na 30°C u trajanju od 3 h. Degradacioni produkti su razdvojeni na SDS-PAGE (Slika 26).



Slika 26 – Proteolitička aktivnost sojeva *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 i BGSJ2-81 analizirana na SDS-PAGE u natrijum fosfatnom puferu; 1. β -kazein; 2. β -kazein + BGSJ2-8; 3. β -kazein + BGSJ2-81.

Dobijeni rezultati su pokazali da testirani sojevi poseduju proteolitičku aktivnost koja se ispoljava samo u degradaciji β -kazeinske frakcije. Osim toga primećeno je da je proteolitička aktivnost intenzivnija kod derivata BGSJ2-81 u odnosu na originalni soj BGSJ2-8 (Slika 26).

Nakon potvrde da soj BGSJ2-8 i njegov Agg^- derivat BGSJ2-81 poseduju proteolitičku aktivnost pristupilo se utvrđivanju tipa proteinaze prisutne u ovim sojevima. S obzirom da je PrtP proteinaza osim kod laktokoka nađena i kod nekih sojeva laktobacila vrste *L. paracasei* subsp. *paracasei* (Kojic *et al.*, 1991a) prvo je analizirano njeno prisustvo. Za ove potrebe korišćeni su prajmeri dizajnirani na osnovu sekvence intergenskog regiona *prtP* i *prtM* gena kao i prajmeri koji obuhvataju deo katalitičke trijade poreklom iz soja *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 (Kok *et al.*, 1988). Kao pozitivna kontrola korišćena je totalna DNK izolovana iz soja *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14 za koji je pokazano da poseduje PrtP proteinazu (Kojic *et al.*, 1991a). Utvrđeno je da je totalna DNK poreklom iz sojeva BGSJ2-8 i BGSJ2-81 u PCR-u dala proizvod iste veličine kao i totalna DNK poreklom iz soja *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14. PCR amplifikacijom sa prajmerima P_{15C}/P_{06C} utvrđeno je da totalna DNK sojeva BGSJ2-8 i BGSJ2-81 daje željenu traku od 560 bp, dok je korišćenjem prajmera PrtP700/PrtM700 dobijena traka očekivane veličine od 685 bp (Slika 27).



Slika 27 – PCR amplifikacija pomoću P_{15C}/P_{06C} (2, 3 i 4) i PrtP700/PrtM700 (5, 6 i 7) seta prajmera i totalne DNK izolovane iz BGSJ2-8 (2 i 5), BGSJ2-81 (3 i 6) i BGHN14 (4 i 7); 1. “Ready-Load™” 100 bp DNA Ladder.

Dobijeni rezultati ukazuju da prirodni izolat BGSJ2-8 i njegov spontani derivat BGSJ2-81 poseduje proteinazu PrtP tipa (Topisirovic *et al.*, 2006).

DISKUSIJA

DISKUSIJA

Imajući u vidu višestruki značaj i veoma široku primenu bakterijskih vrsta koje spadaju u grupu BMK, izučavanja njihovih karakteristika su važna kako sa fundamentalnog tako i sa aplikativnog stanovišta. Poslednjih godina, posebno je poraslo interesovanje za izučavanje karakteristika prirodnih izolata BMK. To su bakterije koje čine sastavni deo bakterijske mikroflore prehrambenog proizvoda, ali nisu bile sastavni deo starter kulture za dobijanje tog proizvoda ("Non Starter Lactic Acid Bacteria" – NSLAB). Dosadašnja istraživanja uglavnom su vršena na decenijama korišćenim industrijskim sojevima rodova *Lactococcus* i *Lactobacillus*, dok postoji mnogo manje podataka o prirodnim izolatima BMK. Već je pokazano da prirodni izolati imaju jedinstvene i raznovrsne karakteristike koje ih odvajaju od industrijskih sojeva. Osim toga prirodni izolati koji najčešće nisu vezani za sredinu bogatu različitim nutrientima imaju još uvek aktivne mnoge biosintetske puteve koji su kod industrijskih sojeva neaktivni ili su se potpuno izgubili. Smatra se da prirodni izolati mogu da ponude nove mogućnosti kako za fundamentalna istraživanja, ali što je još važnije i za moguću primenu u industriji (Ayad *et al.*, 2000; Kieronczyk *et al.*, 2003).

Laktobacili čine heterogenu grupu BMK, široko su rasprostranjeni i zahvaljujući svojim raznovrsnim karakteristikama našli su niz različitih primena. U ovom radu je okarakterisan prirodni izolat *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, za koji je pokazano da sintetiše bakteriocin, prtP proteinazu i pokazuje agregacioni fenotip. Sposobnost agregacije se spontano gubi pri svakoj rekultivaciji soja kada se dobija njegov prirodni Agg⁻ derivat, označen kao BGSJ2-81.

Nakon izolovanja i identifikacije soja klasičnim mikrobiološkim i biohemijskim metodama usledila je njegova dalja determinacija korišćenjem metoda molekularne determinacije. Naime, poslednjih godina se intenzivno razvijaju različite molekularno biološke tehnike za identifikaciju bakterija do nivoa vrste jer je uočeno da klasifikacija koja se bazira samo na fiziološkim i biohemijskim osobinama u velikom broju slučajeva daje dvosmislene i nedovoljno precizne rezultate (Dubernet *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2005). Klasifikacija vrsta u okviru roda *Lactobacillus* prolazi kroz stalne promene. One se posebno odnose na blisko srodne vrste za čiju identifikaciju se i dalje traže dovoljno pouzdane metode (Canchaya *et al.*, 2006). Jedna od takvih grupa je grupa *L. paracasei/L.*

casei/L. zeae. Kombinacijom klasičnih sa metodama molekularne determinacije zaključeno je da prirodni izolat BGSJ2-8 pripada vrsti *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

Biohemijska i genetička karakterizacija bakteriocina koje sintetišu BMK ima višestruki značaj. Izučavanje bakteriocina, a posebno njihovih imunih proteina je veoma važna fenotipska osobina koja može da se iskoristi za konstrukciju vektora, tzv. "food-grade" vektori. S obzirom da BMK imaju status GRAS ("generally recognized as safe") organizama ovakvi vektori su pogodni za primenu u prehrambenoj industriji, a na taj način se može kontrolisati dobijanje proizvoda odgovarajućeg kvaliteta. Međutim, da bi korišćenje genetički modifikovanih organizama bilo sigurno potrebno je da se food-grade vektori u potpunosti sastoje od delova plazmida BMK. Postoji više načina za konstrukciju ovih vektora, ali najčešće se primenjuje onaj u kom se kao selektivni marker koristi bakteriocinski imuni protein (Bron *et al.*, 2002; Takala *et al.*, 2002; Brede *et al.*, 2007).

Analizom antimikrobne aktivnosti soja *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 utvrđeno je da ovaj izolat sintetiše bakteriocin, označen kao BacSJ. Sposobnost sinteze poseduje i njegov derivat BGSJ2-81. Analizom plazmidnog sastava ustanovljeno je da oba derivata poseduju jedan plazmid, označen kao pSJ2-8. Kao rezultat eksperimenta čišćenja plazmida dobijena su još dva tipa derivate (Slika 9), a upoređivanjem, plazmidnih profila sva četiri derivata utvrđeno je da sojevima koji nemaju sposobnost sinteze i imunost na BacSJ nedostaje plazmid pSJ2-8 (Slika 10). Ovaj rezultat jasno ukazuje da su genetičke determinante koje kodiraju BacSJ locirane na ovom plazmidu. Dosadašnji rezultati su pokazali da se genetičke determinante za sintezu i imunost na bakteriocine mogu naći kako na bakterijskom hromozomu (Diep *et al.*, 1996; Jiménez-Díaz *et al.*, 1995; Quadri *et al.*, 1995; Kawaii *et al.*, 1998) tako i na plazmidima (Quadri *et al.*, 1995; Kanatani *et al.*, 1995; Leer *et al.*, 1995; Gajic *et al.*, 1999; Kojic *et al.*, 2006). Kada je u pitanju sposobnost agregacije genetičke determinante koje determinišu ovaj fenotip ne zavise od prisustva ili odsustva plazmida što ukazuje na njihovu hromozomsku lokaciju.

Bakteriocin BacSJ je termostabilan protein. Značajna karakteristika ovog bakteriocina sa stanovišta njegove moguće primene jeste i nepromenjen nivo antibakterijske aktivnosti stajanjem tri meseca na +4°C i -20°C, za BacSJ koji sintetiše soj BGSJ2-8, odnosno dva meseca za bakteriocin koji sintetiše derivat BGSJ2-81. Osim toga, uočeno da nakon inkubacije 18 min na 118°C BacSJ koji sintetiše izolat BGSJ2-8 zadržava 25% aktivnosti dok se ona potpuno gubi kod bakteriocina koji sintetiše derivate BGSJ2-81 (Lozo *et al.*, 2007). Smanjen stepen termostabilnosti bakteriocina koji je vezan za odsustvo

sposobnosti agregacije ovog soja ide u prilog teoriji o mogućoj vezi između ove dve fenotipske karakteristike. Ona se najverovatnije ne ogleda kroz uticaj na ekspresiju gena za bakteriocin već kroz zaštitini efekat koji ima prisustvo proteina odgovornog za agregaciju na površini ćelije i u medijumu.

Bakteriocin BacSJ je aktivan u širokom opsegu pH vrednosti. Ovakav opseg aktivnosti je ustanovljen za nizin (Hurst, 1981), bakteriocin S50 (Kojic *et al.*, 1991b), plantaricin 35d (Messi *et al.*, 2001), Bac501, LsbA i LsbB (Gajic *et al.*, 1999; Gajic *et al.*, 2003), Bac217 (Lozo *et al.*, 2004) i druge. Međutim, mnogo veći broj do sada okarakterisanih bakteriocina pokazuje aktivnost u uskom opsegu pH vrednosti ili im se aktivnost drastično smanjuje promenom optimalnog pH. U ovu grupu spadaju bakteriocini plantaricin F (Fricourt *et al.*, 1994), plantaricin UG1 (Enan *et al.*, 1996); bakteriocin koji sintetiše *Lactobacillus acidophilus* 30SC (Oh *et al.*, 2000), antifungalno antimikrobno jedinjenje koje sintetiše *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3 (Magnusson and Schnürer, 2001) i drugi.

Da bi se potvrdila proteinska priroda bakteriocina, BacSJ je tretiran različitim proteolitičkim enzimima (pepsin, tripsin, proteinaza K, pronaza E) koji su doveli do potpunog gubitka antimikrobne aktivnosti (Tabela 4). Ovo je važna karakteristika BacSJ jer ga čini bezbednim za upotrebu u proizvodima namenjenim ljudskoj ishrani. Osetljivost na iste proteolitičke enzime je pokazana za bakteriocin S50 (Kojic *et al.*, 1991b), Bac501, LsbA i LsbB (Gajic *et al.*, 1999; Gajic *et al.*, 2003), Bac217 (Lozo *et al.*, 2004) i druge. Nasuprot ovim bakteriocinima koje inaktivira veći broj proteolitičkih enzima, neki bakteriocini su osetljivi na manji broj proteinaza, kao u sličaju nizina koga inaktivira samo pronaza E i α -himotripsin (Hurst, 1981).

Sinteza bakteriocina BacSJ zavisi od faze rast soja *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. Sa početkom eksponencijalne faze rasta otpočinje sinteza bakteriocina, a svoj maksimum dostiže na prelazu iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta (Slika 11). Dobijeni rezultati su u korelaciji sa gotovo svim do sad okarakterisanim bakteriocinima (Kojic *et al.*, 1991b, Gajic *et al.*, 1999, Messi *et al.*, 2001; Lozo *et al.*, 2004; i drugi), a biološki smisao ovakve proizvodnje bakteriocina je u tome što se na taj način obezbeđuje maksimalna koncentracija bakteriocina kada je konkurencija za hranljive resurse sredine najveća. Osim toga naglo povećanje koncentracije bakteriocina omogućava njegovo efikasno delovanje na ciljne ćelije. Ovakav način proizvodnje obezbeđuje da ćelija proizvođač bakteriocina vrši tu proizvodnju onda kada za njom postoji stvarna potreba.

Spektar inhibitornog delovanja bakteriocina BacSJ je uzak i ogleda se u aktivnosti prema blisko srodnim vrstama (Slika 12). Ovaj rezultat je u korelaciji sa definicijom bakteriocina da su to mali, ribozomalno sintetisani peptidi ili proteini koji imaju uzak spektar antimikrobne aktivnosti koja je ograničena na blisko srodne vrste i prema kojoj soj proizvođač ima mehanizam specifične samozaštite (Jack *et al.*, 1995). Naime, za veliki broj bakteriocina je pokazano da su uskog spektra delovanja. Takvi su bakteriocin S50 (Kojic *et al.*, 1991b), LsbA i LsbB (Gajic *et al.*, 2003), i drugi. Širi spektar delovanja je utvrđen za pediocin AcH (Motlagh *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992), sakacin A (Holck *et al.*, 1992a); sakacin 674/sakacin P (Holck *et al.*, 1994; Tichaczek *et al.*, 1994), laktocin 705 (Cuozzo *et al.*, 2000) i druge. Za nizin je pokazano da može da inhibira rast *E. coli* i drugih Gram–negativnih bakterija, ako im je prethodno oštećena spoljašnja membrana (Stevens *et al.*, 1991). Sinergistički efekat delovanja bakteriocina i antimikrobnih jedinjenja eukariota se zasniva na sličnom mehanizmu. Antimikrobne komponente eukariota koje su širokog spektra delovanja deluju na Gram–negativne bakterije, a u prisustvu bakteriocina taj efekat je jači jer nakon oštećenja spoljašnje membrane i bakteriocin može da deluje na njih (Lüders *et al.*, 2003).

Intenzivna istraživanja bakteriocina BMK i njihova moguća primena u industriji dovela je do potrebe za razvijanjem metoda za brzo izolovanje veće količine bakteriocina. Bakteriocini kao mali, amfipatični ili hidrofobni peptidi, najčešće pozitivno naelektrisani su se pokazali kao mnogo teži za proces izolovanja od ostalih proteina. Ne postoji univerzalna metoda koja se može primeniti pri izolovanju bakteriocina već se ona utvrđuje empirijski. Prethodna biohemijska karakterizacija bakteriocina u velikoj meri olakšava taj posao. Naime, izolovanje bakteriocina treba raditi u momentu kada je njegova koncentracija u kulturi najveća, s obzirom da se pri svakom koraku izolovanja gubi određena količina materijala. Osim toga i mogućnost indukcije sinteze bakteriocina, proizvodnja bakteriocina u različitim medijumima posebno u bazalnom minimalnom medijumu, i druge karakteristike su važne pri odabiru tipa metode koja će se primeniti u izolovanju (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997).

Bakteriocin BacSJ je izolovan iz supernatanta šesnaestočasovne prekonoćne kulture korišćenjem katjonske jonoizmenjivačke hromatografije, reverzno-fazne i reverzno-fazne hromatografije visokih performansi (HPLC). Dobijeni uzorak je analiziran masenom spektrometrijom koja je potvrdila da je izolovan protein mase 5372 Da (Slika 18) (Lozo *et al.*, 2007). N-terminalnim sekvenciranjem uzorka dobijena je sekvenca prvih deset

aminokiselina koje su pretraživanjem baze podataka pokazale homologiju od 100% sa proteinom acidocinom M čiji gen je lociran na plazmidu pLA103 izolovanom iz bakterije *L. acidophilus* TK8912 (Kanatani *et al.*, 1995). Iako je ovaj rezultat ukazivao da je u pitanju isti protein, konstatovana je homologija samo sa jednim delom proteina acidocina M (Slika 19). Acidocin M je protein nepoznate funkcije, bez određenog start kodona i poreklom iz soja *L. acidophilus* TK8912.

Rezultati dobijeni metodom čišćenja plazmida ukazali su da se genetičke determinante za sintezu i imunost na bakteriocin BacSJ nalaze na plazmidu pSJ2-8. Kloniranjem pSJ2-8 plazmida u *Bam*HI restrikciono mesto u pA13 plazmidu, transformacijom homologog i heterologog domaćina, dobijeni su transformanti koji sintetišu bakteriocin i nisu osetljivi na njegovo delovanje što je ukazivalo da se na plazmidu pSJ2-8 nalazi kompletna genetička informacija za sintezu, imunost, obradu i eksport bakteriocina BacSJ. Plazmid pSJ2-8 je sekvenciran i urađena je kompjuterska analiza sekvence kojom je utvrđeno postojanje 15 potencijalnih otvorenih okvira čitanja (ORF) (Slika 20). Analizom ORF-ova "BLAST" programom (Altschul *et al.*, 1997), za šest je konstatovan visok stepen homologije sa genima koji su locirani na plazmidu pLA103, izolovanom iz soja *L. acidophilus* TK8912 (Kanatani *et al.*, 1995), dva ORF-a su pokazala 99% homologije sa transpozazama soja *Lactobacillus casei* ATCC 334, dok je za ostalih sedam ORF-ova ustanovljen niži stepen homologije sa poznatim proteinima ili kodiraju proteine nepoznate funkcije.

Uparednom analizom kompletne nukleotidne i aminokiselinske sekvence BacSJ i acidocina M potvrđena je njihova homologija (Slika 21). Međutim, acidocin M je protein za koji nije okarakterisan start kodon, a što je najvažnije nije pokazano da ima antimikrobnu, a ni neku drugu funkciju. Za *bacSJ2-8* gen je određen start kodon i konzervirane sekvence promotorskog regiona (Slika 22). Analiza aminokiselinske sekvence i pozicija N-terminalno sekvenciranih aminokiselina ukazuje na postojanje lider peptida dvoglicinskog tipa kod bakteriocina BacSJ. Strukturni gen za bakteriocin kodira preprotein koji sadrži karakterističan lider peptid koji se obrađuje i sekretuje pomoću odgovarajuće transportne mašinerije. Ona funkcioniše tako što prepoznaje odgovarajuće konzervirane sekvence u lider peptidu. Jedan tip lider peptida je karakterističan za nizin i druge lantibiotike dok je drugi, lider peptid dvoglicinskog tipa, karakterističan za bakteriocine klase II i još neke lantibiotike (Håvarstein *et al.*, 1995). Na osnovu analize lider peptida BacSJ i drugih bakteriocina klase II konstatovano je da on poseduje

konzervirane aminokiseline koje su neophodne za njegovo prepoznavanje i obradu od strane ABC transportera i pomoćnog proteina (Slika 23). Geni za ove proteine su locirani nizvodno od *bacSJ2-8* gena. Uloga ovih proteina je da vrše obradu i eksport bakteriocina koji se sintetišu sa lider peptidom dvoglicinskog tipa i bakteriocina sa drugačijim lider peptidom koji nije *sec*-zavistan (Håvarstein *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996). ABC transporter pokazuje homologiju kako sa ABC transporterom plazmida pLA103 tako i sa laktokokalnim ABC transporterima. Za pomoćni protein je pokazano da je kraći za 97 aminokiselina u odnosu na onaj koji se javlja na plazmidu pLA103. Osim toga usled ranije pojave stop kodona uočava se prisustvo insercione sekvence koja je uokvirena duplikacijom od 14 aminokiselina. Ove aminokiseline čine kraj pomoćnog proteina na pSJ2-8, a isto tako i početak sekvence koja je u svom nastavku pokazuje 99% homologije sa poslednjih 110 bp sekvence gena za pomoćni protein na pLA103 plazmidu (Kanatani *et al.*, 1995).

Sledeći ORF koji sledi posle *bacSJ2-8* gena kodira protein nepoznate funkcije. Geni koji obezbeđuju imunost za dati bakteriocin se kod većine bakteriocina klase II nalaze nizvodno, neposredno uz ili u istom operonu sa strukturnim genom za bakteriocin (Nes *et al.*, 1996). Ovi proteini imaju od 50 do 150 aminokiselina u svom sastavu i nizak stepen međusobne homologije. Neposredna lokacija ovog gena uz *bacSJ2-8* gen, kao i veličina proteina koji kodira, a koja iznosi 104 aminokiseline ukazuje na njegovu moguću ulogu u obezbeđivanju imunosti na BacSJ. Međutim, pokazano je da ovaj gen nije gen za imunost na BacSJ i da tu ulogu najverovatnije obavlja neki od gena koji kodiraju proteine nepoznate funkcije.

Interesantno je da je potpuno očuvana sekvenca koja sledi iza pomoćnog proteina, *acdT* gen koji kodira bakteriocin acidocin 8912 (Kanatani *et al.*, 1995). Za bakteriocin acidocin 8912 je utvrđena molekulska masa od 5200 Da SDS-PAGE analizom i 5400 Da HPLC analizom (Tahara *et al.*, 1992), 46 aminokiselina u zreom bakteriocinu i 20 aminokiselina u lider peptidu. BacSJ je protein od 5372 Da, 50 aminokiselina čini zreo protein, a 18 lider peptid. Između gena koji kodiraju ova dva bakteriocina nema homologije što zajedno sa ostalim karakteristikama ukazuje da se radi o dva različita bakteriocina. Osim toga izolovanje i purifikacija bakteriocina BacSJ su ponovljeni više puta i svaki put je dobijen protein sa istim karakteristikama. Na osnovu dobijenih rezultata sledi da se *acdT* gen u soju BGSJ2-8 ili ne eksprimira ili je njegova ekspresija nedovoljna da bi se detektovala i biva maskirana aktivnošću *bacSJ2-8* gena. Razlog za to može da

bude mutacija ili nedostatak gena za obradu, eksport ili regulaciju sinteze ovog bakteriocina na pSJ2-8 plazmidu. Iako je veliki deo plazmida pLA103 potpuno očuvan i prisutan na pSJ2-8 plazmidu, razlike postoje. Skraćen pomoćni protein na plazmidu pSJ2-8 može biti razlog za nemogućnost obrade i eksporta acidocina 8912 u soju *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. Osim toga region pSJ2-8 plazmida koji pokazuje homologiju sa delom pLA103 plazmida uvećan je za 1191 bp što utiče na lokaciju gena za ABC transporter na pSJ2-8 plazmidu. Ova nukleotidna sekvenca nema homologiju ni sa jednim delom plazmida pLA103, ali je homologa transpozazi iz genoma soja *L. casei* ATCC 334 (ORF8). Poslednja tri ORF-a na pLA103 identifikovana kao proteini nepoznate funkcije takođe nisu pokazala homologiju ni sa jednim delom pSJ2-8 plazmida. Možda baš neki od ovih proteina nepoznate funkcije ima ulogu u indukciji ekspresije *acdT* gena, a pošto nedostaju na pSJ2-8 plazmidu do te ekspresije ne dolazi. U prilog ovoj tezi su i rezultati koji su pokazali da je slaba proizvodnja bakteriocina penocina A kod soja *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745, koja gotovo da nije mogla da se detektuje klasičnim metoda, posledica "frameshift" mutacije u *penI* genu, koji kodira protein za indukciju sinteze bakteriocina. Restauracijom *penI* gena proizvodnja bakteriocina je aktivirana (Diep *et al.*, 2006).

Homologija između pSJ2-8 plazmida i drugih sekvenci dobijenih analizom pomoću "BLAST" programa (Altschul *et al.*, 1997) je pokazana i za divergentno orjentisanu transpozazu, ORF3 homologu još jednoj transpozazi soja *L. casei* ATCC 334. Postojanje transpozabilnih elemenata je odgovorno za rekombinaciju plazmida i procese integracije odgovarajućih sekvenci. Koliko je intenzivna razmena ovih genetičkih elementa vidi se i na osnovu postojanja homologih sekvenci koje se nalaze kod više različitih bakterijskih vrsta. Naime, transpozaza koju kodira gen u okviru ORF3 je nađena i na pCD01 plazmidu soja *Lactobacillus paracasei* NFBC338 (Desmond *et al.*, 2005). U okviru ORF3 se nalazi još jedna kraća sekvenca koja je homologa transpozazi sa pLA103 plazmida (pLA103_11) soja *Lactobacillus acidophilus* TK8912 (Kanatani *et al.*, 1995).

Za ORF 11 i ORF13 pokazana je homologija sa replikacionim proteinima soja *L. paracasei* odnosno *L. plantarum* 423. ORF1 je homolog mobilizacionom proteinu, MobA soja *L. plantarum*, dok je za ORF2 ustanovljena homologija sa MobC proteinom istog soja. Proteini neophodni za mobilizaciju genetičkog materijala su kodirani klasterom koji čine tri gena, *mobABC*. Članovi ove familije gena su široko rasprostranjeni kod različitih plazmida koji su nađeni kako kod Gram-pozitivnih tako i kod Gram-negativnih bakterija i

odgovorni su za proces transfera genetičkog materijala konjugacijom (Meyer, 2000). Osim toga, pokazano je da prisustvo Mob proteina na plazmidu može da omogući i horizontalni transfer gena bez njihove prethodne integracije u hromozom (Jandle and Meyer, 2006). S tim u vezi, prisustvo oba proteina na plazmidu pSJ2-8 je najverovatnije doprinelo transferu genetičkog materijala između različitih bakterijskih vrsta koji se sada uočava kroz postojanje homologih sekvenci na plazmidima prisutnim u sojevima *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 i *L. acidophilus* TK8912.

Kompletna nukleotidna sekvenca plazmida pSJ2-8 ne samo da je omogućila da se uoči delimična sličnosti između plazmida pSJ2-8 i pLA103 već je omogućila potpun uvid kako u prisustvo odgovarajućih gena tako i u razmenu genetičkog materijala koja je prisutna između bakterija iste ili različite vrste. Ovakva informacija je korisna i za buduće eksperimente funkcionalne analize prisutnih gena. U poslednjih pet godina je potpuno ili delimično sekvenciran veliki broj genoma BMK (Makarova *et al.*, 2006; Makarova and Koonin, 2007). U jednom broju tih genoma su identifikovani geni čija je moguća funkcija sinteza bakteriocina. Proizvodnja bakteriocina predstavlja sekundarni metabolizam s obzirom da ova osobina nije ključna za preživljavanje bakterije. Međutim, pošto su genetičke determinante za ovu osobinu često smeštene na mobilnim genetičkim elementima kao što su plazmidi ili traspozoni, dolazi do njihovog transfera u druge bakterije i na taj način se povećava mogućnost za njihovu mutaciju ili genetički rearanžman. U prilog tome govore rezultati dobijeni analizom 15 različitih sojeva *L. sake* koji ne sintetišu sakacin P i senzitivni su na njega, na prisustvo sekvenci koje su homologe operonu koji sadrži *spp* gen za ovaj bakteriocin. Kod svih analiziranih sojeva je potvrđeno prisustvo manje ili više mutiranog operona. Negde su bile prisutne tačkaste mutacije u strukturnom genu za bakteriocin, dok je kod drugih jedan ili više gena bilo deletirano (Møretro *et al.*, 2005). Homologija uočena između pSJ2-8 i pLA103 plazmida kao i između pSJ2-8 i pCD01 plazmida ukazuje na razmenu genetičkog materijala koja se najverovatnije dogodila između bakterija koje su nosile u sebi ove ekstrahromozomalne genetičke elemente. Tokom ovog procesa ne samo da je došlo do razmene genetičkog materijala nego i do njihovog genetičkog rearanžmana koji je imao za posledicu promene u ekspresiji nekih gena.

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.*, 1992a) 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 *et al.*, 2006; Makarova and 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 and Quadri, 2001).

Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da prirodni izolat *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 sintetiše nov bakteriocin, do sada neopisan u literaturi, označen kao BacSJ koji po svojim karakteristikama spada u bakteriocine klase II. Bakteriocin BacSJ je prvi okarakterisani bakteriocin koji sintetiše vrsta *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

Fenomen agregacije je veoma kompleksan s obzirom da obuhvata interakciju između bakterijske površine i molekula u spoljašnjoj sredini. Autoagregacija, formiranje agregata između sojeva iste vrste i koagregacija, formiranje agregata između sojeva različitih vrsta doprinosi zaštitnoj ulozi koju takvi sojevi obavljaju u urogenitalnom i gastrointestinalnom traktu (Boris *et al.*, 1997; Castagliuolo *et al.*, 2005) i omogućava adheziju ovakvih sojeva na mukozne površine (Jankovic *et al.*, 2003). Mada ima naučnika koji smatraju da fenomen adhezije obezbeđuju komponente koje čine površinu bakterija i da se one razlikuju od onih koje su odgovorne za sposobnost agregacije, drugi se slažu sa prethodno iznetim stavovima. Veza između agregacije i kolonizacije mukoznih površina je opisana za soj *L. crispatus* M247 u *in vitro* i *in vivo* esejima (Cesana *et al.*, 2001). Površinski protein Cpf,

okarakterisan kod soja *L. coryniformis* DSM 20001T, je odgovoran za sposobnost autoagregacije i koagregacije ovog soja. Osim toga za ovaj protein je pokazano da po svojim biohemijskim karakteristikama (procentualna zastupljenost hidrofobnih i hidrofilnih aminokiselina, pI vrednost, način izolovanja ovog proteina sa ćelijske površine i druge) veoma liči na proteine S-sloja (Schachtsiek *et al.*, 2004). Osim toga, imajući u vidu da između blisko srodnih bakterijskih vrsta postoji visok stepen kompeticije u zajedničkoj sredini proteini S-sloja su ti koji bi trebalo da doprinesu povećanju raznolikosti u bakterijskoj populaciji čime se povećava njihova šansa da prežive (Sára and Sleytr, 2000). Rezultati dobijeni za faktor koji doprinosi agregaciji ("aggregation promoting factors"), APF soja *L. gasseri* 4B2 su pokazali da on ima ključnu ulogu u određivanju ćelijskog oblika što ga dovodi u vezu sa proteinima S-sloja (Ventira *et al.*, 2002; Jankovic *et al.*, 2003). Uočene razlike u izgledu kolonija koje formira soj BGSJ2-8 u odnosu na kolonije soja BGSJ2-81 mogli bi da nastanu kao posledica prisustva odnosno odsustva odgovarajućeg APF ili razlike u proteinima S-sloja kod ovih sojeva. Međutim, istraživanja u ovoj oblasti su još uvek na početku i tek će budući rezultati doprineti da se potpuno objasni priroda i faktori koji su odgovorni za fenomen agregacije, adhezije i kolonizacije.

Sposobnost agregacije koja je uočena kod soja *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 je nestabilna karakteristika koja se spontano gubi pri svakoj rekultivaciji soja iz stoka sa -80°C na 30°C (Slika 7). Pojava spontanog gubitka sposobnosti agregacije je do sada okarakterisana kod soja *L. crispatus* M247 (Cesana *et al.*, 2001). Međutim, dodatna izučavanja su pokazala da gubitak agregacije kod mutanta *L. crispatus* MU5 ne nastaje usled gubitka ekspresije APF proteina ili mutacijom u *apf* genu, već je to najverovatnije posledica mutacije u drugom proteinu koji učestvuje u agregaciji, membranski lociranom receptoru za APF protein (Marcotte *et al.*, 2004). Nakon tri uzastopna pranja ćelija BGSJ2-8 MilliQ vodom one gube sposobnost agregacije. Ova sposobnost se može povratiti ako se ćelije ponovo resuspenduju u supernatantu izdvojenom nakon prvog pranja, što je pokazano i za *L. gasseri* 4B2 (Jankovic *et al.*, 2003). Kod spontanog derivata, BGSJ2-81 sposobnost agregacije se ne može izazvati kada se ćelije ovog soja resuspenduju u supernatant dobijen nakon prvog pranja BGSJ2-8 ćelija. Ovo ukazuje da sposobnost agregacije soja BGSJ2-8 najverovatnije omogućava dvokomponentni sistem koji se sastoji od ekstracelularno ekskretovanog proteina i određene komponente na ćelijskoj membrani, kao što je pokazano za soj *L. gasseri* 22459 (Boris *et al.*, 1997) i *L. crispatus* M247 (Marcotte *et al.*, 2004). U prilog ovoj tezi ide i rezultat dobijen analizom proteina prisutnih

u medijumu u kom su rasla ova dva derivata, a koji je pokazao da je kod soja BGSJ2-8 u odnosu na njegov derivat BGSJ2-81, prisutna dodatna proteinska traka, veća od 200 kDa (Slika 25) (Lozo *et al.*, 2007). Proučavanjem mehanizma autoagregacije kod laktobacila je pokazano da su za nju odgovorni proteini koji se nalaze u ćelijskoj kulturi (Reniero *et al.*, 1992; Roos *et al.*, 1999) i proteini koji se nalaze na površini ćelije (Boris *et al.*, 1998). Svi ovi rezultati ukazuju da je ova fenotipska karakteristika najverovatnije regulisana delovanjem više različitih komponenti.

Biohemijska karakterizacija APF proteina kod laktobacila različitog porekla je ukazala na uticaj različitih sredinskih faktora, kao što su pH sredine, prisustvo određenih jona, temperatura, različiti medijumi za rast bakterija i drugih na njihovo funkcionisanje (Reniero *et al.*, 1992; Boris *et al.*, 1997; Ventira *et al.*, 2002). Agregacione sposobnosti soja BGSJ2-8 se ne menjaju sa promenom medijuma za gajenje bakterija, pH sredine ili u prisustvu različitih koncentracija nekih katjona, osim jona gvožđa, za koje je pokazano da značajno stimulišu agregaciju. S obzirom da je za jone gvožđa uočeno da imaju različite efekte na više drugih ćelijskih funkcija ne može se sa sigurnošću tvrditi da je ovaj efekat vezan za fenomen agregacije. Promena pH vrednosti sredine u kojoj rastu bakterije utiče na autoagregaciju i koagregaciju soja *L. coryniformis* DSM 20001T koja je konstatovana samo u pH opsegu od 3.5 do 7.5. Niska pH vrednost sredine i rast u različitim medijumima utiče na stimulaciju agregacije kod soja *L. johnsonii* CRL 1294 (Juárez Tomás *et al.*, 2005). Međutim, prava uloga ovih faktora i njihova veza sa fenomenom agregacije tek treba da bude objašnjena.

Protein veći od 200 kDa (Slika 25) prisutan kod soja BGSJ2-8 je najveći protein koji je vezan za sposobnost agregacije. Do sada najveći okarakterisani protein kod laktobacila koji učestvuje u agregaciji jeste APF iz soja *L. reuteri* 1063, 56 kDa, DADE-box helikaza (Roos *et al.*, 1999). Za proteine koji su odgovorni za formiranje biofilma ("Biofilm Associated Proteins") – BAP, a ujedno učestvuju u fenomenu agregacije kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija je karakteristična velika molekulska masa (200 do 500 kDa) (Latasa *et al.*, 2005). Interesantno je da mutacije u genu koji kodira BAP protein dovode do promene ćelijske morfologije (Huber *et al.*, 2002) što je primećeno kod derivata BGSJ2-81. Sposobnost autoagregacije ne samo da može da dovede do povećane sposobnosti adhezije nego može da dovede i do formiranja biofilma, koji se javlja kao odgovor na različite uslove stresa ili kao sastavni deo transfera genetičkog materijala (Reniero *et al.*, 1992). Dodatna *in vitro* i *in vivo* izučavanja su neophodna da razjasne

kompleksnu ulogu autoagregacije kod soja *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 kao i vezu između sposobnosti agregacije sa drugim fenotipskim karakteristikama koje su prisutne kod ovog prirodnog izolata.

Većina BMK su višestruki aminokiselinski auktotrofi. S obzirom da količina slobodnih aminokiselina i peptida u mleku nije dovoljna za njihov optimalan rast sposobnost rasta ovih bakterija u mleku zavisi od njihove sposobnosti da razlažu kazein, glavni protein mleka. To im omogućava veoma razvijen proteolitički sistem koga čine različiti enzimi (proteinaze, peptidaze) i transportni sistemi uz čiju pomoć se kazein razlaže do oligopeptida i slobodnih aminokiselina koji se transportuju u ćeliju gde se nakon dodatne razgradnje koriste kao osnovni gradivni blokovi u procesima biosinteze proteina. Glavni enzim u ovom složenom sistemu je proteinaza. Do sada su okarakterisana četiri tipa proteinaznih gena kod laktobacila koji su označeni kao *prtP* (Kojic *et al.*, 1991a; Holck and Nes, 1992b), *prtB* (Gilbert *et al.*, 1996), *prtH* (Pederson *et al.*, 1999), i *prtR* (Pastar *et al.*, 2003).

Analiza proteolitičke aktivnosti celih ćelija soja *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 i njegovog prirodnog derivata BGSJ2-81 je pokazala da oni poseduje sposobnost da degraduje samo β -kazeinsku frakciju. Do sada je pokazano da se PrtP proteinaza nalazi osim kod laktokoka i kod nekih laktobacila vrste *L. paracasei* subsp. *paracasei* (Kojic *et al.*, 1991a). Za dodatnu potvrdu dobijenih rezultata urađena je PCR analiza intergenskog regiona *prtP* i *prtM* gena i dela koji obuhvata katalitičku trijadu poreklom iz soja *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Dobijeni rezultati ukazuju da soj BGSJ2-8 i njegov spontani derivat BGSJ2-81 poseduju PrtP proteinazu. Osim toga zapaženo je da je proteolitička aktivnost derivata BGSJ2-81 veća u odnosu na originalni soj BGSJ2-8 (Slika 26) (Lozo *et al.*, 2007). Različita dostupnost supstrata je moguć uzrok uočene razlike u proteolitičkoj aktivnosti. S obzirom da je sposobnost agregacije odnosno njeno odsustvo osobina koja je vezana za površinske osobine bakterija, a da se zna da su proteinaze ekstracelularni enzimi vezani za ćelijski zid bakterija, razlika prisutna kod ova dva derivata se najverovatnije odražava i na njihov proteolitički potencijal.

Uporedna analiza soja BGSJ2-8 i njegovog derivate BGSJ2-81 koji nema sposobnost agregacije je ukazala da faktor odgovoran za agregaciju utiče i na razliku koja je uočena u bakteriocinskoj i proteolitičkoj aktivnosti. Aktivnost i otpornost bakteriocina na delovanje različitih faktora je bila veća kod soja koji ima sposobnost agregacije. Nasuprot tome, proteolitička aktivnost je bila intenzivnija kod soja koji nema sposobnost agregacije.

ZAKLJUČCI

ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata predstavljenih u ovom radu mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Prirodni izolat BGSJ2-8 je okarakterisan kao vrsta *L. paracasei* subsp. *paracasei*.
2. Soj BGSJ2-8 sintetiše bakteriocin BacSJ. Baktericin BacSJ je termostabilan molekul, aktivan u širokom opsegu pH vrednosti, osetljiv na delovanje proteolitičkih enzima, uskog spektra delovanja ograničenog na blisko srodne vrste. Uočen smanjen stepen termostabilnosti BacSJ koji sintetiše derivat BGSJ2-81 govori o postojanju veze između sposobnosti agregacije i sinteze bakteriocina.
3. Za izolovanje bakteriocina BacSJ primenjena je procedura koju čini katjonska jonoizmenjivačka hromatografija, reverzno-fazna hromatografija i reverzno-fazna hromatografija visokih performansi (HPLC). Molekulska masa izolovanog peptida je određena masenom spektrometrijom i iznosi 5372 Da, a N-terminalnim sekvenciranjem određena je sekvenca prvih deset aminokiselina, YSYFGGSNGY.
4. Čišćenjem plazmida iz soja BGSJ2-8 i BGSJ2-81 dobijena su dva tipa derivata, derivat BGSJ2-82 (BacSJ⁻, BacSJ^{lm}, Agg⁺) i BGSJ2-83 (BacSJ⁻, BacSJ^{lm}, Agg⁻), na osnovu čega je zaključeno da se genetičke determinante za bakteriocin BacSJ nalaze na plazmidu pSJ2-8.
5. Plazmid pSJ2-8, veličine 14443 bp je kloniran i sekvenciran. Kompjuterskom analizom sekvence je pokazano da se na njemu nalaze geni za sintezu, imunost, obradu i eksport bakteriocina BacSJ. Plazmid pSJ2-8 sadrži 15 otvorenih okvira čitanja (ORF). Analizom ORF-ova "BLAST" programom, za šest je konstatovana homologija sa genima koji su locirani na plazmidu pLA103, izolovanom iz soja *L. acidophilus* TK8912, dva ORF-a su homologni genima soja *Lactobacillus casei* ATCC 334, četiri ORF-a pokazuju homologiju sa genima soja *L. plantarum* i *L. paracasei* dok preostala tri ORF-a sadrže potencijalne gene koji kodiraju proteine nepoznate funkcije.

6. Na osnovu N-terminalne sekvence bakteriocina BacSJ lociran je njegov strukturni gen, *bacSJ2-8*. BacSJ ima karakterističan lider peptid dvoglicinskog tipa, koji prepoznaju ABC transporter i pomoćni protein. Na plazmidu pSJ2-8 su okarakterisani ORF-ovi koji kodiraju gene homologe genima za ABC transporter i pomoćni protein, koji su najverovatnije odgovorni za obradu i eksport bakteriocina BacSJ.
7. Na osnovu biohemijske i genetičke analize može se zaključiti da soj *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 sintetiše nov bakteriocin, nazvan BacSJ koji po svojim karakteristikama pripada bakteriocinima klase II.
8. Soj *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 poseduje sposobnost agregacije koja se spontano gubi pri svakoj rekultivaciji, kada se dobija spontani derivat, BGSJ2-81. Promena medijuma za rast, pH sredine i različitih katjona ne utiče na sposobnost agregacije soja BGSJ2-8. Nakon tri pranja MiliQ vodom dolazi do gubitka sposobnosti agregacije, ali se ponovnim resuspendovanjem ćelija u supernatantu dobijenom nakon prvog pranja ona ponovo obnavlja. Resuspendovanje ćelija derivata BGSJ2-81 u istom supernatantu ne dovodi do pojave agregacije kod ovog derivata što ukazuje da je za ovu osobinu odgovorno postojanje dvokomponentnog sistema.
9. Analiza proteina supernatanta soja BGSJ2-8 i njegovog derivata BGSJ2-81 ukazala je na postojanje dodatne proteinske trake veće od 200 kDa kod soja BGSJ2-8. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je sposobnost agregacije kod soja BGSJ2-8 rezultat aktivnosti dvokomponentnog sistema. Protein veći od 200 kDa prisutan kod soja BGSJ2-8 je najveći protein koji je vezan za sposobnost agregacije kod laktobacila. Geni za ovu fenotipsku karakteristiku nisu locirani na plazmidu.
10. Soj *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 i njegov derivat BGSJ2-81 sintetišu PrtP proteinazu. Za derivat BGSJ2-81 je uočena intenzivnija protolitička aktivnost koja može da se javi kao posledica bolje dostupnosti supstrata.

LITERATURA

LITERATURA

- Adams, M. R. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 68: 171-178.
- Allison, G. F., Fremaux, C. and Klaenhammer, T. R. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176: 2235-2241.
- Altena, K., Guder, A., Cramer, C. and Bierbaum, G. 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2565-2571.
- 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 Res.* 25: 3389-3402.
- Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. and Lindgren, S.E. 1989. Production of broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2: 131-136.
- Ayad, E. H. E., Verheul, A., Wouters, J. T. M. and Smit, G. 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *Int. Dairy J.* 10: 169-179.
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I. F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1676-1682.
- Bennett-Lovsey R.M., Hebert A.D., Sternberg M.J.E. and Kelley L.A. 2008. Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins* 70, 3, 611-625.
- Bergey, D. 1986. Bergeys manual of systematic bacteriology Vol. 2. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.
- Berthier, F. and Ehrlich, S.D. 1999. Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 997-1007.
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A. and Tarvin, T. L. 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr. A.* 336: 93-104.

- Boot, H. and Pouwels, P. 1996. Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. *Mol. Microbiol.* 21: 1117-1123.
- Boris, S., Suarez, J. E. and Barbes, C. 1997. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J. Appl. Microbiol.* 83: 413-420.
- Boris, S., Suarez, J.E., Vazquez, F. and Barbes, C. 1998. Adherence of human lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect. Immun.* 66: 1985-1989.
- Brede, D.A., Lothe, S., Salehian, Z., Faye, T. and Nes, I.F. 2007. Identification of the propionicin F bacteriocin immunity gene (*pcfI*) and development of a food-grade cloning system for *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7542-7547.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P. and Osborn, R. W. 1995. Plant defenses: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant. Physiol.* 108: 1353-1358.
- Bron, P.A., Benchimol, M.G., Lambert, J., Palumbo, E., Deghorain, M., Delcour, J., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. and Hols, P. 2002. Use of the *alr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5663-5670.
- Brown, J.D. 1997. A rapid, non-toxic protocol for sequence ready plasmid DNA. Elsevier Trends Journals Technical Tips Online.
- Callewaert, R. and de Vuyst, L. 1999. Expanded bed adsorption as a unique unit operation for the isolation of bacteriocins from fermentation media. *Bioseparation* 8: 159-168.
- Canchaya, C., Claesson, M. J., van Sinderen, G. D. and O'Tool, P. W. 2006. Diversity of the genus *Lactobacillus* comparative genomics of five species. *Microbiology* 152: 3185-3196.
- Castagliuolo, I., Galeazzi, F., Ferrari, S., Elli, M., Brun, P., Cavaggioni, A., Tormen, D., Sturmiolo, G., Morelli, L. and Palù, G. 2005. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* 43: 197-204.
- Carolissen-Mackay, V., Arendse, G. and Hastings, J. W. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J Food Microbiol.* 34: 1-16.
- Cesana, C., Morelli, L., Alander, M., Siljander, T., Tuomola, E., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T., Vilpponen-Salmela, T. and von Wright, A. 2001. *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. *J Dairy Sci.* 84: 1001-1010.

- Chopin, A., Chopin, M. C., Moillo-Bat, A. and Langella, P. 1984. Two plasmid-determined restriction and modification system in *Streptococcus lactis*. Plasmid. 11: 260-263.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S., Henardez, P. E. and Nes, I. F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4321-4330.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Henardez, P. E., Nes, I. F. and Håvarstein, L. S. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. J. Bacteriol. 180: 1988-1994.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L. S., Holo, H., Henardez, P. E. and Nes, I. F. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. J. Bacteriol. 182: 6806-6814.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. 71: 1-20.
- Collins, C. H. and Lyne, P. M. 1976. Microbiological Methods. Butterworths and Co., London.
- Coenye, T. and Vandamme, P. 2003. Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: the lactic acid bacteria as a test case. Microbiology 149: 3507-3517.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. R. 2005a. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat. Rev. Microbiol. 3: 777-788.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. R. 2005b. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. Curr. Protein. Pept. Sci. 6: 61-75.
- Cuozzo, S. A., Sesma, F., Palacios, J. M. Ruiz Holgado, A. P. and 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 Microbiol. Lett. 185: 157-161.
- Dalgalarrondo, M., Chobert, J.-M., Dufour, E., Bertrand-Harb, C., Dumont, J.-P. and Haertle, T. 1990. Characterization of bovine-beta-lactoglobulin B tryptic peptides by reversed-phase liquid chromatography. Milchwissenschaft 45, 212-216.
- de Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23: 130-135.

- de Kwaadsteniet, M., Fraser, T., van Reenen, C. A. and Dicks, L. M. T. 2006. Bacteriocin T8, a novel Class IIa *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4761-4766.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E. and Hols, P. 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 159-184.
- Dellaglio, F., Felis, G. E. and Torriani, S. 2005. Is the genus *Lactobacillus* a single genus? In LAB8 Symposium on Lactoc Acid Bacteria. Egmond aan Zee, Netherlands: FEMS.
- Desmond, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. and Stanton, C. 2005. Sequence analysis of the plasmid genome of the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* NFBC338 which includes the plasmids pCD01 and pCD02. *Plasmid* 54: 160-175.
- de Vuyst, L. and Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194-199.
- Diep, D. B., Havarstein, L. S. and Nes, I. F. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178: 4472-4483.
- Diep, D. B., Axelsson, L., Grefslis, C. and Nes, I. F. 2000. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is temperature-sensitive process regulated by a pheromone regulatory system. *Microbiology*, 146: 2155-2160.
- Diep, D. B., Godager, L., Brede, D. and 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. and Nes, I. F. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *PNAS* 104: 2384-2389.
- Drider, Dj., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M. and Prévost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564-582.
- Dubernet, S., Desmasures, N. and Gueguen, M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.* 10: 271-275.
- Enan, G., el-Essawy, A.A., Uztendaele, M. and Debevere, J. 1996. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *Int. J. Food Microbiol.* 30: 189-215.

- Faye, T., Brede, D. A., Langsrud, T., Nes, I. F. and Holo, H. 2002. An antimicrobial peptide is produced by extracellular processing of a protein from *Propionobacterium jensenii*. *J. Bacteriol.* 184: 3649-3656.
- Franz, C.M., Worobo, R.W., Quadri, L.E., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. 1999. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE900. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2170-2178.
- Franz, C. M., van Belkum, M. J., Worobo, R. W., Vederas, J. C. and Stiles, M. E. 2000. Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. *Microbiology* 146: 621-631.
- Franke, K. M., Leenhouts, K. L., Haandrikman, A. J., Kok, J., Venema, G. and Venema, K. 1996. Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 178: 1766-1769.
- Fricourt, B.V. Barefoot, S.F., Testina, R.F. and Hayasaka, S.S. 1994. Detection and activity of plantaricin F an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish. *J. Food Prot.* 57: 698-702.
- Gajić, O., Kojić, M., Banina, A. and Topisirović, Lj. 1999. Characterization of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, a strain producing two bacteriocins, cell wall-associated proteinase and showing clumping phenotype. *Arch. Biol. Sci.* 51: 69-78.
- Gajic, O., Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, Lj., Kuipers, O. P. and Kok, J. 2003. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 34291-34298.
- Ganzle, M. G., Holtzel, A., Walter, J., Jung, G. and Hammes, W. P. 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4325-4333.
- Garrido, M. C., Herrero, M., Kolter, R. and Moreno, F. 1988. The export of the DNA replication inhibitor microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J* 7: 1853-1862.
- Gevers, D., Huys, G. and Swings, J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 31-36.

- Gilbert, C. Atlan, D., Blanc, B., Portalier, R. Germond, G. J., Lapierre, L. and Mollet, B. 1996. A new cell surface proteinase-sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. J. Bacteriol. 178: 3059-3065.
- Guyonnet, D., Fremaux, C., Cenatiempo, Y. and Berjeaud, J. M. 2000. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1744-1748.
- Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Hanahan, D. 1985. DNA Cloning (Glover, D.M., ed) IRL Press, Oxford, 1, 109.
- Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E. and Klaenhammer, T. R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 52: 384-387.
- Hastings, J. W., Sailor, M., Johnson, K., Roy, L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. J. Bacteriol. 173: 7491-7500.
- Håvarstein, L. S., Diep, B. D. and Nes, I. F. 1995. A Family of bacteriocin ABC transportes carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. Mol. Microbiol. 16: 229-240.
- Héchar, Y., Dérijard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. J Gen. Microbiol. 138: 2725-2731.
- Heng, N. C. K. and Tagg, J. R. 2006. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. Nature Rev. Microbiol. 4: doi:10.1038/nrmicro1273-c1.
- Hill, S. and Gasson, M. J. 1986. A qualitative screening procedure for the detection of casein hydrolysis by bacteria, using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Dairy Res., 53: 625-629.
- Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S. E., Aukrust, T. and Blom, H. 1992a. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. J. Gener. Microbiol. 138: 2715-2720.
- Holck, A. and Naes, H. 1992b. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151. J. G. Microbiol. 138: 1353-1364.

- Holck, A. L., Axelsson, L., Huhne, K. and Krockel, L. 1994. Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. FEMS Microbiol. Lett. 115: 143-9.
- 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. and Schrempf, H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. Norwich, UK, The John Innes Foundation.
- Hurst, A., 1981. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27: 85-123.
- Huber, B., K. Riedel, M. Köthe, M. Givskov, S. Molin, and L. Eberl. 2002. Genetic analysis of functions involved in the late stages of biofilm development in *Burkholderia cepacia* H111. Mol. Microbiol. 46: 411-426.
- Huis in't Veld, J. H., Havenaar, R. and Marteau, P. 1994. Establishing a scientific basis for probiotic R&D. Trends Biotechnol. 12: 6-8.
- Huttunen, E., Noro, K. and Yang, Z. 1995. Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. Int. Dairy J. 5: 503-513.
- Jandle, S. and Meyer, R. 2006. Stringent and relaxed recognition of *oriT* by related system for plasmid mobilization: implications for horizontal gene transfer. J. Bacteriol. 188: 499-506.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 59: 171-200.
- Jankovic, I., Ventura, M., Meylan, V., Rouvet, M., Elli, M. and Zink, R. 2003. Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. J. Bacteriol. 185: 3288-3296.
- Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Holo, H., Nes, I.F., Sletten, K.H. and Warner, P.J., 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4459-4463.
- Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. 167: 439-446.
- Juárez Tomás, M.S., Wiese, B. and Nader-Macías, M.E. 2005. Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. J. Appl. Microbiol. 99: 1383-1391.

- Kanatani, K., Tahara, T., Oshimura, M., Sano, K. and Umezawa, C. 1995. Cloning and nucleotid sequencing of the gene for acidocin 8912, a bacteriocin from *Lactobacillus acidophilus* TK8912. Lett.Appl.Microbiol. 21: 384-386.
- Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. In Bergeys manual of systematic bacteriology. Vol. 2, p. 1209-1234. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.
- Kawai, Y., Saito, T., Kitazawa, H. and Itoh, T. 1998. Gassericin A, an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C- terminal ends. Biosci.Biotechnol.Biochem. 62: 2438-2440.
- Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., Kitazawa, H., Yamazaki, Y., Tateno, Y., Itoh, T. and Saito, T. 2004. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. Appl.Environ.Microbiol. 70: 2906-2911.
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T. and Yvon, M. 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. Appl.Environ.Microbiol. 69: 734-739.
- Kleerebezem, M. and 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.
- Kleerebezem, M. and Hugenholtz, J. 2003. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. Curr.Opin.Biotechnol. 14: 232-237.
- Kojic, M., Fira, D., Banina, A. and Topisirovic, L. 1991a. Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. Appl.Environ.Microbiol. 57: 1753–1757.
- Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. and Topisirovic, L. 1991b. Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50. Appl.Environ.Microbiol. 57: 1835-1837.
- Kojic, M., Strahinic, I., Fira, D., Jovicic, B. and Topisirovic, L. 2006. Plasmid content and bacteriocin production by five strains of *Lactococcus lactis* isolated from semi-hard homemade cheese. Can. J. Microbiol. 52 : 1110-1120.
- Kok, J., Leenhouts, K.J., Haandrikman, A.J., Ledebor, A.M. and Venema, G. 1988. Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. Appl.Environ. Microbiol. 54: 231-238.

- Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P. and Poolman, B. 2000. Lactic acid bacteria: the bug of the new millennium. *Curr.Opin.Microbiol.* 3: 276-282.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Penades, J.R. and Lasa, I. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Mol.Microbiol.* 58: 1322-1339.
- Leer, R.J., van der Vossen, J.M., van Giezen, M., van Noort, J.M. and Pouwels, P.H. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 141: 1629-1635.
- Lozo, J., Vukasinovic, M., Strahinic, I. and Topisirovic, L. 2004. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *J.Food Prot.* 67: 2727-2734.
- Lozo, J., Jovcic, B., Kojic, M., Dalgalarrrondo, M., Chobert, J.M., Haertlé, T. and Topisirovic, L. 2007. Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. *Curr.Microbiol.* 55: 266-271.
- Lupski, J. R. and Weinstock, G. M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J.Bacteriol.* 174: 4525-4529.
- Lüders, T., Birkemo, G.A., Fimland, G., Nissen-Mezer, J. and Nes, I.F. 2003. Strong synergy between a eucaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1797-1799.
- Magnusson, J. and Schnürer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1-5.
- Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchin, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D.M. Goodstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J.H. Lee, I. Diaz-Muniz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer, and D. Mills. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 103:15611-15616.

- Makarova, K.S. and Koonin, E.V. 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J.Bacteriol.* 189: 1199-1208.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Marcotte, H., Ferrari, S., Cesena, C., Hammarström, L., Morelli, L., Pozzi, G. and Oggioni, M.R. 2004. The aggregation-promoting factor of *Lactobacillus crispatus* M247 and its genetic locus. *J.Appl.Microbiol.* 97: 749-756.
- Martínez, B., Fernández, M., Suárez, J.E. and Rodríguez, A. 1999. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology* 145: 3155-3161.
- Marugg, J.D., Gonzalez, C.F., Kunka, B.S., Ledebøer, 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. *Appl.Environ.Microbiol.* 58: 2360-2367.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J. and Berkeley, R.C.W. 1972. Methods for studying bacteriocins, p: 315-422. In J. R. Norris and D.W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, Vol. 7A. Academic Press Inc. New York.
- McAuliffe, O., Ross, R.P. and Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol.Rev.* 25: 285-308.
- Mendoza, F., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. 1998. Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*. *Appl.Environ.Microbiol.* 65: 618-625.
- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R. and Manicardi, G. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *Int.J.Food Microbiol.* 64: 193-198.
- Meyer, R. 2000. Identification of the *mob* genes of plasmid pSC101 and characterization of a hybrid pSC101-R1162 system for conjugal mobilization. *J. Bacteriol.* 182: 4875-4881.
- Miller, K.W., Schamber, R., Osmanagaoglu, O. and Raz, B. 1998. Isolation and characterization of pediocin Ach chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl.Environ.Microbiol.* 64: 1997-2005.
- Morelli, L. and Callegari, M.L. 1997. Surface layer of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892. *FEMS Microbiol Lett.* 20: 118-121.

- Moreira, J.L., Mota, R.M., Horta, M.F., Teixeira, S.M.R., Neumann, E., Nicol, J.R. and 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.
- Møretrø, T., Naterstad, K., Wang, E., Aasen, I.M., Chaillou, S., Zagorec, M. and Axelsson, L. 2005. Sakacin P non-producing *Lactobacillus sakei* strains contain homologues of the sakacin P gene cluster. *Res.Microbiol.* 156: 949-960.
- Motlagh, A.M., Bhunia, A.K., Szostek, F., Hansen, T.R., Johnson, M.C. and Raz, B. 1992. Nucleotid and amino acid sequence of pap-gene (pediocin Ach production) in *Pediococcus acidilactici* H. *Lett.Appl.Microbiol.* 15: 45-48.
- Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl.Environ.Microbiol.* 57: 114-121.
- Navarre, W.W. and Schneewind, O. 1999. Surface protein of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell envelope. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 63: 174-229.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113-128.
- Nes, I.F. and Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55: 50-61.
- Nes, I.F. and Johnsborg, O. 2004. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. 2004. *Curr.Opin.Biotechnol.* 15 :100-104.
- Netz, D.J., Sahl, H.G., Marcelino, R., dos Santos, N.J., de Oliveira, S.S., Soares, M.B., do Carmo de Freire Bastos and Marcelino, R. (2001). Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J.Mol.Biol.* 311: 939-949.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L.S., Sletten, K. and Nes, I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J.Bacteriol.* 174: 5686-5692.
- Nissen-Meyer, J., Larsen, A.G., Sletten, K., Daeschel, M and Nes, I.F. 1993. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1973-1978.

- Nissen-Meyer, J. and Nes, I.F. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch.Microbiol.* 167: 67-77.
- Oh, S., Kim, S.H. and Worobo, R.W. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J Dairy Sci.* 83: 2747-2752.
- O'Sullivan, D.J. and Klaenhammer, T.R. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* ssp. *Appl.Environ.Microbiol.* 59: 2730-2733.
- Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M. and Swings, J. 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiol.Lett.* 251(2): 267-271.
- Ouwehand, A. C. 1998. Antimicrobial components from Lactic Acid Bacteria. *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*, second edition. Edited by Salminen, S. and von Wright, A. III Series: Food science and technology Marcel dekker, USA, p: 139-160.
- Pastar, I., Tonic, I., Golic, N., Kojic, M., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Topisirovic, L., and Jovanovic, G. 2003. Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl.Environ.Microbiol.* 69: 5802-5811. Tabela
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R. and Lan, C.Q. 2008. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J.Appl.Microbiol.* 104: 1-13.
- Pederson, J.A., Mileski, G. J., Weimer, B.C. and Steele, J.L. 1999. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteins from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.* 181: 4592-4597.
- Quadri, L.E.N., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. 1994. Chemical and genetic characterisation of bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *Biol.Chem.* 269: 12204-12211.
- Quadri, L.E.N., Sailer, M., Terebiznik, M.R., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. 1995. Characterisation of the protein conferring immunity to antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J.Bacteriol.* 177: 1144-1151.
- Quadri, L.E.N., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. 1997. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J.Bacteriol.* 179: 6163-6171.

- Ra, R., Beerthuyzen, M.M., de Vos, W.M., Saris, P.E. and Kuipers, O.P. 1999. Effects of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. *Microbiology* 145: 1227-1233.
- Reniero, R., Cocconcelli, P., Bottazzi, V. and Morelli, L. 1992. High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *J.Gen.Microbiol.* 138: 763-768.
- Richard, C., Drider, D., Elmorjani, K., Marion, D. and Prevost, H. 2004. Heterologous expression and purification of active divericin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 186: 4276-4284.
- Ries, W., Hotzy, C., Schocher, I., Sleyter, U.B. and Sára, M. 1997. Evidence that a secondary cell wall polymer recognizes the N-terminal part of the S-layer protein from *Bacillus stearothermophilus* PV72/p2. *J.Bacteriol.* 179: 3892-3898.
- Rodriguez, J.M., Martinez, M.I. and Kok, J. 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.* 42: 91-121.
- Roos, S., Lindgren, S. and Jonsson, H. 1999. Autoaggregation of *Lactobacillus reuteri* is mediated by a putative DEAD-box helicase. *Mol.Microbiol.* 32: 427-436.
- Ryan, M.P., Jack, R., Josten, W., Sahl, H.G., Jung, G., Ross, R.P. and Hill, C. 1999. Extensive post-translational modification, including a serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lactacin 3147. *J.Biol.Chem.* 274: 37544-37550.
- Saavedra, L., Castellano, P. and Sesma, F. 2004. Purification of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Methods Mol.Biol.* 268: 331-336.
- Sánchez, J., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cinitas, L.M. and Hernández, P.E. 2007. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol.Lett.* 270: 227-236.
- Sanders, M. E. 2003. Probiotics: consideration for human health. *Nutr.Rev.* 61: 91-99.
- Sára, M. and Sleytr, U. B. 2000. S-layer proteins. *J.Bacteriol.* 182: 859-868.
- Sit, C.S. and Vederas, J.C. 2008. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem.Cell Biol.* 86: 116-123.

- Schachtsiek, M., Hammes, W.P. and Hertel, C. 2004. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001^T surface protein mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7070-7085.
- Schägger, H. and Jagow, G. 1987. Tricin-sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Schoeman, H., Viver, M.A. Du Toit, M., Dicks, L.M. and Pretorius, I.S. 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 647-656.
- Stein, T., Heinzmann, S., Dusterhus, S., Borchert, S. and Entian, K.D. 2005. Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes *spalFEG* in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *J. Bacteriol.* 187: 822-828.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. and Klaenhammer, T.R. 1991. Nisin treatment for the inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3613-3615.
- Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756.
- Tahara, T., Kanatani, K., Yoshida, K., Miura, H., Sakamoto, M. and Oshimura, M. 1992. Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1212-1215.
- Tahara, T., Oshimura, M., Umezawa, C. and Kanatani, K. 1996. Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM1132. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 130-135.
- Takala, T.M. and Saris, P.E. 2002. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisI*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 467-471.
- 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. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 460-468.

- Tichaczek, P.S., Vogel, R.F. and Hammes, W.P. 1994. Cloning and sequencing of *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH673. *Microbiology* 140: 361-367.
- Toba, T., Yoshioka, E. and Itoh, T. 1991. Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. *Lett.Appl.Microbiol.* 12: 106-108.
- Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. and Ike, Y. 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pY117. *J.Bacteriol.* 178: 1585-1593.
- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I. and Lozo, J. 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int.J.Food Microbiol.* 112: 230-235.
- Uteng, M., Hauge, H.H. Nissen-Meyer, J. and Fimland, G. 2002. Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Appl.Enviro.Microbiol.* 68: 952-956.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G. 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl.Enviro.Microbiol.* 55: 1187-1191.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Jeeninga, R.E., Kok, J. and Venema, G. 1991a. Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl.Enviro.Microbiol.* 57: 492-498.
- van Belkum, M.J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I.F., Konings, W.N. and Abee, T. 1991b. The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J.Bacteriol.* 173: 7934-7941.
- van Belkum, M.J., Kok, J. and Venema, G. 1992. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of *lcnB*, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl.Enviro.Microbiol.* 58: 572-577.
- van Belkum, M.J. and Stiles, M.E. 1995. Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3573-3579.
- van der Meer, Jr., Polman, J., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P. and de Vos, W. M. 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J.Bacteriol.* 175: 2578-2588.

- van Wely, K.H.M., Swaving, J., Freudl, R. and Driessen, A. J.M. 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol.Rev.* 25: 437-454.
- Varcamonti, M., Nicastro, G., Venema, G. and Kok, J. 2001. Proteins of the lactococcin A secretion system: *lcnD* encodes two in-frame proteins. *FEMS Microbiol.Lett.* 204: 259-263.
- Vaughan, E.E., Daly, C. and Fitzgerald, G.F. 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J.Appl.Bacteriol.* 73: 299-308.
- Venema, K., Haverkot, R.E., Abee, T., Haandrikman, A.J., leenhouts, K.J., de Leij, L., Venema, G. and Kok, J. 1994. Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol.Microbiol.* 14: 521-532.
- Ventura, M., Jankovic, I., Walker, C.D., Pridmore, R.D. and Zink, R. 2002. Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl.Environ.Microbiol.* 68: 6172-6181.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol.Cell.Biol.* 5: 25-40.
- Vidgren, G., Palva, I., Pakkanen, R., Lounatmaa, K. and Palva, A. 1992. S-layer protein gene of *Lactobacillus brevis*: cloning by polymerase chain reaction and determination of nucleotide sequence. *J.Bacteriol.* 174: 7419-7427.
- Walker, D.C., Aoyama, K. and Klaenhammer, T.R. 1996. Electrotransformation of *Lactobacillus acidophilus* A1. *FEMS Microbiol.Lett.*, 138: 233-237.
- Worobo, R.W., van Belkum, M.J., Saier, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J.Bacteriol.* 177: 3143-3149.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.



PRILOG

Nukleotidna sekvenca plazmida pSJ2-8

GGATCCGCGGCATTAAAGTCTTCAGGCCCGAAGGACTGAATGACACGAAA
GGCTTGC GTTTTTCCACGATTGCCGAATAGTTCACGGGTAGACCGCATCT
GACTGCGGACGTGGTTGAGATCAACGTTTTTCGCCACCACGGGCCACGGCT
CGATCCCTTAACTTAGCCACGAGCTCATCATCGACACCCTGCTCACGCAG
CCAGGCCCGATCCGTTTTCTTGAGGCGATTCTTACCTCCGCATAATTAA
TCGCGGCACCAGCACTCACTGCACGACTTAGCTTAACTGTTGCCATATCG
CATCAACCGCCTCTCGAATTTCTGCATTTGAGCTTTCTGTAAGGCAGTC
AAATCACCGGCGTTGGCGTGATAGGCCAGTTGGTTTAAAGTTGGTGCCAG
GTGACGCAGCGCTAAGTTGATGGTAACGGCGTCTTCGTGACTAAATTTAG
GTTTCGCGAAGTCGGGATTTTCATAGCCAAGGACTTGGCATAAGCACTCACG
GAAAGCCCGAAGGGTGCAGCTGATTTTTGAAGTTTCTCGTATTGGTCAAG
ATCAAGACGAAAATTTATTTGAGGACGTTTGGGGATCATGAAAACGAACC
ACCTCTCTATAGGGCCAATCCCCTCCCGATTTGGTCCGGCTATTGGCCAAG
ATTATGTAAGGCCAGACGATCGCGTTGCTCACGTCCAGTCTAACATAATT
TAACCGTAAGGCAAGCAGTTCATTTGCTAGACAATTAGGTATCGCTGCGC
TCCCTAATTGTCTAGCAAATGGCTTGTAAGAAGGGCGCTGTGCTCCCTC
TTAACTCCCCACAAAAATAGCCGTTACCGAACAGGTAACGGCTATGAAAA
ACGATTACGTTTTATTTGTAAAGGTAGACAGAAGAGGAAAAATAAAAGTA
CTGCCTATATTGCATAAGCTTTCACCAGCCACTACGGTAACGACTGTGAA
AACCGGCTGCGAGACATGGTTAACGGTGAATATACAAGAGAGGTTTTGCG
AGTATAACTGTCAAATAAAGTGATTTAGGAGGTCTGGTGCAAATTTTTCC
TCGCTGACTTGATTTTAGTATACTGGGTGCCAAGAAACGAGGGATTGCGC
GCATGAATCACTTTAAGGGACGCCACTTTCAAAGGACATCATCTTAGTA
GCCGTTGGCTACTATTTAGATTAGTCTCAGCTATCGTGACATCGTTGA
ATTGCTTCGGGATCGGGGTATCACTGTTTCATCACACCACGGTTCATGCGTT
GGGTTTCATCACTATGGCCCCATCTTTAAGACTCTATGGCGTCGGCATCAA
ACAGCTCACGCTAAAAGTTGGCGAATCGATGAGACCTATATTCGAGTTAA
AGGCCGTTGGGCCATTTGTATCGCGCTATTGACAGTAACGGTTTGACCA
TGGATTTTGAGCTACGAAAACACCGCGATTATACCGCATCCTATCACTTT
TTGAAGCGTCTCTTGACGACCAATGGTCCGCCTGATCGATTAGTCACTGA
TCAATATCGGGCAACACTGAAAGCAGTGAAGCACCTGATAAAGCAAGACT
ATTTGAGCAAATCAGCCCACCAATGTTCCAAATATCGAAATAATTTGATT
GAACAGGACCACCGATTCATTAACGTCATCGTGTCCGCTCAGCAAGCTT
TCAAAGCATTGCAACCGCTAGTGCAACGTTGAGCGGTGTGGAAATTTGTTT
ACGCAATACGCAAAAAGAACCCGACGAGAGTTAAGTCTCATCGGGTTCTCA
GTCGTGGACGAATTAGAAGCATTGTTAGCTGCATAACCTTCAACATAGGA
TCAATAGCCGGTTAGATGGTCATCTCTCAGACTGTTTGCACCAGATCCAA
AATCCGTGTTGAATTTATTGTTGCAATCTAGGCAATTGATGCAATTAATA
TATCCCTTTTAGACGTGCTTTTTTTAGGAACACTTTTTTCGACTTATCTGTT
TATATCTAACAACCCCATATAATTTATTGTAGGTAAGGCGAATTTATTTCT
CCACTCTTTAAATTTGTGCCTTTTTATTTGAATCGTGTGAACTTCATTTG
GCGAGGCTTACCTGATGAGTCTCTAGCAATTCCTTATATTCATAGCTTA
TCAATAATGTATTAGATATTGGAAAATTGATCGGGGAAATTTTACTAGGG
TTATCTATTTTTATATAATAATCGACTCCAGAATAATGATACCCAATAAT
GAAAGCTGAAAATATGATAACGCCTATTATGGTGGCAATCATATTTAAAT
GATAAAGTTTTGTAAGTATTCATATAATTAACCAAACGCAATTTTTTTGAA
GTTAGAAAATCAAATTA AAAACAATCTTTAGTCCGTTTCATTGATGTAAA
AAGGCCTTCTTTTTCTTACTAAATTTGGTATTTGCATAAAAATGCTATTTAG
TAAGAGAAACAGGCCTTATGAGTATTATCAACTTAGTTAAATGATCCAAA

ACAGAACTAATTAAGTGACCAGCAGCATTTAATTCAAATTACTGTTCTGA
ATGCCTTGGCCAAGAAGAACAGTAAAAATTTTAAATCCTGTTTGATCGGCA
ACGATTGCTTACGACAAAGAGTTCCAGGAATCACGTTTTTTAAGCGTACT
TTCTAAAAACCGTCAGTATAACGAAGGCTTTCCAGAAACCTTTCCAAAG
ACTTTTCCATGCATTAGTCGGGTAGTGCCTTTTCCCCCAGAAATTAATG
CTAATTCCTTATCAGTTAACGTTTTTTTGATGAGATGAAATCATCTAATTA
CCTCCCATTTTTTCGAAAATTTTTTAATAACACTATTACAGTATAGTCTAG
TTTTCATAAATGTCAATTAACGTTGTTTATAATTTGAATCGTGCTCTGA
AGTTTGTATTAGAGGAAATGCTACAATCTAGGAGAAGACATTGACTAGGT
TCTAATCCTGATTGAATAGCCGATCCCTCCAAAATTTGAAATACGTTTTTT
TGACCGGTAATGATTGAAACCTTGCCGGTCAAACCGTAGTGCAAAGACCG
AGCCTGTTGCTTACTGAGCGATACGTTTGCCGTCACCATAAAGAGATTGC
CATTTTTCGTAATAGCTGGGGCTGTATCGATGTTTGAAACGATACCATT
AGGATTATCGGCACCGGAATATTGCGCGAAACCTGAAGGCGAACCTTTTG
ACCTTGTTTAAACGCTTGTAACTCTCTGTTGGGGAAACGGCTAGTGTTAAT
TAATTTGCTTTTTGATGCTTTAGTACAGGATATATTTCCGGCTAAAGTAGT
GCCACTTGGCACATAATGTTTGCCTTGGCAACTAGCATCAATGTGTAAAG
TGCCCGATGTTGGGGCTTTCACTGTTACATCAGAAGTCTGATCCTTCCCA
ATACAACTTTTCCGTTCAAGCTCTGTTAATGATCGGGCACCCCTGATTTT
TTTGAACCGCCCCTTGACTTTAACCGACAACTTGTAAGTTTGCCATCT
TCCTGGTCAATTTTCCCTTTGCTGTAATCTGTTGGGGAACGGCTAGTGTA
ATTTAATTTGTTTTTTGATGCTTTAGTACAGGATATATTTCCGGCTAAAGTA
GTGCCACTTGGCACATAATGTTTGCCTTGCAACTAGCATCAATGTGTAA
AGTGCCTGATGTTGGGGCTTTAACTGTTACATCAGAAGTCTGATCCTTCA
GAATAGCAACTTTTCCGTTAAGCTCTGTTAGTGATTGGGCAGCTTGATTT
TTTTGATCAGCCACTGACTTTAATTGAGAAGCTTGTAAGGCTGCCATCTT
CTGCTCATTTTTCGGCTAACTGCTGTTGACTCGTATCACTAGCTTCATTAT
TAGCCTGTTGGAGCTTTAAACTCTCAAGCTGGCTTTTTTTCCGGTATCCATT
TTTGCCTCAATTTGACTGATATAGGAAGTTTTAACCTTGTCTAAGTCAGA
TCCGGTCATATCTTTGCTTTCGGCGATAAAGCTTTTGTAAGATAACTGT
ATGGTTGACTATCATTGTAACCAGATTGATGCTGTATAGCCGTTAAAAGC
GCTTGGTAAGCAGCAATGTTTTGATTAGATGAGGCGATACTCTGCTGTAA
GAGTTGCCCCACCTTGGCTGTTTTACTGTTTTCACTTGATTGTTGTCCAC
TCACTTGCTGAGAACCAAGGGCATAAATTTGTGCTGACTTAAAGTAGTCT
TGCAAGGCTTGACGATAGCCAAATGGGTCATCTTGATTAAAGGTGTCTTG
GTTACTTGTAAAGCCAGCCTTGTACTTATCTAGGGCCGCTGTTTGATCTT
GTAAGTCTTAGTTTGCCTCTCTAGTACTTTAAGTTGCGTTGGGTTATTG
ACATCATGGTAAGTGACTAAGGGATCACCCCTTCTTTACGAAGCGCCCTTC
TTTTAAATGATTTTTCGATTATCCGGCTGGTTGTGGTGGATTGAACACTCA
CTGCTTTTTGAACCGGTGTTAGTTCGCCAGAAGTTGTAATCGTGACTTCA
CGTTTGGCGAAAAGGACAAAGGCGAGCGGATCACTAAAGCCATCACAGC
GGGAACAATCAAGTAAGTCGAGAAGTTTTTTGAACCGATGTTGATAGAATT
CAGTGGTTTCTAATTTTTTCTAGTATTAAACATAAGGGGCACCTCACTCATT
GACTAGTTTGGCATAGTAACCACCTTTTTTGAAGGAGCTCAATATGTGACC
CTTGTTCAACTAATTGGCCATGATCAAGAACAATAATGTTGTTTGTACGT
TCTGCGATGTTTAAACGGTGAGCCACAAAATGATGGTTTTTATCAGGTAA
TCTTAGCAGATGGTCGACAATCTTGCCTCAGTAATGGTATCGAGATTGC
TTGTGGATTTCATCGAAAATAAAAATCTGTGCAGGTGACAGTAACGCGCGC
GCAATCGATAGTCGCTGTTTCTGACCACCTGATAGGGCTGCGCCGCTTTC
AGTTAATTCGGTTGCATAGCCTTGTGGCATTGTGTTCAATATCTGCCTGAA
TTTCTGCGGCAGCACAAAGCAGATTCAATTTCTGCTTGCCTGAGATTAGGA

CGACTACCAAGCGTTAAGTTCGCAAGAATAGTTCAGAGAAAATAAAGGG
TTCTTGAGGAACATAGTTGATATATTGACGAAGCGTCGTGCGGTCAACTT
CAGATAGGTTATGTTGATTGATTAGGATTTGTCCCTGATCAGGGGCAACA
TCAAAAAACCAACTAAAAGTTTGGCTAAAGTCGTTTTTCCAGAACCGCT
CATACCAACGATTGTTAGCTTTGAACCTTTAGAAATTGTCAAATTAATAT
CGTTTAGAATATTTGACCATAACCATACTTAAAGTTCACGTGCTCAAAT
CGAATATTTCTTGGAGACTTTGAACTTGTTTTGATGGGGCGCGTTTTAGC
AAACTCAGATTCTACTAGGTAGACTTCGTTAAGTCGATTATTAGCCACTT
TAGCCATTTGAAGCTTTGGCTGTAGATTGATGATGCTTCAAGTGGGTTA
GTGAAGTAGGTTAACAAGGCATTGTACGTGAGAAGTTGCCCCAGTGT CAT
TTGATTATGCATCACTAATAACGAGCCAATCCAGAGAATTAGGACGTTAA
GAACCAGTTTGACAGCAAGTTTAATGGCCTGTTGAAGTTGATCTGTTTTT
TGGTAAGCAAAGGTCTTTTTAAGTAAGCCAGCAAATTCATGATCTACTTT
TTCATAGCTAGAACGCTCGGGCGCTCATGGATTTGATGGTTTTCAATGCCAT
TTAAACTCTCGATGATGGAGGAGCTTACAATGGCATTACTTTCCATTGCT
TCTTGATTCATACGATCAAAGGCGTTTTTAAAAGCCATACGACCACAAT
ATAGATCGGCAGTGAGACTAACGAGATTAAGAACAAAGTAGTATTTTTGAA
TGCCTAAAAAATAACCAACCGCTATGACAATCCAGACATCCAAAAACATG
GTCAGAATCGTGCTGCCAGAGCATCAATAATTTTACTAGCATCAGTAAA
TCGAGAGGTGATTTCAACCGACCCGGCGAGTTGCGAAGAAGGACATGGGGA
GTTCAAATAAGTGCTGAATGTAGCCTAGTGTGACATCGATCATCAGGCGT
TGGCTCAAACAGTCATTAGAAAAGATTGTGCATATGTAAAAATGGCTTG
AAATAAGTAGGCAATGATAAGGCCTACAGCTATGATGGATAGCGTACTGC
TCATAGCATTGGGCAAGTAAGTATCAATAATTCCTGCAAGAAATATGAT
CCAGCAATACTAATAATTGTGATGAGAAGTGCGGCCAAAATGACGTTAAT
GATCAAACGTTTTTGCCTAATCATCAAGGGAATAAAGGCTAATAAGCTGC
CTTTATCTTCTTTTTTGGGCGTATAAGCGGGCGTGGGAGCGATAAAGATG
GCAACCCCGGACCATTTCATCTTTAAAGCGTTCCTTAGTCATTTTTGGTTAC
TTAACGGAAGGATCAGGGTCACCGATAATAAGGTGATTTTTTAGTAGCCT
TGAAGATCACGTAATAATGAAGAAATTTTCCGTCTTTAAAACGTGAGCA
ATAAACGGATAGGAAACATCAGTAGCTTCAAAAAGGCTCATATCCGCCCG
AATGGCAGTAGTCTTAAACCCTAAACTTTTTGGCTGTCTCGACAATACCAA
GTGCTGTTGTACCGTTTTTATCTGTTTTTGTAACTTTTCGTAAATGAGCT
AAACTATAATCTGAATTGTAAAACCTAAGAATCATGTTAAATGATGCCAC
ACCACAATCACGCTCATCTATCTGTTGGACATAGTATTTTTTAAATGACA
CGGCGTACTCCTTATCTTTATGAAGTGATTTTTATGATCTTGGACTTCTAA
ATTGATAAAAAATAAGTTTCCCAGTTTACAATTCAAGTGCAACACCCTGA
CGACTAGACCATAAAGGCCATGAAGACCTATTCTTGTTAGTGCTAGCTAA
ACAAGAAAGCAGGAATCTTCATGACCCACTCTCAGACTAACACCCACAAG
CATTACCAACAACCTCAGTTTTAGCGACCGTGCTACAATTCAGGCCCTTCA
GGCTGCTGGTGACACCGCGACCGTGATTGCACAGAAGCTTCATCGCAGTA
AAGCGACAATCTCACGAGAAATCACGCGTGGATCTGTAACCTCAGCTCGAC
TCGAAGCGTCACTCGCATCAAGTCTATCTTGCGGAACTGCCCAAGCCAT
GCACGACCGTAAACGCGATAGAACCAGTCACTACGCCTTTCTTAAGACCG
GCCGTGCGTTCTTCAAGGCTCTCGCCAGGGAGCTTACTCGTAAGCCGCGC
GTACACAGCGTTGATAGCTTCGTACACTTCTATCGCGACCAGGGCAAGGC
TTGCCCTTCAACGACAACCTGTGTATCGCTACATCGACGCCGGGCTGCTTG
AGCTAGACAACATGACACTTCCCAAGAAGCTCCGACGCCGCATCAAAGGC
TATAAGAACGCCACAAGCGCAAGAATAAGAAGATATACGGCGACTCAAT
CGAGTTGCGTCTGCGGCCGTGAATGACCGCACAGGCGTGGGACATTGGG
AAGGCGACTTGGTCAAGGGTATTCGCTTAGCTGATGAGCCAGCATTAATG

ACGCTCACAGAACGGTACAGCCGGACTGAGATCATCGTCAAGATTCCTGA
CTATCATGCGGGCACCTGCCTTAAAGCCTTGCAGGACACGATCGACGACT
ACGGGGCCAAGGAATTTGAGAGTATCACTTTTGACAATGGTTCCGAGTTT
GCCAAGTTATCAGAGATTGTTGGAACCCGGATTTACTTCGCACATCCGTA
CTCGCCTTGGGAGCGTGGCACAAACGAGAACGCCAATGGACTGCTTAGAG
AATTCTTCCCGAAAGGGAAGTCTCTCAGAGCAGTTACCCTGGTTGAAATT
CAAGCAGTCCAATCCGCACTGAACCATCGTCCCAGACGTATTCTGAACTA
TCTTCGCCCATGCGATTACTACCGATGCATGGCGTAACAGCCTAGACCAC
TATCAAGAATTCGTTATCATCGTTGCACTTGACTTGAAAATTGAGGATAA
AAATAAGTTTTTTCATATTTAGAGAATACTGAAACTACGAAAACGAGTA
TATCCGCAGTCAAGGGATTATGATCTCTCAGGTGAGATCCAGCGCGAAAG
AATGGGTTTTTTAGGGAACTGCTTGATAAAGATTTTTCTTTCTTATGGAAAT
TGACTAACTTCATTTTTTAAAAATCTTTCCCGAGTTAATCAAAAAACTC
GATGGTTTTAAATGCCATCGAGTTTTTAGTGTGGTAAAAACTGAACTTACA
GGGGGAAAATCAGGATACCGTTCCAGAGATTCTAAATAATATTGTTAATG
CTATTGAGTTAGAACTAAGAGTATAGTGTGATTAGTCTAAGTACGTACT
GTGCATTCCAATATAACCTAAGTTCGTTCCAAAGGGTTTTAGAAGCAATTA
AGACGGGGTAAATCTTATCGTAAAGCTTGGAAGCAGATGTTGAAAGGCCA
CTTTTCATAGCTTCCATCTGAAAACCTAACTATACTTTATTAAGTATAGC
AACGGGATATTTGTTAGCTTCCAAATCAGCCTTTGCCATGATAGCTATTC
TTCGTTACGATCGGTGATGCTGGTATCAAGGATAAAGTCACAAAGTAAA
CTGATAATATCTTGTACATTTATTTCCTTTTTTTTTCCCAAACATTAATGT
TGCCAGGTCCTGGTGCACCAGCACTACCCAGCCATCTCCAATTATTCC
AATAACGGTTTTCGAAGCCACCCTTGGAACAGTATAATGCCAATGACCCC
TCTTGTCTCTCCAAGAATAGCCATTAGAACCTCCAAAATAGCTATATCCA
CCGGAAATTTCTTGAAGTTTTGCAGTATCCAATTCTTTATAACTAAGCAA
AACAGCACCTCCTCCAAAATAGAAAATAATAATAGGTCTCTAGAGTATT
ACACATGCCAAAAAAGTCAACCCCCTTTAACGTGAAAAACTAATGCAAAC
TTTCTTATCTGGGGATTTTAGTTTTGAATAAAGATCGAAAAAAGACTATA
GCTAATATTTTTTGCTCTTGTAGCTACAATTATTTTTCCATTCTGATCAC
TAAGCAGTGGCTGGTGAAGCTGGCCTGATGTTGTCACAAGCACTGATAT
GGTAATGCGTAATCAGTTTTATTAGTTCGGATTAAAATTAATTTAAGAGCA
CAAGAAAGCACGATATTTTTGATGTACTTGTGTATAAAAATGAATTTGTT
TCTTTAAAGTTTAACTTTTTGTCTTGATTTCGTGTTGTCAGGATTGTCCGT
ATAGCAAGTGCTGAGGGACCACCATTAAAAGCCCGTTGCTAAAATCTTG
CTGTATCAGTGCTTGTATAGCTTTCACAAGCCACTAAGTATCAATACGAT
GGCCGTTTGTATTACATGAGGATTGATACTCATCTGATTATTTCAAACGT
TGAAGTTTCTGTTGAAGCATCGATTCAAAGATATACTGACCAAGGTGCCG
ATGGGGGACGCGCAAGGGAGAAAAAGAGATTTTAAGTTAAACACAGATGG
ACACGACATTGACCATTTAAGGCAGGACAAATAATTTAAAATCAGCGTTA
AAAAAGATATGGAATTGTTGGTTGTCAAAGAGTGGACAAAAGGGAAACA
CCACTAAAAGTACAATAGGGTGCACCCTAACGGATCGTCCAGAAACATCT
TGAAATAAGGCCTAAAATCCGATTCAAATAAGTGACCCGAAACGATTACT
AAGATCGTTTTCGGGTATTTTTATGGGTAGTCGTGTGTAGCCATTGCTATA
ATTGACATTAGATCGCACGAGATGAGGACAGCTATGAGTAAGACCATCAA
AGA ACTTGCAGAGGAATTGAGCTTATCTAAATCTGGTATTCGCAAATATC
TAACCGCATCTTTTCGTGTGCGATACACACACGAGAGCGCACACCGTATC
CTGATAGATGATGCTGGTGTAAAGGTCATCAAGCAGATGATTGCACACAA
AGGAGTACACTCGGAACGCACACAAAAGGCGCATGGTGTGCACACTGAAC
AGACGAGTGCAGCAGTCGAACAGTGTTCTTGTAGAGCAGCTTAGAGCAAAG
GATAAGCAGATTGAGAACCTCCAGAAGCTACTAGATCAATCGCAACAGCT

TCAGCTAATGGCCGAAAACAAGCTTAAGAACTAGAAGCACCCCAAACG
CGCCTGAGAGCGGTTCTGAACCAGCAAATGATCAAACGCATGAACGAGTG
CCAGAAGCGCCTGTAAAGGCTGAAAGCAGCCCAGAACAGCCGCCGTCTTT
TTGGCAGAGATTGTTTGGTTCGGGAAAATAACAAATAGCCACCGTGTCCA
CGGTGGCTATTTCACTAAGTCTTTAAGTTGGGGAACCCAGTAGGACGCGC
TGCTATTAGGTAGACCAATTGATATTCACAAAGTAGTGTGTTGTGAACCA
GGCAGGGCGCAAACCTGCGGCTAAGGATCATTATGTCAACTAAGTGCATTT
TATAACGAAAATCGTCTAGATTTAAAAGACAATTAAGCGGGTACTGACGG
CTTTTTTGGTATACTAATTTAGTCGCTACGCCTTTTCGCGTGATACCGCG
CCTAAAGGAGGTGACAAGTATGTCTTCATTTCGATTACAGCGGTTACCGCGC
CGATCATCGTTGGTGTACTCTTGCTTTTGTTCGAGTACTGGTTGAACCA
CACGATGACCGTAAGTAGCGACTAGGTTTGACCAAGTTTTGGCACCAGAA
CGTCATCCGTAGCGGGTGGCGTTTTTTGCGTAAAAAGAACCGCTGTAGG
TAGCGCTACAGCGGTTCCCTGGCGACAATTATGTCTCCATTTCGATTGGCAT
CAGTATAGCACAAATTTCAATAAAAATGATAGATGTGCGATTATCTTATGC
TTAATAAGACAGCTTGAACCTCCCCCTTCAAGCGATAAGAGCTGTTAGGC
TTAGCTAAGTGAGGGTAGTTCAACTGGGTTTCGTTTTATAACGAAATGTCA
AAGATAATGTACAGTTTTTAAGCTTGTGTGAATGTTTCGTAATGTCAAGTT
GATAACCTGTAACAGCACGTCCTTGTTTGTTAGTCATCAGGGTAAATAGT
GTTTGTGGGTAGAGCTTGCCAAGTTCACTAATAGCGGTTCCGAGAACTTT
TTGCTTAAATCGTCCAGATTGCCAGTGAATGGGATCACCATGTGAATTGC
TCCCTAAAAACCAACTCTGCCAGTCTGCAATAGAGCCCTTAATAGAGGTG
CTCTCTAGCTTTCCATTAGAGTTTGCATTCCACAACCTTCATCATGGTTAA
AGCGTATTTAGAGCGCACATTAGCTAGTTCGAAAGGTGAAAAGAATAGA
AATTTTTGCGTAGTTGGAATACATACGGTGCTGCAGGACGGGAAAATTTA
AAGTGAATAGCTCCATCTTCAACAAAATCAATATATTCAAAAAGTTGTGC
CATCTGAGGACGACTTTTCCCTCCCTGATTTTTGAAAGATAGATACAATG
CAGTTTGCTCGTTCAGTCGTTTTAAAAGCTTCTCCGACACGACGATAGTTT
TTCCCTGAGAGCTTAAACCTAGATGATGAAGAATATCTGAGGTGCTTAC
GTTAAAGGCTTCTTCAAGTTTACTATCTGATTTAACAAAACCTAAAACAAT
AATCCAAGACCTTATGTTCAAAAGATGTTAGGTTGCCAAAAGCCCGCGGC
AAGTCATTGCCTTGTGTAACAAGATAGTCTTGGCGTTTAAGCAACGCCTG
CATCGCCAGATTTTGTTTTTTTGTTGATTGTATTTGCCATCTTTTAATAC
CTCTAATAGCTATAATACCGGATAAAGAGTATTTGTCAAAAAACAATAT
ACATGACGGACCTTTTTGATATACATGACGGACCTTTTTGATATACATGA
CGGACCTTTTTGATATACATGACGGACCTTTTTGATATACATTTTCCCGC
AAACCTGCGGTCTATCAAGATTTCTCCATCGCCTAATGTATTTAAATGTA
GTTCAAATGTAACCTACTAATGTATTGACATACGCGCGTAAGCTCAAAAA
CTTTAATTCTTTTAGTTTTTGGAGAACTAAAAATGTCAAAAAGACCTTGG
GGAGAACCTCTCCCCAAACCCATAAAGATCAAAAACAAAACCTTGGTC
GCTACGCTCCCCAAAAGGTGTGGCTACGCCACGTTTAACTCCGGCTCTGC
CTGCGCGCCTTTGGCTTGCCCTAGCGCGCTTCGCTTGCCTGGTTCAAGAA
AACCTCGCCAGGGGCTCGGAGAACGGTCACGATGTTCCCTTAAAACCTA
GAAACTAGTCGGCAAGTTTTTLAGTTGCTGCTTCTGCTAGTTCCTGATAAT
AAGCATATTTTGGAGCGTCTTTGGGTAGTTGCTGACAAAGCTGCAAGATG
GTTTCCAACCTTGCCCTATCTGTATTTACGGTTCCTGGAATCAAGACTGA
TCCTAAGAATCGATAAGCTTCTGATACTTGATCTAGCTGTTTTTCAAGTT
GTAAGACATGTTCTTGTGGGCTTCTTGGTGTGCGCTGGACCATGTATTT
TGTTGATTGGCAAGTAACAAGGCTTGATTTGACGCTGTAACCTGCCCTTT
TTGACCCTCTAAGTGGGCATAGGGGTTGATTTGATAGGCTTTAAGAGCGT
TCTGCTTGTGCTGTTTCAGCTTTTTAATTGGCGTTGAAGAGATTGGGTTGCT

GATCGCCCATACTGGCTTGTTTTAATGGGTTTGACGGTTAACTGACCTGC
ACGATATTGATACCATAGGACTTCTCCCATGACACGCATGCGGCCGTTGA
TGGCACCTACACTGAGTAAGCTTAACAAGATTAAGAAGCTCACTAATATG
CGCCAACGGAGCTGATAAAAGCTCTGAATGATCGTGATCACATTTAATCG
CCTCACTTTGGGATAAAGCATAGCCACATCAGGCACGCCGTGATGACGAC
ACCACCTAGGAAGGTCAGCGCATAGCCCCAGTAGACAGCCTGACGGCTGT
GCTTCAAATCGACTTGTAAGCTTGGCTTGCTTGATTTAAGCGTGTGCT
TCCTGAATGGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCAGCTTCAGCGTTGATTTTCTG
AGCGTTTTAAATCTGTTTTAGCTTGCGCAAGCAAGGCTTTATGACTGGTTT
CAAGCTGTGCTTTAAAGTCTGCTAATGCATCGTCTAACCGACCATCAGCA
ATTTGGCGGTCTGCCTGTGCATCACCAAATAAATGTCCGCGATCAGCGGC
GTACAGCTCTTTAATGGTTTGCTCAAGGTGAGCCGTTAATTGAGCAGATT
CGGCTAAATGAAGCCGACCATCTCGCAGGCCTTCTAAAAGTTTCGGTAACT
AAGGCTGTGATTTCTGATTCTGAAAGTGTCAATTGTGCTTGCTCCCTATCG
TTCCAGTGTAGGTCCTTCATTGTGACGTTGTTGTTGCCTACTTTTGGCCC
GCTGTTGGGCTTGGGTCCGTTGCTTTTGCTCACCAATGGCTTCGTTTTCC
TTAATCTTGCCTAGCAATTGCTGATAAGTTTCAGAGTGTGCCGGTGTTC
GGGTGGTTTTGAGGCAGAGGTTAACTCAGCTTCCAGTTTTTGTTCAGGG
CAACGTAATTGCTCCTTACTTGATTTTGGAGATAGGCGCTAATTGTTTGT
GCAAATCGCGGTATTGCTTCGCTAAATCGTTGTA ACTCTGCTGCAAGTGG
TTTAATGCTGTTTTAATGCGTTGTCCGAGTTGGCGATAATGGGTTCCCA
TTGATCGAGCTTTTTGTTCCATGTGTCCACTTGTGTTTGCAAGACGCTCA
AAGTTTTGAGTTGCTGATGCATGGTTTGGTTCTCGTTGTTGAGCCGTTCC
TTCTCTTGATTGAGTTTGGTATTTTCGTTGTTTTCAGTTGCTCGATGAGCGT
TAATAACTCGCTGTTGTTCTTGCTCGGATAAGCGTTGTGCTTCTCGAGCT
TGGGTTTCGGTTTGCCA ACTCATGCGTGATTGCCTCCTTTTCGTA ACTTGT
CCCTAGTTTGGGACCGCGCACTCGTCGTTGTTTGT TTTGGGCGTCTAAGA
ACGCGTATGAGACGTTTTGACCGCGATCATGAACTGTAACACCTTTTTTCG
AATAAATACGCTGAGAACGCCTTAAAATCGATTGTACGTGAATCTTGCAT
GACCGAATCAATACGGGAGCGCAGATCATCTTTCAGACGTAAGCGCCTT
TGGCGCTTATTTTTGCGTTCTGCCAAGGTATGACGTTCTTGTTGTTGCGAG
TGGTGTGTAATCACTGAAAGTCCGTGTTACGGACAAGGGTGTGCTTAAT
CGCCGCAACGCGAGCAAAAATCGTTTTGATGATGATACTTGCGACCGGTAA
TGAGGTTAGGGGCATTGATGATGATGTGATTATGGAGCTTATGACCATCA
CCATCTAAATGGGTGTAGACGGCAATCTCATGATTTGGCGCGATCCGGCG
ACCTAGTTCAACTCCTAGCGCATTGACTTGTTGCCAAGCGGCT



РД 20102



300153494

COBISS ©

