

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

AKVILĖ PETKEVIČIUTĖ

Mikrobiologijos studijų programa

Magistro baigiamasis darbas

**NAUJO BAKTERIOCINO GEOBACILINAS 6 BIOSINTEZĖ IR
CHARAKTERIZAVIMAS**

Studentas _____
(parašas)

Darbo vadovas: dr. Arnoldas Kaunietis

(parašas)

Vilnius 2022

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Antimikrobiniai peptidai (AMP)	6
1.2. Bakteriocinai.....	7
1.3. Bakteriocinų ir antibiotikų skirtumai.....	8
1.4. Bakteriocinų klasifikacija	8
1.4.1. I klasės bakteriocinai.....	8
1.4.2. II klasė – po transliacijos nemodifikuojami bakteriocinai	9
1.4.3. III klasės bakteriocinai	9
1.4.4. Gram-neigiamų bakterijų bakteriocinai	9
1.5. Bakteriocinų veikimo mechanizmai	10
1.6. Bakteriocinai be lyderinės sekos	10
1.7. Bakteriocinų be lyderinės sekos biosintezės mechanizmai	12
1.8. Termofilinės bakterijos.....	12
1.8.1. <i>Geobacillus</i> sp.....	13
1.9. Bakteriocinų panaudojimas	14
1.9.1. Maisto konservavimas.....	15
1.9.2. Klinikinis pritaikymas	15
1.9.3. Priešnavikinės savybės.....	16
1.9.4. Panaudojimas veterinarijos srityje	16
1.9.5. Kosmetologinis pritaikymas	17
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	18
2.1. Medžiagos	18
2.1.1. Bakterijų kamienai ir auginimo sąlygos.....	18
2.2. Metodai.....	20
2.2.1. Bioinformatiniai įrankiai	20

2.2.2. Rekombinantinio baltymo biosintezė.....	20
2.2.3. Tricininė NDS-PAGE-baltymų elektroforezė.....	20
2.2.4. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas.....	20
2.2.5. Baltymų koncentravimas silika geliu C18ce.....	21
2.2.6. Baltymų koncentravimas metanolio ir chloroformu	21
2.2.7. Bakteriocino stabilumo įvertinimas skirtingose pH reikšmėse ir temperatūrose.....	21
2.2.8. Baltymų gryninimas	22
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	24
3.1. Geo6 biosintezė ir gryninimas.....	24
3.2. Bakteriocino stabilumo įvertinimas temperatūrose ir pH reikšmėse	25
3.3. Bakteriocino antrinės struktūros įvertinimas.....	27
3.4. Geo6 antibakterinio aktyvumo įvertinimas prieš termofilines ir mezofilines bakterijas	28
3.5. Apibendrinimas	29
IŠVADOS.....	31
PADĖKA.....	32
SANTRAUKA	33
SUMMARY	34
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	35

SANTRUMPOS

AMP – antimikrobiniai peptidai (*angl.* antimicrobial peptides)

ACN – acetonitrilas

IPTG - izopropilo β -D-1-tiogalaktopiranozidas

LAB – pienarūgštės bakterijos (*angl.* lactic acid bacteria)

LB – Luria-Bertani sultinys (*angl.* Luria-Bertani broth)

ABC – ATP prisijungiantys transporteriai (*angl.* ATP – binding cassette transporters)

FDA – JAV maisto ir vaistų administracija (*angl.* Food and Drug Administration)

kDa – kilodaltonai

MB – maitinamasis buljonas

OT – optinis tankis

NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforezė

Geo6 – geobacilinas 6

IVADAS

Šiais laikais vartotojams kelia susirūpinimą maisto priedai, bei jų nenatūralumas, o perdirbtų produktų, nepridedant jokių cheminių konservantų, nauda sveikatai tampa vis patrauklesnė. Viena iš alternatyvų šiam susirūpinimui spręsti yra antibakterinių peptidų sintezė, kurie dar žinomi kaip bakteriocinai. Bakteriocinai – tai antimikrobiniai peptidai sintetinami bakterijos ribosomų ir pasižymintys antibakteriniu aktyvumu prieš bakteriociną sintetinančiai bakterijai artimas ar tolimesnes bakterijų rūšis. Bakteriocinai pasižymi daugeliu teigiamų savybių, dėl kurių jie ypač įdomūs įvairiose srityse. LAB bakteriocinai yra stabilesni aukštesnėse temperatūrose ir pasižymi aktyvumu plačiose pH ribose. Šie antimikrobiniai peptidai taip pat yra bespalviai, bekvapiai ir beskoniai, o tai dar labiau padidina jų panaudojimo galimybes. Šiuo metu bakteriocinai gali būti naudojami ne tik maisto konservavimui, tačiau ir kaip perspektyvūs antimikrobiniai junginiai gydymo tikslais, bei veterinarijos ir kosmetologijos srityse.

Šio darbo metu buvo siekiama charakterizuoti naują bakteriociną geobaciliną 6 (Geo6). Šis bakteriocinas buvo identifikuotas *P. thermoglucosidasius* DSM 2542 termofilinės bakterijos genome ir pirmieji darbai su šiuo bakteriocinu buvo pradėti dar 2019 m. Vilniaus universiteto magistrantės Anos Koniuchovaitės. Darbas buvo atliktas Vilniaus universiteto, Gyvybės mokslų centro Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros laboratorijoje.

Šio darbo tikslas: heterologiškai susintetinti bakteriociną geobacilinas 6 ir jį charakterizuoti.

Darbo uždaviniai:

1. Atrinkti optimalias sąlygas geobacilino 6 heterologinei biosintezei *Escherichia coli* ląstelėse ir jį išsigryninti.
2. Įvertinti bakteriocino stabilumą skirtingose pH reikšmėse ir temperatūrose.
3. Įvertinti bakteriocino antrinę struktūrą naudojant CD spektrometriją bei bioinformatinius įrankius.
4. Įvertinti bakteriocino antibakterinio aktyvumo spektrą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Antimikrobiniai peptidai (AMP)

Visi gyvi organizmai gamina antimikrobinius baltymus, kurių daugelis dėl palyginti nedidelio dydžio vadinami antimikrobiniais peptidais (AMP). Bakterijos gamina dviejų tipų AMP: tuos, kuriuos sintetina ribosomos (taip pat vadinamus bakteriociniais), ir AMP, kurių ribosomos nesintetina, be struktūrinių genų, koduojančių šiuos AMP (Chikindas et al., 2018).

Antimikrobiniai peptidai ir baltymai yra įvairialypė natūralių molekulių klasė, kurią kaip pirmąją gynybos liniją gamina visi daugialąsčiai organizmai. Šie baltymai gali būti labai aktyvūs ir tiesiogiai naikinti bakterijas, mieles, grybelius, virusus ir net vėžines ląsteles. Vabzdžiai ir augalai pirmiausia naudoja AMP kaip antibiotikus, kad apsisaugotų nuo galimų patogeninių mikrobu, tačiau mikrobai taip pat gamina AMP, kad apgintų savo ekologinę nišą. Aukštesniuose eukariotiniuose organizmuose AMP taip pat gali būti vadinami „šeimininko gynybos peptidais“, pabrėžiant jų papildomą imunomoduliacinį poveikį. Ši veikla yra įvairi, priklauso nuo AMP tipo ir apima įvairius citokinų ir augimo veiksnių poveikius, kurie yra svarbūs normaliai imuninės sistemos homeostazei. Kai kuriais atvejais netinkama AMP raiška taip pat gali sukelti autoimunines ligas, todėl dar labiau išryškėja šių molekulių ir jų sudėtingos veiklos supratimo svarba.

AMP yra evoliuciškai išlikusios molekulės, randamos įvairiuose organizmuose – nuo prokariotų iki žmonių. 1922 m. Aleksandras Flemingas iš nosies gleivių identifikavo lizocimą – pirmąjį aprašytą žmogaus antimikrobinį baltymą. Šis atradimas buvo nustelbtas, kai 1928 m. Flemingas atrado peniciliną, o 1940 m. jis kartu su kitais pasiekė, kad penicilinas būtų pradėtas naudoti gydymui, už ką jam buvo paskirta dalis 1945 m. Nobelio medicinos premijos. Taigi XX a. penktajame dešimtmetyje prasidėjęs „auksinis antibiotikų amžius“ lėmė tai, kad buvo prarastas susidomėjimas natūralių AMP, tokių kaip lizocimas, terapiniu potencialu. XX a. septintajame dešimtmetyje, atsiradus daug vaistams atsparių mikrobu patogenų, pradėta domėtis AMP kaip šeimininko gynybinėmis molekulėmis. Antimikrobinų peptidų gebėjimas naikinti bakterijas paprastai priklauso nuo jų gebėjimo sąveikauti su bakterijų membranomis arba ląstelių sienelėmis. Paprastai šie baltymai turi teigiamą krūvį ir didelį hidrofobinių aminorūgščių santykį, todėl gali selektyviai prisijungti prie neigiamai įkrautų bakterijų membranų. Dėl AMP prisijungimo prie bakterijų membranos vyksta nefermentinis suardymas. Selektivumą konkrečioms rūšims lemia skirtingų mikrobu ir ląstelių tipų membranų sudėties skirtumai (Zhang and Gallo, 2016).

1.2. Bakteriocinai

Apskritai bakteriocinai yra daugiafunkcinės, ribosominiu būdu gaminamos baltyminės medžiagos, kurių tam tikros koncentracijos pasižymi ryškiu antimikrobinu aktyvumu (Chikindas et al., 2018). Tai baltyminiai toksinai, kuriuos gamina bakterijos ir tam tikros archėjų rūšys, kad slopintų panašių arba artimai susijusių bakterijų padermių augimą (Bemena et al., 2014). Šios molekulės pasižymi antimikrobinu aktyvumu prieš patogenines bakterijas, o tai pagrindžia jų biotechnologinį potencialą. Jei bakterijose gaminami bakteriocinai slopina kitas tai pačias genčiai priklausančias bakterijas, jie paprastai laikomi siauro spektro bakteriocinai. Priešingai, jei jie slopina kitai genčiai priklausančias bakterijas, jie laikomi plataus veikimo spektro bakteriocinai. Įdomu tai, kad bakteriocinus gaminančios bakterijų ląstelės yra atsparios jų antimikrobinams peptidams, kuriuos veikia šeimininko ląstelių gaminami specifiniai imuniteto baltymai. Bakteriocinų gamybą ir imunitetą koduojantys genai paprastai yra suskirstyti į operonų klasterius ir gali būti mobiliuose elementuose, pavyzdžiui, chromosomoje kartu su transpozonais arba plazmidėje (Darbandi et al., 2021).

Pirmieji duomenys apie bakteriocinų gamybą buvo gauti 1925 m. kai pirmą kartą buvo aptiktas antagonistinis veikimas tarp *Escherichia coli* kamienų, ir šis peptidas buvo pavadintas „kolicinu“, kad atspindėtų mikrobinį šaltinį. LAB gaminami bakteriocinai yra ypač svarbūs, nes Amerikos maisto ir vaistų administracija (FDA) šioms bakterijoms suteikė GRAS (paprastai pripažįstamos saugiomis) statusą (Negash and Tsehai, 2020). Vėliau buvo randama vis daugiau bakteriocinų, tokių kaip pediocinas A, enterocinas-1146, piscikolinas 126, gasericinas M, pneumociklicinas, plantaricinas JY22 (Cui et al., 2021).

Lactococcus lactis gaminamas nizinas buvo pirmasis bakteriocinas, pradėtas plačiai naudoti komerciniais tikslais. Nuo to laiko nustatyta daug bakteriocinų iš įvairių bakterijų padermių. Bakteriocinų gamyba gali būti laikoma naudinga gamintojui, nes, esant nepakankamam jų kiekiui, šie peptidai gali sunaikinti arba slopinti bakterijas, konkuruojančias dėl tos pačios ekologinės nišos arba to paties maisto medžiagų fondo (Zacharof and Lovitt, 2016).

Bakteriocinai pasižymi daugeliu teigiamų savybių, dėl kurių jie ypač įdomūs įvairiose srityse. LAB bakteriocinai iš prigimties toleruoja aukštą temperatūrą ir pasižymi aktyvumu plačiame pH diapazone (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Šie antimikrobiniai peptidai taip pat yra bespalviai, bekvapiai ir beskoniai, o tai dar labiau padidina jų panaudojimo galimybes. Be to, dėl savo baltyminės prigimties jie yra lengvai skaidomi proteolitinių fermentų. Todėl bakteriocino fragmentai ilgai negyvena žmogaus organizme ar aplinkoje, o tai sumažina tikslinių padermių sąveikos su suardytais antibiotiko fragmentais tikimybę. *Escherichia coli* ir kiti *Enterobacteriaceae* šeimos atstovai yra keli gramneigiamų bakterijų ir pieno rūgšties bakterijų pavyzdžiai; *Bacillus* rūšys priklauso gramteigiamoms bakterijoms, kurios gamina bakteriocinus (Kodali et al., 2013).

1.3. Bakteriocinų ir antibiotikų skirtumai

Lyginant juos, bakteriocinai sintetinami ribosominiu būdu, o antibiotikai gaminami pasitelkiant daugelio fermentų kompleksą. Dažnai bakteriocinai pasižymi baktericidiniu arba bakteriostatiniu poveikiu siauro spektro bakterijoms, tačiau tradiciniai antibiotikai pasižymi žymiai platesniu spektru. Be to, dauguma bakteriocinų yra veiksmingesni esant žymiai mažesnėms peptido koncentracijoms lyginant su antibiotikais (Gulluce et al., 2013, Mak, 2018). Bakteriocinai dažnai laikomi natūralesniais, nes manoma, kad jų nuo seno buvo daugelyje vartojamų maisto produktų. Bakteriocinus inaktyvuoja virškinimo trakte esantys fermentai, pavyzdžiui, tripsinas ir pepsinas, todėl jie nekeičia virškinamojo trakto mikrobiotos (Cleveland et al., 2001; Balciunas et al., 2013).

1.4. Bakteriocinų klasifikacija

Bakteriocinai klasifikuojami pagal jų molekulinę masę, pirminę struktūrą, modifikacijas po translacijos bei pagal veikimo ir biosintezės mechanizmus. Tačiau bendra klasifikavimo sistema nėra priimta, nes skirtingų autorių klasifikacijos aprašymuose yra skirtumų. Kadangi dauguma aprašytų bakteriocinų yra sintetinami pienarūgščių bakterijų (LAB), klasifikacija remiasi būtent jų savybėmis. Naujausia klasifikacija suskirsto bakteriocinus į tris pagrindines klases pagal jų struktūrinės ir fizikines bei chemines savybes (Zacharof and Lovitt, 2016).

1.4.1. I klasės bakteriocinai

Lantibiotikai yra maži (<5 kDa) termiškai stabilūs peptidai, kurie yra labai modifikuoti po translacijos ir kurių sudėtyje yra būdingų policiklinių tioeterinių aminorūgščių, tokių kaip lantioninas, metilantioninas, ir nesočiųjų aminorūgščių, tokių kaip dehidroalaninas ir 2-aminoizobutirūgštis. Lantibiotikai toliau skirstomi į dvi rūšis, priklausomai nuo skirtingo krūvio (Arnison et al., 2013).

A tipo lantibiotikai, tokie kaip nizinas ir lakticinas 3147, yra lanksčios sraigto formos molekulės, turinčios 2-4 kDa dydį, dėl kurio tikslinio organizmo ląstelės membranoje susidaro poros, todėl citoplazminė membrana tampa depoliarizuota (Kaur et al., 2015).

B tipo lantibiotikai yra 2-3 kDa peptidai be krūvio arba su neigiamu krūviu. Tai globulinės molekulės, trukdančios ląstelės fermentinėms reakcijoms, pavyzdžiui, ląstelės sienelės sintezei (Sahl and Bierbaun, 1998).

1.4.2. II klasė – po transliacijos nemonifikuojami bakteriocinai

II klasės bakteriocinai yra maži peptidai (<10 kDa), atsparūs karščiui, neturintys lantionino, kurie po transliacijos nėra modifikuojami, išskyrus tai, kad pašalinamas signalinis peptidas. Jie turi amfifilinę spiralinę struktūrą, todėl gali įsiskverbti į tikslinės ląstelės membraną ir sukelti depoliarizaciją bei žūtį.

IIa poklasio bakteriocinai, tokie kaip pediocinas PA-1 ir sakacinas A, yra monomerai, kurių N-gale yra Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys konsensuso seka. Jie ypač aktyvūs prieš *Listeria monocytogenes*.

IIb poklasio bakteriocinams priklauso laktacinas F ir laktokocinas G. Tai dviejų komponentų bakteriocinai, kuriuose du skirtingi peptidai veikia sinergiškai ir sukelia antimikrobinį poveikį (Kaur et al., 2015).

Trečiajam IIc poklasiui priklauso cikliniai bakteriocinai, tokie kaip gasericinas A, cirkuliarinas A ir karnociklinas A (Cotter et al., 2005). Šie peptidai turi du transmembraninius segmentus, kurie palengvina porų susidarymą tikslinėse ląstelėse (Kawai et al., 2005; Masuda et al., 2012).

1.4.3. III klasės bakteriocinai

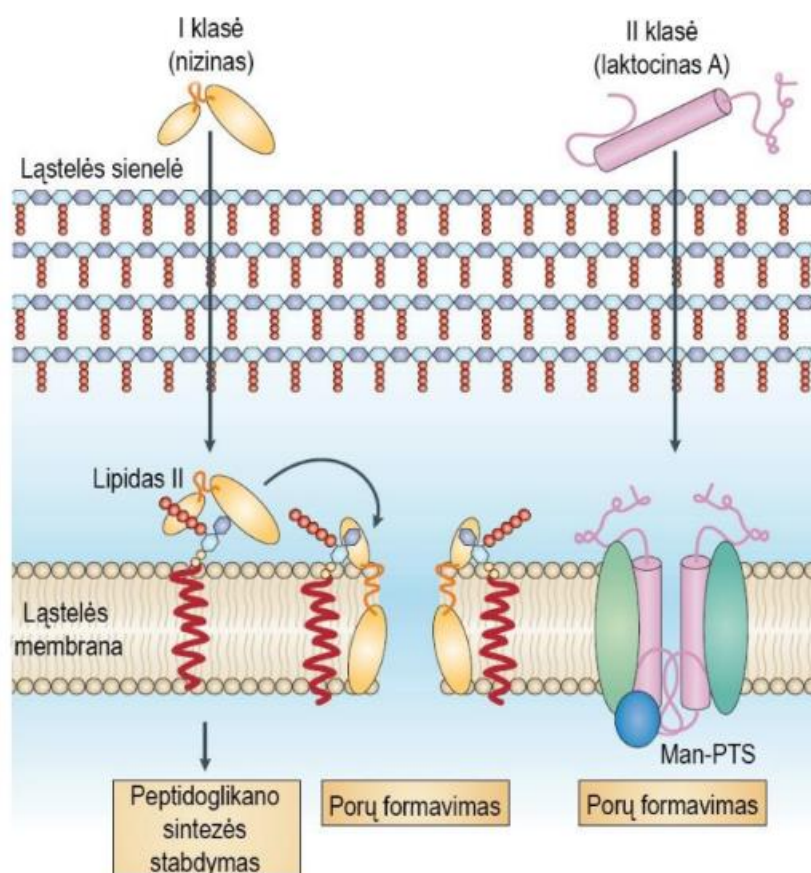
III klasės bakteriocinai yra didelės molekulinės masės (>30 kDa) karštyje nestabilūs antimikrobiniai baltymai. Šiai grupei priklauso kai kurie kolicinai, megacinai (iš *Bacillus megaterium*), klebicitinas (iš *Klebsiella pneumonia*), helveticinas I (iš *Lactobacillus helveticus*) ir enterolizinas (iš *Enterococcus faecalis*) (Simmonds et al., 1996; Kaur et al., 2015).

1.4.4. Gram-neigiamų bakterijų bakteriocinai

Didžioji dalis bakteriocinų gaminančių Gram-neigiamų bakterijų yra priskiriamos *Enterobacteriaceae* šeimai, pvz., patogeninės *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ir *Pseudomonas aeruginosa* (Telhig et al., 2020). Gram-neigiamų bakterijų bakteriocinai skirstomi į dvi pagrindines grupes: didelės molekulinės masės baltymus (30-80 kDa), vadinamus koliciniais, ir mažos molekulinės masės peptidus (nuo 1 iki 10 kDa), vadinamus mikrociniais. Kolicinus gamina *Escherichia coli* padermės, turinčios kolicinogeninę plazmidę. Mikrocinai paprastai yra labai stabilios molekulės, atsparios proteazėms, ekstremalioms pH koncentracijoms ir temperatūrai. Juos gamina žarnyno bakterijos streso sąlygomis, ypač kai trūksta maistinių medžiagų (Blaszczyk and Moczarny, 2016).

1.5. Bakteriocinų veikimo mechanizmai

Paprastai bakteriocinai pasižymi skirtingais veikimo mechanizmais. Galima suskirstyti bakteriocinus į veikiančius bakteriostatiškai, inhibuojant ląstelių augimą ar turinčius bakteriocidinį efektą, vykstant arba nevykstant ląstelės lizei. Bakteriocinų taikiniai gali būti genų raiška ar baltymų produkcija, ląstelės sienelės komponentai. Bakteriocinai gali turėti siaurą spektrą, slopindami taksonomiškai artimas bakterijas, arba platų spektrą, slopindami daugybę bakterijų (Mills et al. 2011; Silva et al., 2018).



1.1 pav. Bakteriocinų veikimo mechanizmai. Nizinas, kuris yra I klasės bakteriocinas, stabdo peptidoglikano sintezę inhibuodamas peptidoglikano pirmtaką lipidą II. Pavyzdžiui, II klasei priklausantis laktocinas A, gali formuoti poras. Laktocinas A prisijungia prie manozės fosfotransferazės sistemos (man-PTS) receptoriaus ir formuojama pora (Cotter et al., 2013).

1.6. Bakteriocinai be lyderinės sekos

Bakteriocinai slopina tikslinių organizmų augimą įvairiais mechanizmais. Šiuos mechanizmus galima apytiksliai suskirstyti į mechanizmus, kurie pirmiausia veikia ląstelės apvaskale, ir mechanizmus, kurie pirmiausia veikia ląstelėje ir daro įtaką genų raiškai ir baltymų gamybai. Kai

kurie bakteriocinai, ypač daugelis gramteigiamas bakterijas slopinančių preparatų, veikia pažeisdami ląstelę.

Tačiau kai kurie bakteriocinai yra netipiški, nes jie sintetinami be N-galo, todėl vadinami „bakteriocinai be lyderinės sekos“. Bakteriocinus be lyderinės sekos gaubia paslaptis, nes jau seniai pripažinta, kad lyderinės sekos peptidai yra būtini bakteriocinų biosintezėje.

Baltymų su lyderine seka funkcijos: 1) yra biosintezės (modifikacijos atliekančių) fermentų atpažinimo vieta, 2) apsaugo gaminančią padermę nuo bakteriocino poveikio ir 3) užtikrina tinkamą konformaciją, būtiną fermento ir substrato sąveikai (Klaenhammer 1993; van der Meer et al., 1994; Oman and van der Donk, 2010). Klausimai, susiję su pagrindine jų biosintezės biologija, yra neatsakyti.

Bakteriocinas be lyderinės sekos nepraeina jokių potransliacinių modifikacijų ar apdorojimo ir tampa aktyvus netrukus po transliacijos. Todėl yra paslaptis, kaip ląstelė gamintoja apsisaugo nuo savo pačios bakteriocino, kol jie išsiskiria už ląstelės ribų. Ar ląstelės gamintojos turi unikalias imunines sistemas, užtikrinančias tiek vidinę, tiek išorinę apsaugą? Įrodyta, kad pernelyg didelė lakticino Q raiška (nesant jo biosintezės mechanizmo) sukelia viduląstelinį toksiškumą, kuris gali slopinti šeimininko ląstelių augimą (Iwatani et al., 2012). Taip pat įdomu, kaip šie bakteriocinai išskiriami į ekstraląstelinę erdvę, nes jie neturi daugeliui bakteriocinų būdingų transportavimo signalinių domenų. Neabejotina, kad bakteriocinai be lyderinės sekos yra labiausiai mįslinga ir menkai suprantama bakteriocinų grupė.

Pavyzdžiui, bakteriocinas geobacilinas 6 yra po transliacijos nemodifikuojamas ir neturi lyderinės sekos, jis gali būti priskiriamas II klasei, bakteriocinų be lyderinės sekos poklasiui. Sintetinis geo6A genas koduoja DNR seką su papildomu 6XHis aminorūgščių žymeniu N-gale ir TEV proteazės saito seka (1.2 pav.). Histidino liekanų žymuo įterptas tam, kad palengvinti baltymo gryninimą, o TEV proteazės saito seka tam, kad išgryninus baltymą, naudojant TEV proteazę, nukirpti 6 His liekanų žymenį (Koniuchovaitė, 2021). Daugiau savybių apie šį bakteriociną bus aprašyta šiame magistriniame darbe.



1.2 pav. Geo6 sintetinio peptido seka su papildomu 6 His aminorūgščių žymeniu ir TEV proteazės kirpimo saitu (Koniuchovaitė, 2021).

1.7. Bakteriocinų be lyderinės sekos biosintezės mechanizmai

Iki šiol labai nedaug žinoma apie bakteriocinų be lyderinės sekos biosintezės mechanizmus. Nors apie daugumos bakteriocinų genetinius determinantus jau pranešta tik lakticinų Q ir Z, aureocino A53 ir aureocino A70 atveju, eksperimentiniu būdu patvirtinti genai, atsakingi už jų sekreciją ir imunitetą (Netz et al., 2001; Iwatani et al., 2012; Nascimento Jdos et al., 2012; Coelho et al., 2014).

Nors anksčiau buvo pranešta, kad ABC tipo transporterio baltymas LmrB dalyvauja ir bakteriocino LsbB, ir bakteriocino LsbA sekrecijoje bei imunitete, tačiau akivaizdus bendras jų biosintezės mechanizmas išliko neišaiškintas. Nepaisant to, jau yra tyrimų, kuriose aprašomi numanomi bakteriocinų operonai, apibūdinantys daugumos bakteriocinų be lyderinės sekos genetinę organizaciją (Gajic et al., 2003). Enterocino L50 struktūros genai (L50A ir B) buvo užkoduoti 50 kb plazmidėje pCIZ1. Tuo tarpu enterocinas Q, kurį L50 padermė gamina kartu su enterocinu L50, yra užkodotas 7,4 kb plazmidėje pCIZ2 (Cintas et al., 1998; Cintas et al., 2000; Criado et al., 2006).

Nors enterocinas L50 jau buvo sėkmingai išreikštas bent dviejose mielių raiškos sistemose, jo gamyba buvo vykdoma per bendrus šeimininko sekrecijos kelius, o ne per jo paties genetinius determinantus (Basanta et al., 2009).

1.8. Termofilinės bakterijos

Natūrali anaerobinių termofilų aplinka varijuoja nuo sausumos vulkaninių vietų, kuriose temperatūra šiek tiek aukštesnė už aplinkos temperatūrą, iki povandeninių hidroterminių sistemų (nuosėdų, povandeninių ugnikalnių, fumarolų ir židinių), kuriose temperatūra viršija 300 °C, požeminių vietų, pavyzdžiui, naftos telkinių, ir saulės įkaitintų paviršinių dirvožemių, kuriuose temperatūra siekia 65 °C (Mehta et al., 2016). Mikroorganizmų gebėjimas išgyventi atšiauriomis sąlygomis paskatino mokslininkus tyrinėti šiuos organizmus, kad geriau suprastų jų savybes ir galiausiai panaudotų juos įvairioms reikmėms (Mehta et al., 2016).

Veiksniai, darantys įtaką termofilinių organizmų atsparumui karščiui:

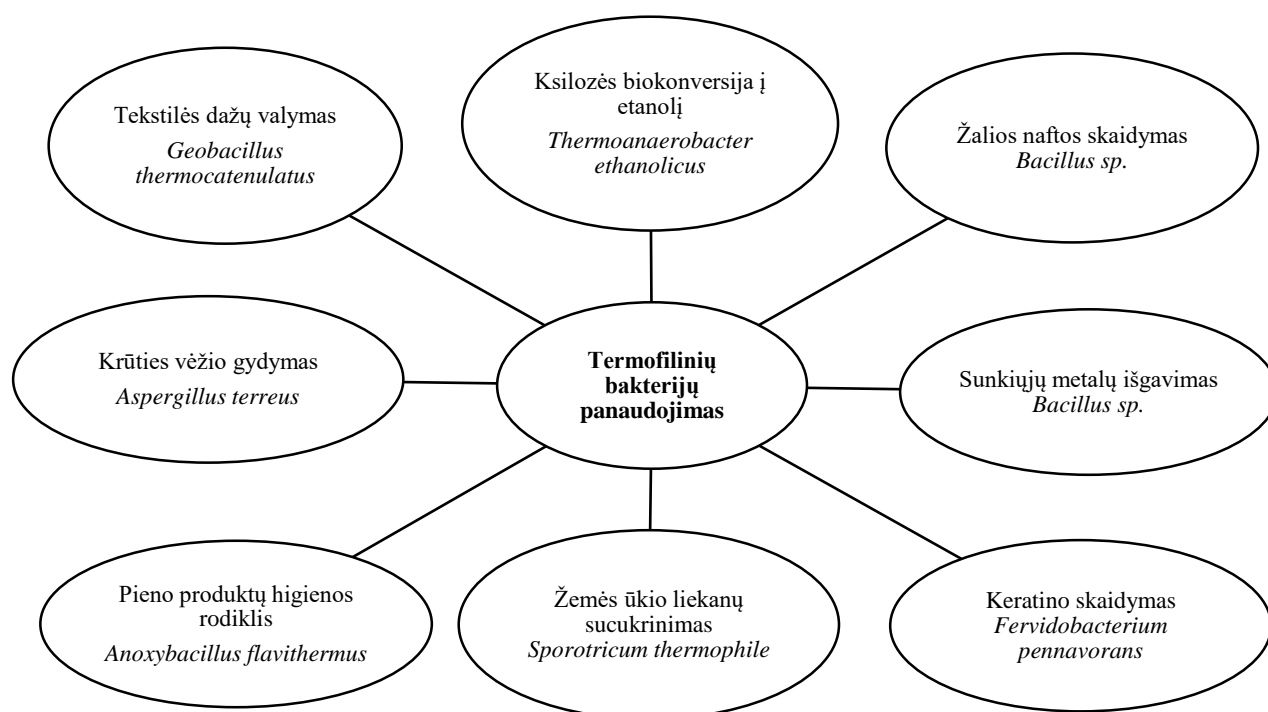
Pralaidumas: ląstelių membranos veiksmingai veikia kaip pralaidumo barjeras, kontroliuodamos mažos molekulinės masės junginių įtekėjimą ir ištekėjimą. Riebalų acilo esterių lipidų membranų pralaidumas labai priklauso nuo temperatūros, o jų fazinio perėjimo temperatūra priklauso nuo riebalų rūgščių sudėties, todėl, pasikeitus augimo temperatūrai, membranų lipidų riebalų rūgščių sudėtis greitai keičiasi.

Cheminis stabilumas: termofiliniai organizmai gali augti aukštoje temperatūroje dėl jų membranų lipidų cheminio stabilumo.

Temperatūra: lipidai, kurių kiekis didėja proporcingai didėjant augimo temperatūrai, gali būti vadinami „termofiliniais lipidais“. Itin termofilinėje aplinkoje aptinkama metanoarchėjų *Methanocaldococcus jannaschii*. Augimo temperatūrai pakilus nuo 45 °C iki 65 °C, dieterinių lipidų (archeolinių lipidų) sumažėja nuo 80 % iki 20 %, o standartinių kaldarchaeolinių ir ciklinių archeolinių lipidų padidėja atitinkamai nuo 10 % iki 40 %.

Baltymai: termofilinių baltymų paviršiaus srityse yra mažiau (neįkrautų) polinių aminorūgščių ir daugiau įkrautų aminorūgščių, o dėl šių įkrautų liekanų padidėja tarpmolekulinių druskų tiltelių skaičius.

Termofilai yra nepaprastai perspektyvūs, kalbant apie jų panaudojimą šiuolaikinėse biotechnologijose. 1.3 pav. pateikiama keletas svarbiausių šių termofilų panaudojimo būdų:

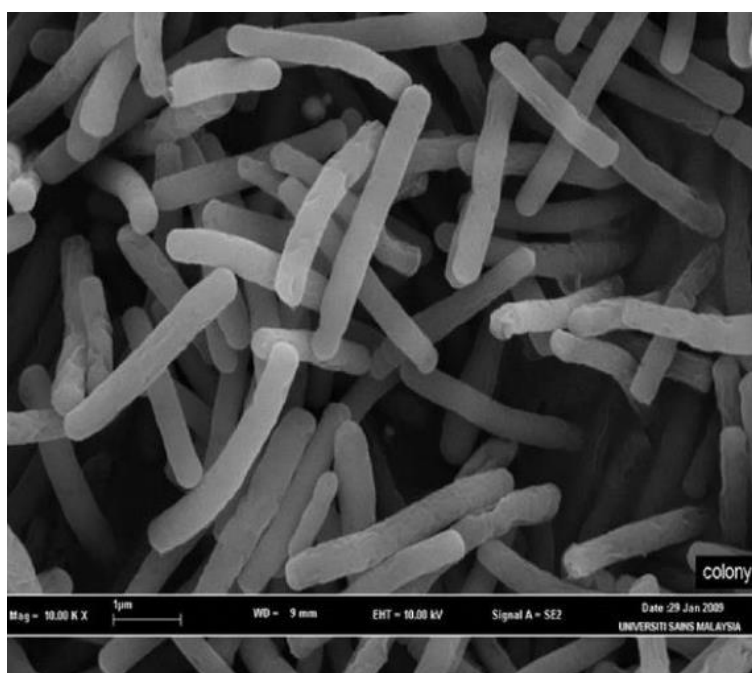


1.3 pav. Įvairus termofilinių mikroorganizmų taikymas (Mehta et al., 2016).

1.8.1. *Geobacillus sp.*

Geobacillus genčiai priklauso termofilinės bakterijos, galinčios augti 35-75 °C temperatūroje (1.4 pav.). Tai – nedidelės bakterijos, išskirtos iš įvairių šaltinių ant įprastinių terpių, pavyzdžiui, mitybinio agaro. *Geobacillus* rūšys, iš pradžių priskirtos *Bacillus* genties atstovams, 2001 m. buvo išskirtos kaip nauja gentis. Tačiau visų rūšių sekų panašumas rodo, kad bent kai kurios rūšys turi būti perklasifikuotos į genties lygmenį. Klasifikuojant ir identifikuojant termofilines bakterijas

galima naudoti ne tik 16S rRNA, bet ir pagrindinius genus, 16S-23S rRNA geno vidinį transkribuojamą tarpą ir pasikartojančias sekas. Dėl gebėjimo išgyventi ir augti aukštoje temperatūroje, taip pat dėl įvairių junginių panaudojimo ir sintezės, šios bakterijos ir jų produktai yra vertingi įvairiose srityse: maisto, popieriaus, biotechnologijų pramonėje, medicinoje, bioremediacijoje ir kt. Platus pritaikymo spektras skatina didesnę susidomėjimą fiziologinių ir biocheminių savybių tyrimams ir skatina naujų *Geobacillus* panaudojimo sričių, tokių kaip biodegalų gamyba, atsiradimą. Didėjantis energijos poreikis skatina kurti alternatyvias technologines galimybes. *Geobacillus* rūšys pademonstravo gebėjimą gaminti svarbius bioenergijos šaltinius, tokius kaip etanolis, izobutanolis, 2,3-butandiolis, biodyzelinas ir biodujos, arba didinti jų produktyvumą (Novik et al., 2019; Vaičiškaitė et al., 2020; Zebrowska et al., 2022).



1.4 pav. *Geobacillus thermodenitrificans* bakterijų nuotrauka, padaryta skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (Balan et al., 2012).

1.9. Bakteriocinų panaudojimas

Šiuo metu bakteriocinai gali būti naudojami ne tik maisto konservavimui, tačiau kaip perspektyvūs antimikrobiniai junginiai gydymo tikslais, bei veterinarijos ir kosmetologijos srityse.

1.9.1. Maisto konservavimas

Bakteriocinai galėtų būti plačiai naudojami maisto produktams konservuoti. Jų naudojimas maisto pramonėje, ypač pieno produktuose, kiaušiniuose, daržovėse ir mėsos produktuose, yra plačiai iširtas. Nizinas naudojamas daugiau kaip 48 šalyse ir yra patvirtintas MVA, o „Nisaplin“ parduodamas kaip natūrali maisto apsaugos priemonė. Jis yra veiksmingas, nes slopina įvairias gramteigiamas bakterijas, įskaitant daugelį svarbių per maistą plintančių ligų sukėlėjų, pavyzdžiui, *Listeria monocytogenes*, augimą. Jis daugiausia naudojamas konservuotuose maisto produktuose ir pieno produktuose, ypač veiksmingas gaminant lydytą sūrį ir užtepėles, kur apsaugo nuo karščiui atsparių sporas sudarančių organizmų, pavyzdžiui, *Bacillus* ir *Clostridium* genčių organizmų. Tai ypač svarbu *Clostridium botulinum* infekcijos prevencijos atveju, nes šios rūšies toksinas gali sukelti rimtų pasekmių. Daugelis bakteriocinų, pavyzdžiui, lakticinas 3147 ir lakticinas 481, vis dar nėra komercializuoti ir negali būti naudojami kaip natūralūs konservantai ir skonio stiprikliai (Negash and Tsehai, 2020). Pediocinas PA-1 yra plataus veikimo spektro bakteriocinas, ypač stipriai veikiantis *Listeria monocytogenes* ir naudojamas kaip maisto konservantas (Rodríguez et al., 2002). Bakteriocinai taip pat gali būti naudojami maisto kokybei ir juslinėms savybėms gerinti, pavyzdžiui, didinant proteolizės greitį arba apsaugant sūrį nuo dujų išsipūtimo defekto. Kitas bakteriocinų panaudojimo būdas – bioaktyvioji pakuotė, t. y. procesas, kuriuo galima apsaugoti maistą nuo išorinio užteršimo, o tai pagerina maisto saugą ir galiojimo laiką (Zacharof ir Lovitt, 2016).

1.9.2. Klinikinis pritaikymas

Peptinės opos gydymui taip pat gali būti naudojami bakteriocinai. Peptinės opos sukelia disbalansas tarp skrandžio ir dvylikapirštės žarnos gleivinės gynybinių mechanizmų ir žalingų skrandžio rūgšties bei pepsino poveikio, kartu su aplinkos ar imunologinių veiksnių pažeidimais. Anaerobinių *Helicobacter pylori* kiekis yra padidėjęs skrandžio ir dvylikapirštės žarnos opomis sergantiems pacientams. *Pediococcus acidilactici* BA28 bakteriocinas maksimaliai slopina *H. pylori*, sukeliančią peptinę opos ligą. Remiantis antimikrobinio aktyvumo profiliais, *P. acidilactici* BA28 gaminamus bakteriocinus siūloma naudoti vietinių asmens higienos priemonių, skirtų daugelio žmogaus ligų, ypač peptinių opų, profilaktikai ir gydymui, gamyboje (Kaur et al., 2012).

1.9.3. Priešnavikinės savybės

Bakteriocinai gali būti naudojami vėžio gydymui, nes slopina DNR ir membraninių baltymų sintezę, o tai sukelia naviko ląstelių apoptozę arba citotoksiškumą (Lopez-Cuellar et al., 2016). Bakteriocinas nizinas gali būti naujas potencialus terapinis vaistas galvos ir kaklo plokščialąstelinei karcinomai (HNSCC) gydyti, nes jis sukelia pirminę apoptozę, sustabdo ląstelių ciklą ir sumažina ląstelių proliferaciją HNSCC ląstelėse, palyginti su pirminiais keratinocitais (Negash and Tsehai, 2020). Buvo pranešta apie natūralų nizino variantą (nizinas ZP: 95 %), pasižymintį priešvėžiniu poveikiu *in vitro* ir *in vivo*. Nizinas ZP sukėlė didžiausią apoptozę HNSCC ląstelėse, palyginti su mažu kiekiu nizinu (2,5 %). HNSCC ląstelėms, apdorotoms didėjančiomis nizino ZP koncentracijomis, būdingas didėjantis apoptozės lygis ir mažėjantis ląstelių proliferacijos, klonogeniškumo ir sferų formavimosi lygis. Todėl nizino ZP pasižymi didesniu priešvėžiniu poveikiu nei mažos koncentracijos nizinas, todėl gali tapti nauju HNSCC gydymo metodu (Kamarajan et al., 2015). Taip pat, nizino vartojimas sumažino pelių, sergančių burnos vėžiu, navikų dydį (Yamada et al., 2004). Kitas svarbus *Enterococcus mundtii* padermės C4L10 bakteriocinas galėtų būti naudojamas kaip galimas antimikrobinis agentas ir antiproliferacinė medžiaga vėžio kontrolei. Vėžio ląstelių linijos, tokios kaip HSC3 burnos vėžys, MCF7 krūties vėžys, H1299 plaučių vėžys ir HCT116 storosios žarnos vėžys, pasižymėjo jautrumu tokiems bakteriocinams (Yusuf et al., 2015). *In vitro* tyrimai, atlikti su įvairiais audiniais ir modeliais, parodė, kad *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC 10770 gaminamas fermenticinas HV6b gali būti naudojamas kaip priešvėžinių vaistų terapijos sudedamoji dalis, nes nustatyta, kad jis sukelia vėžinių ląstelių apoptozę (Kaur et al., 2013).

1.9.4. Panaudojimas veterinarijos srityje

Veterinarijos pramonėje taip pat buvo tiriamas nizino kaip profilaktinio vaisto ir priemonės nuo galvijų mastito naudojimas (Wu et al. 2007). Galvijų mastitas yra liga, daranti didelį ekonominį poveikį pasaulio pieno pramonei, nes yra pagrindinė gyvulių augintojų ekonominių nuostolių priežastis (Perez et al., 2014). Pranešama, kad suleidus nizino pagrindu pagamintų injekcinių vaistų, beveik 99,9 % mastitą sukeliančių bakterijų, tokių kaip *Staphylococcus aureus* ir *Streptococcus agalactiae*, sunaikinama (Wu et al. 2007).

1.9.5. Kosmetologinis pritaikymas

Moksliniais tyrimais ir faktais pagrįsti pranešimai patvirtina prielaidą, kad tam tikri probiotikai gali prisidėti prie odos mikrofloros, lipidų barjero ir odos imuninės sistemos modifikavimo ir taip palaikyti odos homeostazę (Clinque et al. 2011). *Enterococcus faecalis* SL-5 gaminamas bakteriocinas SL5 buvo naudojamas kaip losjonas pacientams, sergantiems *Propionibacterium acnes* sukeltais uždegiminiais spuogų pažeidimais, ir, palyginti su placebo losjonu, žymiai sumažino uždegiminius pažeidimus ir spuogus (Kang et al., 2009).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Bakterijų kamienai ir auginimo sąlygos

Atliekant šį darbą buvo naudojamos VU GMC Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros mikroorganizmų kultūros kolekcijos kamienas *E. coli* BL21(DE3) su plazmide pET15-His-TEV-geo6. Kiti, šiame darbe naudojami bakterijų kamienai, nurodyti 1 – oje lentelėje.

1 lentelė. Bakterijų kamienai, prieš kuriuos buvo tikrinamas antibakterinis aktyvumas, bei jų auginimo terpės.

Rūšis	Kamienas	Auginimo terpė
<i>Aeribacillus pallidus</i>	DSM 3670 ^T	CASO
<i>Anoxybacillus tepidamans</i>	DSM 16315 ^T	
<i>Geobacillus gargensis</i>	DSM15378 ^T	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	DSM 13240	
<i>Geobacillus subterraneus</i>	DSM 13552 ^T	
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	DSM 730	
<i>Geobacillus debilis</i>	DSM 16016 ^T	
<i>Geobacillus uzenensis</i>	DSM 13551 ^T	
<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	TS24 ^A	
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	DSM 465 ^T	TGP
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	LB
<i>Bacillus subtilis</i>	168	
<i>Bacillus velezensis</i>	CH02	
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	CH07	

E. coli kamienas bei kiti mezofilinių bakterijų kamienai buvo auginti Luria-Bertani (LB) terpėje 37 °C temperatūroje 180 aps./min. Kiti darbe naudoti termofilinių bakterijų kamienai buvo auginti skystoje CASO terpėje, o *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T kamienas augintas

TGP skystoje terpėje 55 °C temperatūroje 200 aps./min. Darbe naudotų terpių sudėtys aprašytos 2 – lentelėje.

2 lentelė. Naudotos terpės.

Terpė	Terpės sudėtis
LB (Biolab)	10 g/L peptono 5 g/L mielių ekstrakto 10 g/L NaCl
MB	10 g/L peptono (Roth) 5 g/L mėsos ekstrakto (Merck) 5 g/L NaCl (Roth)
TGP	17 g/L triptono (Bacto) 3 g /L sojų peptono (Bacto) 5 g/L NaCl (Roth) 2,5 g/L K ₂ HPO ₄ (Roth)
CASO (Roth)	3g/L peptono 2,5 g/L K ₂ HPO ₄ 5 g/L NaCl 2,5 g/L gliukozės

E. coli kamienų auginimui naudota agarizuota LB (Biolab) terpė. Kitiems termofilinių bakterijų kamienams naudota CASO-Agar terpė. Agarizuotos TGP ir MB terpės buvo gaminamos pridėdant 15 g/L agarą (Oxoid). Po autoklavavimo į TGP agarizuotą ir neagarizuotą terpės buvo pridėdama sterilaus filtruoto piruvato (4 g/L), bei glicerolio (4g/L) .

2.2. Metodai

2.2.1. Bioinformatiniai įrankiai

Siekiant įvertinti baltymo erdvinę struktūrą, jo aminorūgščių seka buvo analizuojama bioinformatiniu įrankiu PSIPRED (nuoroda į internetinį puslapį:

<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/&uuid=4172371a-d9f6-11ec-9bdd-00163e100d53>).

Baltymo koncentracija buvo nustatoma matuojant absorbciją prie 280 nm, o perskaičiuojant jo koncentraciją buvo naudojamas bioinformatinis įrankis – ATT Bioquest (nuoroda į internetinį puslapį: <https://www.aatbio.com/tools/calculate-protein-concentration>).

2.2.2. Rekombinantinio baltymo biosintezė

E. coli raiškos kamienas BL21 (DE3) su plazmide pET15-His-TEV-geo6, kuri koduoja rekombinantinį bakteriociną Geo6, auginamas LB terpėje su ampicilinu (50 µg/mL), purtyklėje su aeracija ir 37 °C temperatūroje. Ląstelės auginamos, kol OT_{600nm} pasiekia 0,7 – 1,2. Pasiekus reikiamą kultūros optinį tankį genų raiška indukuojama terpę papildžius 1 mM IPTG. Ląstelių indukcija buvo vykdoma 3 valandas. Po indukcijos ląstelės surenkamos ir centrifuguojamos prie 5000×g, 20 min., 4 °C temperatūroje. Nucleifuguotos ląstelės suspenduojamos 50 mM NaH₂PO₄ 100mM NaCl buferyje (pH 7,4).

2.2.3. Tricininė NDS-PAGE-baltymų elektroforezė

Ši baltymų elektroforezė buvo atliekama pagal Schägger (2006). Baltymai išskirstomi poliakrilamido gelyje, naudojant 10 % skirstomąjį ir 4 % koncentruojamąjį gelius. Po elektroforezės gelis plaunamas dejonizuotu vandeniu 4 kartus po 10 min. Tada gelis nudažomas PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Fisher Scientific) dažų pagal gamintojo rekomendacijas. Atliekant elektroforezę kartu su mėginiais leidžiamas ir PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) baltymų standartas.

2.2.4. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas

Išgryninto bakteriocino antibakterinis aktyvumas vertinamas lašeliu metodu. Kamienai, prieš kuriuos tikrintas aktyvumas buvo auginami skystoje augimo terpėje iki OT_{600nm} 1,0. Tada ląstelės

sumaišomos su išlydyta agarizuota terpe, kad galutinis ląstelių OT terpėje būtų 0,1, ir išpilstomos į Petri lėkšteles. Lašelių metodas atliekamas kai ant sustingusios terpės lėkštelėje užlašinama po 10 µL mėginio (išgryninto bakteriocino), leidžiama išdžiūti. Lėkštelės su termofiliniais bakterijų kamienais per naktį inkubuojamos prie 55 °C, o mezofilinių - 37 °C temperatūroje. Kontrolėms naudojamas buferis 20 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4). Tikrinant aktyvumą šulinėliu metodu, lėkšteleje iškerpami šulinėliai pipetmano antgaliu ir į šulinėlį įpilama 50 µL mėginio.

2.2.5. Baltymų koncentravimas silika geliu C18ce

Baltymo koncentravimui naudota Macherey-Nagel CHROMABOND C18ec kolonėle. Pirmiausia kolonėlė praplaunama 3 mL vandeniu, vėliau ant jos užnešamas 3 mL ACN (acetonitrilo) 100% tirpalas. Kai kolonėlė praplaunama su ACN 100%, užnešamas mėginys. Po mėginio užnešimo kolonėlė plaunama 3 mL ACN 5%. Baltymai nuo kolonėlės eliuojami 3 mL ACN 75%.

2.2.6. Baltymų koncentravimas metanolium ir chloroformu

Baltymai koncentruoti atliekant baltymų ekstrahciją chloroformu ir metanolium pagal Wessel ir Flügge (1984). 100 µL tiriamojo mėginio (1,5 mL tūrio ependorfe) sumaišoma su 400 µL metanolio ir išvorteksuojama. Tada įpilama 300 µL H₂O ir 100 µL chloroformo, labai gerai išvorteksuojama. Susidrumstęs mėginys išvorteksuojamas ir centrifuguojamas 14000×g 1 min. Susiformuoja trys sluoksniai, su pipetmanu nusiurbiamas viršutinis sluoksnis, nepaliekiant baltymų – vidurinio sluoksnio. Į ependorfą su likusiu apatiniu sluoksniu ir baltymais įpilama 400 µL metanolio, išvorteksuojama ir tada centrifuguojama 20000×g 5 min. Pašalinama kiek galima daugiau metanolio nepaliekiant nuosėdų ir džiovinama.

2.2.7. Bakteriocino stabilumo įvertinimas skirtingose pH reikšmėse ir temperatūrose

Išgryninto bakteriocino stabilumas skirtingose pH reikšmėse ir temperatūrose buvo atliekamas šulinėliu metodu naudojant indikatorinį kamieną *G. thermodenitrificans* DSM 465^T.

Bakteriocino stabilumo įvertinimas įvairiose temperatūrose atliekamas 1,5 mL tūrio ependorfe, 50 µL mėginio inkubuojama 60°C, 80°C, 100°C temperatūrose 2 valandas. Po inkubacijos atliekami serijiniai skiedimai, skiedžiant po du kartus, naudojant 20 mM NaH₂PO₄ buferį (pH 7,4). Mėginiai išpilstomi į šulinelius po 50 µL.

Bakteriocino stabilumo įvertinimas įvairiose pH reikšmėse buvo atliekamas taip pat 1,5 mL tūrio ependorfe. 10 µL baltymo sumaišoma su 182,5 µL H₂O bei 1 M buferiniu tirpalu (3 lentelė). Po sumaišymo mėginys inkubuojamas 2 valandas. Tuomet mėginys neutralizuojamas su 250 µL 1 M NaH₂PO₄ buferiniu tirpalu (pH 7) bei įpilama 750 µL H₂O. Atliekami serijiniai skiedimai skiedžiant du kartus, naudojant TGP terpę. Toliau mėginai išpilstomi į šulinėlius po 50 µL. Lėkštelės inkubuojamos 55 °C temperatūroje per naktį. Kontrolėms vietoje baltymo naudojamas 20 mM NaH₂PO₄ buferis (pH 7,4). Baltymo aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę: $AU/mL=2^n \times 1mL/V$. N - (didžiausias skiedimas prie kurio gautas aktyvumas), V - (mėginio tūris į šulinėlį).

3 lentelė. Darbe naudoti pH buferiai.

pH	Sudėtis
4	1M natrio acetatas
5	1M natrio acetatas
6	1M natrio fosfatas
7	1M natrio fosfatas
8	1M tris - HCl
9	1M tris - HCl
10	1M natrio karbonatas

2.2.8. Baltymų gryninimas

2.2.8.1. Ni²⁺ afininė chromatografija

Geo6 bakteriocinas buvo grynintas Ni²⁺ afininės chromatografijos metodu iš ląstelių lizato tirpios baltymų frakcijos. Po indukcijos surinktos ląstelės suspenduojamos 25 mM NaH₂PO₄ buferiu su 500 mM NaCl ir 500 mM imidazolo, pH 7,4. Ląstelės toliau ardamos sonikuojant ultragarsu (SONICS – Vibra cell) 5 minutes, naudojant parametrus: 35% amplitudė, 5 sek. ON, 10 sek. OFF. Po sonikavimo suardytos ląstelės centrifuguojamos prie 18000×g 5 min. Toliau, po ląstelių ardymo ultragarsu buvo atskirta tirpi baltymų frakcija, iš kurios vėliau gryninamas His-TEV-Geo6 peptidas, kuriame yra TEV proteazės kirpimo saitas, skiriantis 6-į histidino aminorūgščių žymenį nuo Geo6 bakteriocino peptido. Gryninimas vykdomas naudojant HisTrap 1 mL (GE) kolonėlę ir vidutinio slėgio skysčių chromatografijos sistemą BioLogic DuoFlow (Bio-Rad). Pirmiausia, kolonėlė ekvilibruojama naudojant 25 mM NaH₂PO₄ buferį su 500 mM NaCl, pH 7,4. Po ekvilibracijos ant kolonėlės užnešamas mėginys suspenduotas tame pačiame buferyje. Po mėginio užnešimo kolonėlė praplaunama su 25 mM NaH₂PO₄ buferiu su 500 mM NaCl ir 20 mM imidazolo, pH 7,4. Tuomet

vykdoma baltymo eliucija nuo kolonėlės naudojant 25 mM NaH₂PO₄ buferį su 500 mM NaCl ir 500 mM imidazolo, pH 7,4.

2.2.8.2. Nudruskinimas

Po gryninimo Ni²⁺ afininės chromatografijos metodu, His-TEV-Geo6 baltymas yra nudruskinamas gelchromatografijos metodu, naudojant HiTrap 5 mL (GE) ir skysčių chromatografijos sistemą BioLogic DuoFlow (Bio-Rad). Baltymas buvo nudruskintas naudojant 50 mM NaH₂PO₄ buferį su 100 mM NaCl, pH 7,4.

2.2.8.3. Karpymas su TEV proteze

Išgrynintas ir jau nudruskintas peptidas, buvo karpomas naudojant TEV proteazę, kad nukirpti 6 His žymenį. Šio peptido karpymo sąlygos jau buvo nustatytos, todėl His-TEV-Geo6A peptidas buvo karpomas su žinoma TEV proteazės koncentracija. Į 2 mL reakcijos mišinį buvo dedama 166,6 µg TEV proteazės (4,13 mg/mL). Reakcijos mišinys papildomas 5 mM DTT ir inkubuojamas 37 °C temperatūroje 3 valandas.

2.2.8.4. Katijonų mainų chromatografija

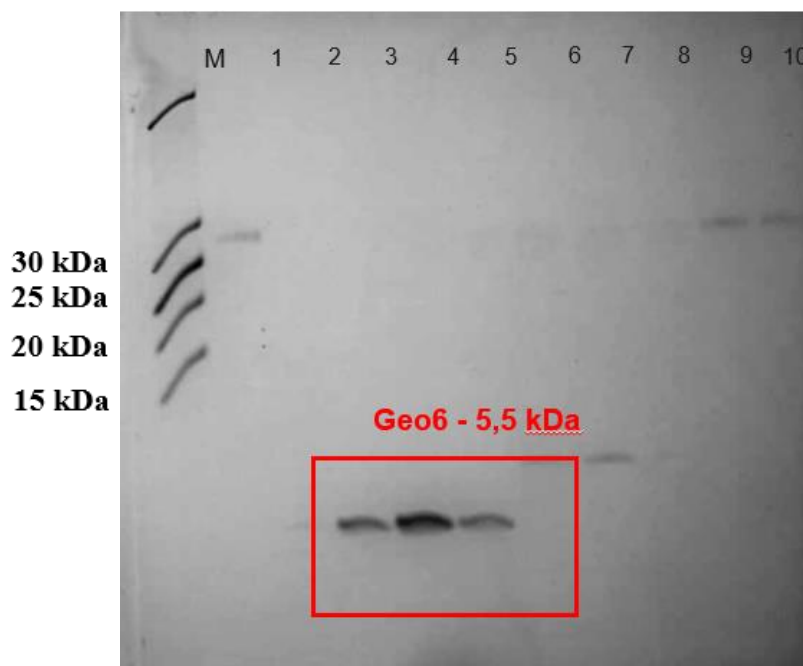
Po His-Tev-Geo6 peptido karpymo naudojant TEV proteazę, reakcijos mišinys buvo gryninamas katijonų mainų chromatografijos metodu, kad atskirti Geo6 peptidą nuo proteazės. Jonų mainų chromatografija buvo vykdoma naudojant UNO S-1 1 mL (Bio-Rad) kolonėlę ir vidutinio slėgio skysčių chromatografijos sistemą BioLogic DuoFlow (Bio-Rad). Pirmiausia, kolonėlė ekvilibruojama naudojant 20 mM NaH₂PO₄ buferį, pH 7,4. Po ekvilibracijos ant kolonėlės užnešamas mėginys suspenduotas tame pačiame buferyje. Po mėginio užnešimo kolonėlė praplaunama su 20 mM NaH₂PO₄ buferiu pH 7,4. Tuomet vykdoma baltymo eliucija nuo kolonėlės linijiniu gradientu naudojant 20 mM NaH₂PO₄ buferį su 1 M NaCl, pH 7,4.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Geo6 biosintezė ir gryninimas

Geo6 bakteriocinas buvo identifikuotas *P. thermoglucosidasius* DSM 2542 termofilinės bakterijos genome ir pirmieji darbai su šiuo bakteriocinu buvo pradėti dar 2019 m. Vilniaus universiteto magistrantės Anos Koniuchovaitės. Studentės darbų metu Geo6 koduojantis genas buvo įklonuotas į pET15 raiškos vektorių heterologinei biosintezei *E. coli* BL21(DE3) ląstelėse.

Ankstesnių darbų metu buvo gaunama maža baltymo išeiga, todėl pirmame šio darbo etape siekėme išgauti kuo didesnę rekombinantinio Geo6 baltymo kiekį, todėl buvo stengtasi parinkti optimalias baltymo indukcijos sąlygas didžiausiai bakteriocino išeigai gauti. Po baltymo indukcijos ląstelės buvo suardytos sonikuojant ultragarsu (SONICS – Vibra cell) ir išgrynintas Ni²⁺ afininės chromatografijos ir gelchromatografijos metodais. Toliau, baltymas His-TEV-geo6A buvo karpomas TEV proteaze, nukirpti His žymenį. Po karpymo, baltymas išgrynintas katijonų mainų chromatografijos metodu naudojant baltymų chromatografijos sistemą (3.1 pav.).



3.1 pav. Tricininė NDS-PAGE analizė po baltymo gryninimo jonų mainų chromatografijos metodu.

2-5 – surinktos eliucijos frakcijos su išgrynintu Geo6 peptidu. 6-10 – kitos eliucijos frakcijos.

Teorinis Geo6 baltymo dydis su nukiprtu His žymeniu yra 5,5 kDa.

Iš viso šiame darbe heterologinė biosintezė ir Geo6 gryninimas buvo daromi 4 kartus, keičiant optinį tankį prie kurio indukuojama baltymo biosintezė. Tokiu būdu buvo siekiama išgryninti

didesnį peptido kiekį. Ląstelės buvo indukuojamos prie 0,7-1,2 OT. Visus kartus buvo gautos skirtingos peptido koncentracijos (4 lentelė). Toliau, po gryninimo chromatografijos metodais bandėme baltymą sukcentruoti silika geliu - C18ce, bei metanolio – chloroformu. Gauti rezultatai parodė, kad šie koncentravimo metodai netinkami, nes po koncentravimo prarandama didelė dalis baltymo - mėginio aktyvumas sumažėja.

Palyginus visų gryninimų koncentracijas galima daryti prielaidą, jog prie didesnio OT gaunama ir didesnė peptido koncentracija. Frakcijos su sukarpytu ir išgrynintu peptidu buvo naudojamos tolimesniuose eksperimentuose. Didžiausias išgryninto baltymo kiekis iš 1 L bakterijų kultūros, indukuojant prie 1,2 OT, buvo gautas 159,8 nmol (viso 1.5 mL).

4 lentelė. Išgryninto Geo6 koncentracijų vidurkis prie skirtingo OT.

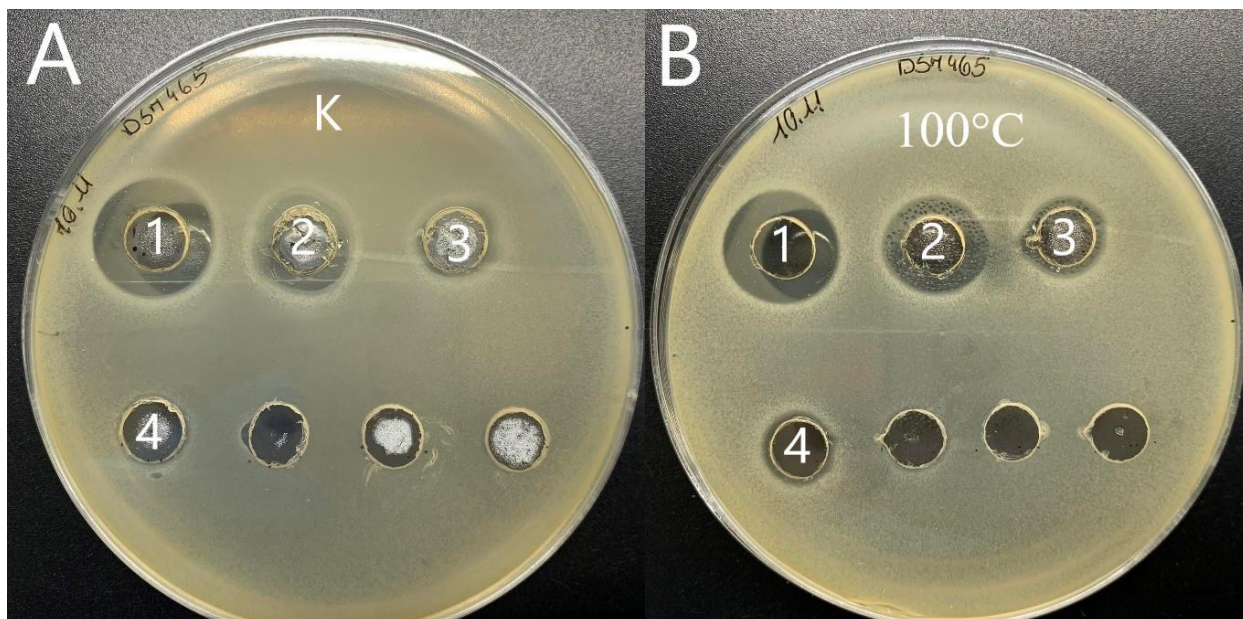
OT	Koncentracija (nmol)
0,7	21,61
0,8	29
1	31
1,2	159,8

3.2. Bakteriocino stabilumo įvertinimas temperatūrose ir pH reikšmėse

Išgryninus pakankamą baltymo kiekį toliau atlikome eksperimentus įvertinti bakteriocino stabilumui įvairiose temperatūrose. Stabilumo įvertinimui buvo naudojamas indikatorinis *G. thermodenitrificans* DSM 465^T kamienas, atliekamas šulinėlių metodas. Stabilumas buvo vertinamas kambario temperatūroje bei 60°C, 80°C, 100°C temperatūrose. Gauti rezultatai parodė, kad Geo6 bakteriocinas išlieka stabilus visose tirtose temperatūrose (5 lentelė). Lyginant su kontrole, kuomet aktyvumas buvo 5120 AU/mL, po inkubacijos 100 °C temperatūroje 2 val. aktyvumas išliko toks pats – 5120 AU/mL (3.2 pav.).

5 lentelė. Bakteriocino stabilumo įvertinimas % skirtingose temperatūrose.

Sąlygos	Stabilumas %
Kontrolė - neinkubuotas.	100 %
60 °C, 2 val.	100%
80 °C, 2 val.	100 %
100 °C, 2 val.	100 %

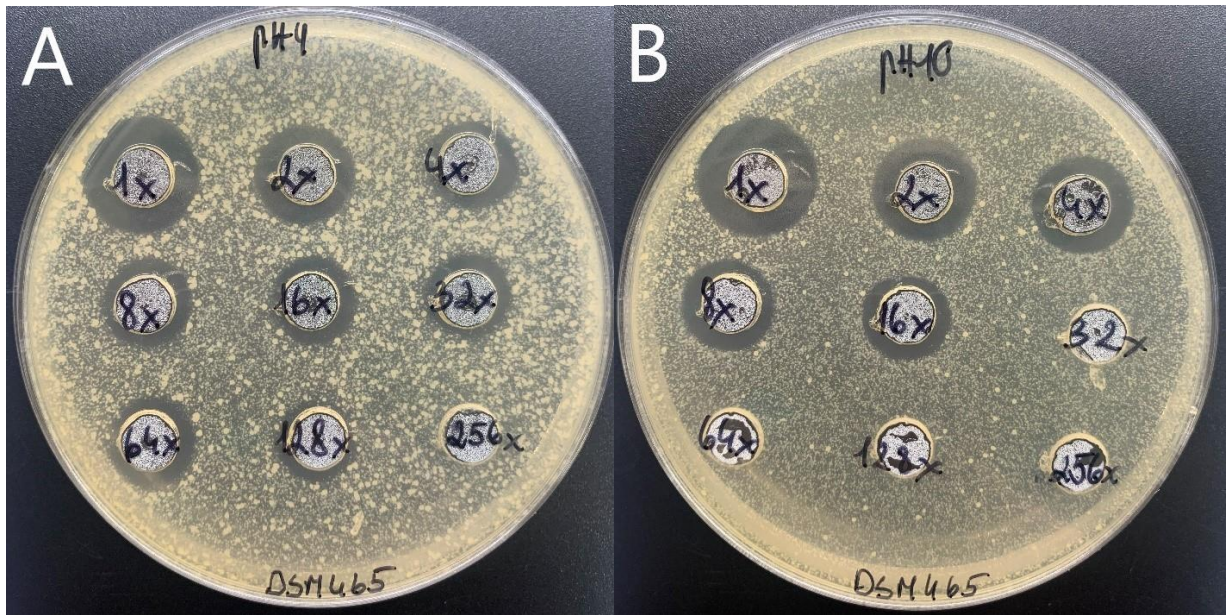


3.2 pav. Geobacillus temperatūrinio stabilumo vertinimas šulinėliu metodu A - kambario temperatūroje, B - 100°C .

Toliau siekiant įvertinti bakteriocino stabilumą įvairiuose pH, bakteriocinas buvo inkubuojamas su skirtingais buferiais (6 lentelė), po to buvo vertinamas jo likęs aktyvumas. Gauti rezultatai parodė, jog nuo pH 4 iki pH 6 rūgštinėje terpėje Geobacillus bakteriocino aktyvumas didžiausias ir nesikeičia – lieka 100 % lyginant su kontrole. Inkubuojant pH 7 buferyje bakteriocino aktyvumas pradėjo mažėti ir liko 75 % lyginant su kontrole, tuo tarpu inkubuojant prie pH 8 – aktyvumas sumažėjo iki 50 %. Daugiausiai aktyvumas sumažėjo po inkubacijos buferiuose su pH 9 ir pH 10, liko tik 25 % pradinio aktyvumo. Galima daryti prielaidą, jog Geobacillus didžiausias stabilumas yra rūgštiniame pH (3.3 pav.), o tuo tarpu šarminiame jis mažėja.

6 lentelė. Bakteriocino aktyvumo įvertinimas pH ribose.

pH	Aktyvumas %
4	100%
5	
6	
7	75%
8	50%
9	25%
10	



3.3 pav. Geo6 stabilumas pH ribose šulinėliu metodu A - pH 4, B - pH 10.

Svarbu paminėti, jog kitiems šio poklasio bakteriocinams pH ir temperatūros stabilumas nebuvo tiriamas. Be lyderinės sekos bakteriocinai yra mažai tirta sritis ir kad tiksliau įvertinti jų veikimą bei pritaikymo galimybes, reiktų atlikti daugiau tyrimų, ir patikrinti šių baltymų aktyvumą prieš dar didesnę mikroorganizmų kiekį.

3.3. Bakteriocino antrinės struktūros įvertinimas

Siekiant įvertinti baltymo erdvinę struktūrą jo aminorūgščių seka buvo analizuojama bioinformatiniu įrankiu PSIPRED. Gauti rezultatai parodė, kad baltymas 90 % yra α spiralinėje struktūroje. Ši analizė taip pat parodė, kad per visą baltymą yra suformuojamos 3 baltymo α struktūros. Didžiausia iš jų – N- baltymo gale, o mažiausia – centrinėje baltymo dalyje (3.4 pav.).



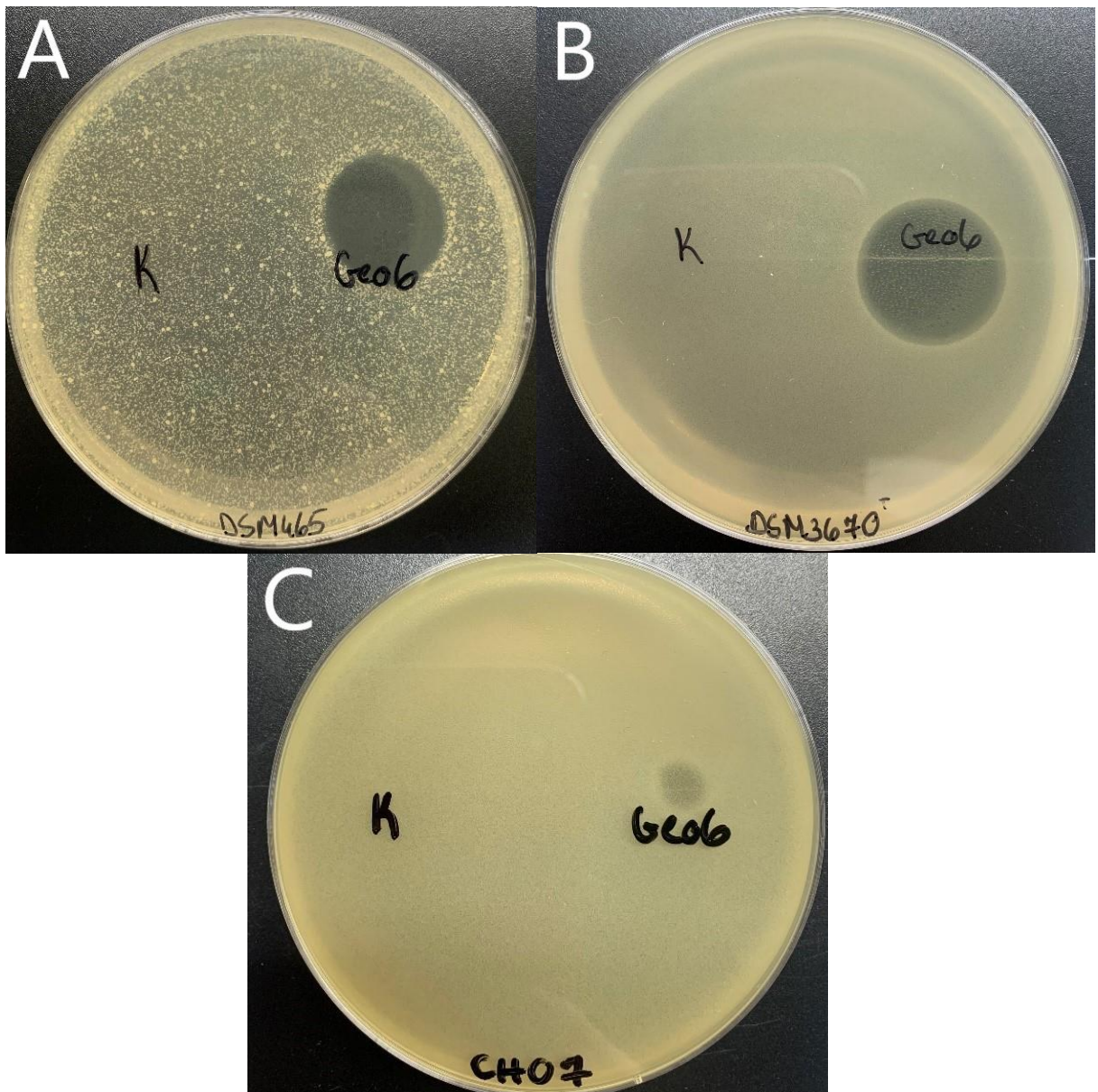
3.4 pav. Bakteriocino Geo6 struktūrinė bioinformatinė analizė (nuoroda į internetinę svetainę: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/&uuid=4172371a-d9f6-11ec-9bdd-00163e100d53>).

3.4. Geo6 antibakterinio aktyvumo įvertinimas prieš termofilines ir mezofilines bakterijas

Toliau buvo tikrinamas Geo6 antibakterinis aktyvumas prieš įvairias bakterijas lašelių metodu. Peptido aktyvumas buvo tikrinamas prieš 14 indikatorinių termofilinių ir mezofilinių bakterijų (7 lentelė, 3.5 pav.). Tyrimas parodė, kad iš 10 tikrintų termofilinių kamienų tik 5 iš jų buvo jautrūs Geo6. Tuo tarpu vertinant inhibicines zonos skersmenį, didžiausias bakteriocino antibakterinis aktyvumas buvo stebimas prieš termofilines bakterijas: *Aeribacillus pallidus* DSM 3670^T, *Geobacillus debilis* DSM 16016^T, *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T. Tyrimas parodė, kad bakteriocinas veikia ir prieš vieną iš tikrintų mezofilinių bakterijų – *Bacillus zanthoxyli* CH07, tačiau aktyvumas nebuvo didelis, lyginant su termofilinėmis bakterijomis. Šis tyrimas parodė, jog Geo6 veikia ne tik prieš tos pačios genties bakterijas, bet ir prieš kitos genties termofilines bakterijas – *Aeribacillus pallidus* DSM 3670^T, bei kai kurias mezofilines bakterijas – *Bacillus zanthoxyli* CH07.

7 lentelė. Geo6 peptido antibakterinis aktyvumas lašelių metodu. ++ didelis aktyvumas; + vidutinis aktyvumas; ± mažas aktyvumas; – nėra aktyvumo.

Rūšis	Kamienas	Jautrumas Geo6 bakteriocinui
<i>Aeribacillus pallidus</i>	DSM 3670 ^T	++
<i>Anoxybacillus tepidamans</i>	DSM 16315 ^T	-
<i>Geobacillus gargensis</i>	DSM 15378 ^T	+
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	DSM 13240	±
<i>Geobacillus subterraneus</i>	DSM 13552 ^T	-
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	DSM 730	-
<i>Geobacillus debilis</i>	DSM 16016 ^T	++
<i>Geobacillus uzenensis</i>	DSM 13551 ^T	-
<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i>	TS24 ^A	-
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	DSM 465 ^T	++
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	-
<i>Bacillus subtilis</i>	168	-
<i>Bacillus velezensis</i>	CH02	-
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	CH07	+



3.5 pav. Išgryninto Geo6 antibakterinis aktyvumas naudojant lašelių metodą - prieš termofilines bakterijas (A, B) prieš mezofilines bakterijas – C. K – kontrolė (buferis).

3.5. Apibendrinimas

Taigi, šiame darbe yra aprašomas Geo6 bakteriocinas kurio molekulinė masė 5,5 kDa. Bakteriocinas buvo susintetintas heterologinės biosintezės būdu *E. coli* ląstelėse ir išgrynintas baltymų chromatografijos metodais. Tyrimo metu buvo sėkmingai atrinktos sąlygos pasiekti didesnei baltymo išeigai, didžiausias išgryninto baltymo kiekis buvo gaunamas indukuojant ląsteles prie 1,2 OT. Bakteriocino stabilumo įvertinimas šulinėliu metodu parodė, kad Geo6 baltymas yra stabilus plačiame temperatūrų diapozone, be to, galima daryti prielaidą, jog Geo6 didžiausias stabilumas ya

rūgštiniame pH, o tuo tarpu šarminiame jis mažėja. Įvertinus baltymo erdvinę struktūrą, išsiaiškinta, jog baltymas 90 % yra α spiralinėje struktūroje. Taip pat, palyginus su prieš tai buvusio tyrimo rezultatais (Anos K. magistro baigiamasis darbas), kurie parodo, kad Geo6 bakteriocinas veikia tik prieš kai kurias tos pačios genties bakterijas, šiame tyrime buvo parodyta, jog Geo6 veikia ir prieš kitos genties termofilines bakterijas *Aeribacillus pallidus* DSM 3670T, bei kai kurias mezofilines bakterijas - *Bacillus zanthoxyli* CH07. Apibendrinus galima teigti, jog bakteriocinai be lyderinės sekos yra mažai tiriama sritis, ir kad tiksliau įvertinti jų veikimą, bei pritaikymo galimybes, reikėtų atlikti daugiau tyrimų, ir patikrinti šių baltymų aktyvumą prieš dar didesnę mikroorganizmų kiekį.

IŠVADOS

1. Didžiausia išgryninto baltymo išeiga 159,8 nmol/mL pasiekama indukuojant ląsteles prie 1,2 OT.
2. Buvo nustatyta, kad baltymas yra termostabilus ir išlaiko stabilumą 100°C temperatūroje. Taip pat įvertinta, kad baltymo didžiausias stabilumas rūgštiniame pH 4-6, o nuo pH 7 jo stabilumas krenta.
3. Įvertinus bakteriocino erdvinę struktūrą bioinformatiniais įrankiais išsiaiškinta, kad baltymas 90 % yra α spiralinėje struktūroje. Atlikti matavimų su CD spektrometrija nepavyko, nes prietaisas buvo neprieinamas.
4. Priešingai nei praeito tyrimo metu, buvo parodyta, kad bakteriocinas veikia ir prieš kitos genties termofilines bakterijas - *Aeribacillus pallidus* DSM 3670^T, bei kai kurias mezofilines bakterijas - *Bacillus zanthoxyli* CH07.

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovui dr. Arnoldui Kauniečiui už kantrybę, vertingus patarimus laboratorijoje, bei už visus komentarus ir pagalbą rašant magistrinį darbą.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Akvilė Petkevičiūtė
Magistro baigiamasis darbas

NAUJO BAKTERIOCINO GEOBACILINAS 6 BIOSINTEZĖ IR CHARAKTERIZAVIMAS

SANTRAUKA

Šiais laikais vartotojams kelia susirūpinimą maisto priedai, bei jų nenatūralumas, o perdirbtų produktų, nepridedant jokių cheminių konservantų, nauda sveikatai tampa vis patrauklesnė. Viena iš alternatyvų šiam susirūpinimui spręsti yra antibakterinių peptidų sintezė, kurie dar žinomi kaip bakteriocinai. Bakteriocinai – tai antimikrobiniai peptidai sintetinami bakterijos ribosomų ir pasižymintys antibakteriniu aktyvumu prieš bakteriociną sintetinančiai bakterijai artimas ar tolimesnes bakterijų rūšis. Bakteriocinai pasižymi daugeliu teigiamų savybių, dėl kurių jie ypač įdomūs įvairiose srityse. LAB bakteriocinai yra stabilesni aukštose temperatūrose ir pasižymi aktyvumu plačiose pH ribose. Šie antimikrobiniai peptidai taip pat yra bespalviai, bekvapiai ir beskoniai, o tai dar labiau padidina jų panaudojimo galimybes. Šiuo metu bakteriocinai gali būti naudojami ne tik maisto konservavimui, tačiau ir kaip perspektyvūs antimikrobiniai junginiai gydymo tikslais, bei veterinarijos ir kosmetologijos srityse.

Šio darbo metu buvo siekiama charakterizuoti naują bakteriociną geobaciliną 6 (Geo6). Bakteriocinas geobacilinas 6, koduojamas geo6 genų klasteryje, kurio molekulinė masė 5,5 kDa, buvo susintetintas heterologinės biosintezės būdu *E. coli* ląstelėse ir išgrynintas baltymų chromatografijos metodais. Gauti rezultatai parodė, kad Geo6 bakteriocinas išlieka stabilus visose tirtose 60°C, 80°C, 100°C temperatūrose, be to, nuo pH 4 iki pH 6 rūgštinėje terpėje Geo6 bakteriocino aktyvumas didžiausias ir nesikeičia - lieka 100 % lyginant su kontrole. Be to, galima daryti prielaidą, jog Geo6 didžiausias stabilumas yra rūgštiniame pH, o tuo tarpu šarminiame jis mažėja. Įvertinus baltymo erdvinę struktūrą, išsiaiškinta, jog baltymas 90 % yra α spiralinėje struktūroje. Taip pat, palyginus su prieš tai buvusio tyrimo rezultatais (Anos K. magistro baigiamasis darbas), kurie parodo, kad Geo6 bakteriocinas veikia tik prieš kai kurias tos pačios genties bakterijas, šiame tyrime buvo parodyta, jog Geo6 veikia ir prieš kitos genties termofilines bakterijas *Aeribacillus pallidus* DSM 3670^T, bei kai kurias mezofilines bakterijas - *Bacillus zanthoxyli* CH07.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Akvilė Petkevičiūtė
Master thesis

**BIOSYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NOVEL BACTERIOCIN
GEOBACILLIN 6**

SUMMARY

Consumers today are concerned about food additives, unnaturalness, and the health benefits of processed. Products without the addition of any chemical preservatives are becoming more and more attractive. Possible alternative to address this concern is the synthesis of antibacterial peptides, also known as bacteriocins. Bacteriocins are antimicrobial peptides synthesised by the ribosomes of a bacterium and have antibacterial activity against bacterial species close to or distant from the bacteriocin-synthesising bacterium. Bacteriocins have a high number of beneficial properties that make them of particular interest in various fields. LAB bacteriocins are more stable at the high temperatures and exhibit higher activity rate over a wide pH range. These antimicrobial peptides are also colourless, odourless and tasteless, which further increases their potential applications. Bacteriocins can now be used not only for food preservation, but also as promising antimicrobial compounds for therapeutic purposes, veterinary and cosmetological applications.

The aim of this thesis was to characterise the new bacteriocin geobacillin 6 (Geo6). The bacteriocin geobacillin 6, encoded by the *geo6* gene cluster, with a molecular mass of 5.5 kDa, was synthesised by heterologous biosynthesis in *E. coli* cells and purified by protein chromatography methods. The results showed that Geo6 bacteriocin remains stable at all tested temperatures, 60°C, 80°C, 100°C, and that from pH 4 to pH 6 in acidic media the activity of Geo6 bacteriocin is maximal and remains unchanged at 100 % compared to the control. Furthermore, it can be assumed that Geo6 has the highest stability at acidic pH, whereas it decreases at alkaline pH. The spatial structure of the protein has been evaluated and it is found that 90% of the protein is in an α -helical structure. Also, in comparison with the results of a previous study (Master's thesis of Anna K.), which showed that Geo6 bacteriocin acts only on some bacteria of the same genus. In the present study it was showed that Geo6 also acts on a thermophilic bacterium of a different genus, *Aeribacillus pallidus* - DSM 3670^T, and on some mesophilic bacteria - *Bacillus zanthoxyli* CH07.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O.P., 2016. Bacteriocins of lactic acidbacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., Cotter, P.D., Craik, D.J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P.C., Entian, K.-D., Fischbach, M.A., Garavelli, J.S., Göransson, U., Gruber, C.W., Haft, D.H., Hemscheidt, T.K., Hertweck, C., Hill, C., Horswill, A.R., Jaspars, M., Kelly, W.L., Klinman, J.P., Kuipers, O.P., Link, A.J., Liu, W., Marahiel, M.A., Mitchell, D.A., Moll, G.N., Moore, B.S., Müller, R., Nair, S.K., Nes, I.F., Norris, G.E., Olivera, B.M., Onaka, H., Patchett, M.L., Piel, J., Reaney, M.J.T., Rebuffat, S., Ross, R.P., Sahl, H.-G., Schmidt, E.W., Selsted, M.E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T., Süßmuth, R.D., Tagg, J.R., Tang, G.-L., Truman, A.W., Vederas, J.C., Walsh, C.T., Walton, J.D., Wenzel, S.C., Willey, J.M., van der Donk, W.A., 2013. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep* 30, 108–160. <https://doi.org/10.1039/C2NP20085F>
- Balan A., Ibrahim D., Abdul Rahim R., Ahmad Rashid F.A., 2012. Purification and Characterization of a Thermostable Lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL- nra, *Enzyme Research* 2012: 1–7. doi: 10.1155/2012/987523
- Balciunas, E.M., Castillo Martinez, F.A., Todorov, S.D., Franco, B.D.G. de M., Converti, A., Oliveira, R.P. de S., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>
- Basanta, A., Herranz, C., Gutiérrez, J., Criado, R., Hernández, P. E., and Cintas, L. M. (2009). Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting the leaderless enterocin L50 peptides L50A and L50B from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2382–2392. doi: 10.1128/AEM.01476-08
- Bemena L. D., Mohamed L. A., Fernandes A. M., and Leel B. H., 2014. Applications of bacteriocins in food, livestock health, and medicine. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 3, no. 12, pp. 924–949.
- Blaszczyk, U., Moczarny, J., 2016. Bacteriocins of gram-negative bacteria—structure, mode of action and potential applications, *Postepy Mikrobiologii*, vol. 55, no. 2, pp. 157–171.

- Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., Dicks, L.M., 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology* 49, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
- Cinque B., Torre C.L., Melchiorre E., *et al.* 2011. ‘Use of Probiotics for Dermal Applications’, in Liong, M.-T. (ed.) *Probiotics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Microbiology Monographs), pp. 221–241. doi:10.1007/978-3-642-20838-6_9
- Cintas, L. M., Casaus, P., Herranz, C., Havarstein, L. S., Holo, H., Hernandez, P. E., *et al.*, 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. doi: 10.1128/Jb.182.23.6806-6814.2000
- Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, 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
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8)
- Coelho, M. L. V., Coutinho, B. G., Cabral da Silva Santos, O., Nes, I. F., and Bastos, M. d. C. d. F., 2014. Immunity to the *Staphylococcus aureus* leaderless four-peptide bacteriocin aureocin A70 is conferred by AurI, an integral membrane protein. *Res. Microbiol.* 165, 50–59. doi: 10.1016/j.resmic.2013.11.001
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, no. 10, pp. 777–788, doi:10.1038/nrmicro1273
- Criado, R., Diep, D. B., Aakra, Å, Gutiérrez, J., Nes, I. F., Hernández, P. E., *et al.*, 2006. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6653–6666. doi: 10.1128/AEM.00859-06
- Criado, R., Gutierrez, J., Martin, M., Herranz, C., Hernandez, P. E., and Cintas, L. M. (2006b). Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72,7634–7643. doi: 10.1128/AEM.00983-06
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., Cui, H., 2012. Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16668–16707. <https://doi.org/10.3390/ijms131216668>

- Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R., Kakanj, M., 2021. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *J. Clin. Lab. Anal.* 36. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>
emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology* 49, 23–28.
- Gajic, O., Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., 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. doi: 10.1074/jbc.M211100200
- Güllüce, M., Karadayı, M. and Barış, Ö., 2013. Bacteriocins: Promising Natural Antimicrobials. doi:10.13140/2.1.5014.5606
- Yamada, T. *et al.*, 2004. Apoptosis or growth arrest: Modulation of tumor suppressor p53's specificity by bacterial redox protein azurin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(14), pp. 4770–4775. doi:10.1073/pnas.0400899101
- Imran, D.S., 2016. BACTERIOCIN: AN ALTERNATIVE TO ANTIBIOTICS, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(11), p. 12.
- Yusuf, M.A., Ichwan, S.J.A. and Hamid, T.H.A., 2015. ANTI-PROLIFERATIVE ACTIVITIES OF PURIFIED BACTERIOCIN FROM ENTEROCOCCUS MUNDTII STRAIN C4L10 ISOLATED FROM THE CAECUM OF MALAYSIAN NON-BROILER CHICKEN ON CANCER CELL LINES, 7(2), p. 5.
- Iwatani, S., Yoneyama, F., Miyashita, S., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K., 2012. Identification of the genes involved in the secretion and self-immunity of lacticin Q, an unmodified leaderless bacteriocin from *Lactococcus lactis* QU 5. *Microbiology* 158, 2927–2935. doi: 10.1099/mic.0.062943-0
- Kamarajan, P., Hayami T., Matte B., et al., 2015. Nisin ZP, a Bacteriocin and Food Preservative, Inhibits Head and Neck Cancer Tumorigenesis and Prolongs Survival, *PLOS ONE*. Edited by H.K. Koul, 10(7), p. e0131008. doi:10.1371/journal.pone.0131008
- Kang, B.S., Seo, J.G, Lee, G.-S. et al., 2009. Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in *acne vulgaris*, and its therapeutic effect, *Ae Journal of Microbiology*, vol. 47, no. 1, pp. 101–109. doi: 10.1007/s12275-008-0179-y.
- Kaur, B., Balgir P.P., Kumar B., Garg N., 2013. Biomedical Applications of Fermenticin HV6b Isolated from *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC10770', *BioMed Research International*, pp. 1–8. doi:10.1155/2013/168438.
- Kaur, B., Garg N., Sachdev A., Kumar B., Mittu B., and Chauhan A., 2012. Isolation and Molecular Characterization of Anti-*Helicobacter pylori* Bacteriocin Producing *Pediococcus acidilactici* BA28', 1(6), p. 6. 323. doi:10.4172/scientificreports.32

- Kaur, Sumanpreet and Kaur, Sukhraj, 2015. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents, *Frontiers in Pharmacology*, 6. doi:10.3389/fphar.2015.00272.
- Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J., Saito, T. 2004. The circular bacteriocins Gassericin A and Circularin A,” *Current Protein and Peptide Science*, vol. 5, no. 5, pp. 393–398, doi:10.2174/1389203043379549
- Klaenhammer, T. R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39–85. doi: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
- Kodali, V.P. *et al.* 2013. Biosynthesis and Potential Applications of Bacteriocins, p. 14.
- Koniuchovaitė A., 2021. Naujų antibakterinių peptidų paieška ir biosintezė. Magistro baigiamasis darbas. Vilniaus universitetas, Vilnius.
- Lopez-Cuellar, M. D. R., Hern´andez, A. I. R., and N. Chavarr´ia Hernandez., 2016. LAB bacteriocin applications in the last decade’, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*,30(6), pp. 1039–1050. doi:10.1080/13102818.2016.1232605.
- Mak, P., 2018. Staphylococcal Bacteriocins, in: *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*. Elsevier, pp. 161–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00013-3>
- Masuda, Y., Zendo, T., Sonomoto, K., 2012. New type non-lantibiotic bacteriocins: circular and
- Mehta, R., Singhal, P., Singh H., Damle, D., 2016. Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications, 3 *Biotech* 6(1): 1–9. doi: 10.1007/s13205-016-0368-z
- Mills, S., Serrano, Lm., Griffin, C., O’Connor, P.M., Schaad, G., Bruining, C., Hill, C., Ross, R., Meijer, W.C., 2011. Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. *Microb. Cell Factories* 10, S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S7>
- Nascimento Jdos, S., Coelho, M. L., Ceotto, H., Potter, A., Fleming, L. R., Salehian, Z., et al., 2012. Genes involved in immunity to and secretion of aureocin A53, an atypical class II bacteriocin produced by *Staphylococcus aureus* A53. *J. Bacteriol.* 194, 875–883. doi: 10.1128/JB.06203-11
- Negash, A.W., and Tsehai, B.A., 2020. Current Applications of Bacteriocin , *International Journal of Microbiology*. Edited by J. Falkinham, pp. 1–7. doi:10.1155/2020/4374891.
- Netz, D. J. A., Sahl, H. G., Marcolino, R., Dos Santos Nascimento, J., De Oliveira, S. S., Soares, M. B., et al., 2001. Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 311, 939–949. doi: 10.1006/jmbi.2001.4885
- Novik, G., Savich, V., Meerovskaya, O., 2019. *Geobacillus* Bacteria: Potential Commercial Applications in Industry, Bioremediation, and Bioenergy Production Growing and Handling of Bacterial Cultures. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.76053

- Oman, T. J., and Van der Donk, W. A., 2010. Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 6, 9–18. doi: 10.1038/nchembio.286
- Perez, R.H., Zendo, T. and Sonomoto, K., 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications, *Microbial Cell Factories*, 13(S1), p. S3. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S3
- Rodríguez, J.M., Martínez, M.I. and Kok, J., 2002. Pediocin PA-1, a Wide-Spectrum Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(2), pp. 91–121. doi:10.1080/10408690290825475
- Sahl, H.-G. and Bierbaum, G., 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria, p. 17.
- Schägger, H., 2006. Tricine–SDS–PAGE, *Nat. Protoc.*, t. 1, nr. 1, p. 16–22, doi:10.1038/nprot.2006.4.
- Silva, C.C.G., Silva, S.P.M., Ribeiro, S.C., 2018. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Front. Microbiol.* 9, 594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Simmonds, R.S., Pearson, L., Kennedy, R.C., Tagg, J.R., 1996. Mode of action of a lysostaphin-like bacteriolytic agent produced by *Streptococcus zooepidemicus* 4881. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4536–4541. <https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4536-4541.1996>
- Telhig, S., Ben Said, L., Zirah, S., Fliss, I., Rebuffat, S., 2020. Bacteriocins to Thwart Bacterial Resistance in Gram Negative Bacteria. *Front. Microbiol.* 11, 586433. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586433>
- Turner, P., Mamo G., Karlsson, E.N., 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining, 23: 1–23. DOI: 10.1186/1475-2859-6-9
- Vaičikauskaitė, M., 2020. Reguliuojamos raiškos sistemos kūrimas termofilinėms *Geobacillus* ir *Parageobacillus* genčių bakterijoms. Magistro baigiamasis darbas. Vilniaus universitetas, Vilnius.
- Vaičikauskaitė, M., Ger, M., Valius, M., Maneikis, A., Lastauskienė, E., Kalėdienė, L., Kaunietis, A., 2019. Geobacillin 26 - high molecular weight bacteriocin from a thermophilic bacterium. *Int. J. Biol. Macromol.* 141, 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.047>
- Van der Meer, J. R., Rollema, H. S., Siezen, R. J., Beerthuyzen, M. M., Kuipers, O. P., and de Vos, W. M., 1994. Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 269, 3555–3562.
- Wu, J., Hu, S. and Cao, L., 2007. Therapeutic Effect of Nisin Z on Subclinical Mastitis in Lactating Cows', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), pp. 3131–3135. doi:10.1128/AAC.00629-07

- Zacharof, M.P. and Lovitt, R.W., 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article', APCBEE Procedia, 2, pp. 50–56. doi:10.1016/j.apcbee.2012.06.010.
- Zebrowska, J., Witkowska, M., Struck, A., Laszuk, P.E., Raczuk, E., Ponikowska, M., Skowron, P.M., Zylicz-Stachula, A., 2022. Antimicrobial Potential of the Genera Geobacillus and Parageobacillus, as Well as Endolysins Biosynthesized by Their Bacteriophages. Antibiotics 11, 242. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020242>
- Zhang, L. and Gallo, R.L., 2016. Antimicrobial peptides', Current Biology, 26(1), pp. R14–R19. doi:10.1016/j.cub.2015.11.017.