

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

DOVILĖ ŠABLEVIČIŪTĖ

Mikrobiologijos studijų programa

Magistro baigiamasis darbas

**BAKTERIOCINO GEOBACILINO 19 HETEROLOGINĖ BIOSINTEZĖ**

Studentas \_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovas: dr. Arnoldas Kaunietis  
\_\_\_\_\_  
(parašas)

Vilnius 2022

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	4
ĮVADAS .....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	6
1.1. Bakteriocinai .....	6
1.1.1. Gram-neigiamų bakterijų bakteriocinai.....	6
1.1.2. Gram-teigiamų bakterijų bakteriocinai.....	7
1.2. Bakteriocinų klasės .....	7
1.3. SDP toksinas.....	10
1.4. Bakteriocinų veikimo mechanizmai .....	12
1.5. Bakteriocinų panaudojimas .....	14
1.5.1. Bakteriocinų panaudojimas maisto pramonėje .....	15
1.5.2. Bakteriocinų panaudojimas medicinoje.....	16
1.5.3. Bakteriocinų pritaikymas vėžio terapijoje .....	17
1.6. <i>Geobacillus</i> genties bakteriocinai.....	18
1.7. Atlikti tyrimai .....	19
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	21
2.1. Medžiagos .....	21
2.1.1. Plazmidės.....	21
2.1.2. Bakterijų kamienai ir augimo sąlygos.....	21
2.2. Metodai .....	22
2.2.1. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR).....	22
2.2.2. DNR elektroforezė agarozės gelyje .....	23
2.2.3. DNR išskyrimas, valymas ir klonavimas .....	23
2.2.4. Geno <i>geo19A</i> klonavimas į pET26b(+) vektorių.....	23
2.2.5. Genų <i>geo19A</i> , <i>geo19B</i> ir <i>geo19C</i> klonavimas į pNW33N vektorių.....	24
2.2.6. Elektrokompentinių <i>E. coli</i> ląstelių ruošimas .....	24
2.2.7. Elektrokompentinių <i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542 ląstelių ruošimas .....	25

2.2.8. Elektrotransformacija.....	25
2.2.9. Rekombinantinio baltymo biosintezė.....	25
2.2.10. Baltymų koncentravimas.....	26
2.2.11. NDS-PAGE baltymų elektroforezė.....	27
2.2.12. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas .....	27
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	29
3.1. Genų <i>geo19ABC</i> raiška <i>E. coli</i> ląstelėse .....	29
3.1.1. Genų raiškos <i>E. coli</i> ląstelėse įvertinimas NDS-PAGE metodu .....	29
3.1.2. Geo19 antibakterinio aktyvumo įvertinimas po genų koekspresijos <i>E. coli</i> ląstelėse	
33	
3.2. Genų <i>geo19ABC</i> raiška <i>G. thermoglucosidasius</i> ląstelėse.....	34
3.2.1. Genų raiškos <i>G. thermoglucosidasius</i> ląstelėse įvertinimas NDS-PAGE metodu .	35
3.2.2. Geo19 antibakterinio aktyvumo įvertinimas po genų koekspresijos <i>G. thermoglucosidasius</i> ląstelėse .....	36
3.3. Apibendrinimas .....	38
IŠVADOS .....	39
SANTRAUKA .....	40
SUMMARY .....	41
LITERATŪRA.....	42

## SANTRUMPOS

AMP – antimikrobiniai peptidai

EFSA – Europos maisto saugos tarnyba (*angl.* The European Food Safety Authority)

GRAS – visuotinai pripažinti saugiais (*angl.* Generally Regarded as Safe)

IPTG – izopropilo  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozidas

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

LAP – linijiniai azolio turintys peptidai (*angl.* linear azol(in)e-containing peptides)

PTM – potransliacinės modifikacijos (*angl.* post-translational modification)

QPS – kvalifikuota saugos prielaida (*angl.* qualified presumption of safety)

RiPP – ribosomiškai susintetinti ir po transliacijos modifikuoti peptidai (*angl.* ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides)

SDP – sporuliaciją nutolinantis baltymas (*angl.* sporulation delaying protein)

USFDA – JAV maisto ir vaistų administracija (the U.S. Food and Drug Administration)

## ĮVADAS

Bakteriocinai tai ribosomų susintetinti antimikrobiniai baltymai (AMP), daugelis jų dėl mažo dydžio vadinami antimikrobiniais peptidais. Bakteriocinai pasižymi slopinamuoju (baktericidiniu arba bakteriostatiniu) poveikiu prieš tos pačios rūšies mikroorganizmus arba prieš kitos rūšies ar genties mikroorganizmus. Šiuo metu bakteriocinai skirstomi į tris pagrindines klases: I klasė – maži po transliacijos modifikuoti peptidai; II klasė – nemodifikuoti bakteriocinai; III klasė – dideli karštyje nestabilūs peptidai.

Išsamūs šių antimikrobinių medžiagų veikimo mechanizmų tyrimai ir antimikrobinių medžiagų veikimo mechanizmų supratimas yra svarbus medicinoje: vėžio gydime, taip pat kaip alternatyva antibiotikams, ir maisto pramonėje, kaip natūralūs maisto konservantai. Nors informacijos sparčiai daugėja, tačiau apie termofilinių bakterijų gaminamų bakteriocinų tyrimų yra atlikta labai nedaug. Dauguma jų aprašyti neaiškiai, o jų aminorūgščių sekos nenustatytos. *Geobacillus* genties termofilinės bakterijos yra gyvybiškai svarbių fermentų šaltinis ir plačiai naudojamos biotechnologijose ir pramonėje.

Šiame tyrime naudojamas gram-teigiamas endosporas formuojantis termofilinis *Geobacillus stearothermophilus* 15 kamienas, kuris anksčiau buvo išskirtas iš naftos telkinių Lietuvoje. Remiantis ankstesniais tyrimais, buvo žinoma, kad šis kamienas išskiria antibakterinę medžiagą, kuri yra aktyvi prieš artimai giminingas termofilines bakterijų rūšis. *Geobacillus stearothermophilus* 15 kamienas gamina du bakteriocinus – geobaciliną 26 (Geo26) kuris yra 26 kDa molekulinės masės ir geobaciliną 19 (Geo19), kuris yra 19 kDa molekulinės masės dydžio. Ankstesnių tyrimų metu buvo nustatyti Geo19 biosintezę koduojantys genai. Šiame darbe toliau buvo tęsiami geobacilino 19 tyrimai.

**Tikslas:** heterologiškai susintetinti aktyvų geobaciliną 19 *Escherichia coli* ir *Geobacillus thermoglucosidasius* ląstelėse.

### Uždaviniai:

1. Atlikti geobacilino 19 biosintezę koduojančių genų (*geo19A* *geo19B* ir *geo19C*) raišką skirtingose *E. coli* kamienuose: Rosetta (DE3), C41 (DE3) ir Arctic Express (DE3), ir įvertinti jų įtaką bakteriocino peptido biosintezei ir aktyvumui.
2. Įvertinti PelB signalinės sekos įtaką geobacilino 19 peptido biosintezei ir aktyvumui *E. coli* ląstelėse.
3. Įvertinti bakteriocino signalinio peptido įtaką bakteriocino peptido biosintezei ir jo aktyvumui *E. coli* ląstelėse.
4. Atlikti geobacilino 19 biosintezės genų (*geo19A* *geo19B* ir *geo19C*) raišką *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 bakterijose ir įvertinti bakteriocino peptido biosintezę ir aktyvumą.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. Bakteriocinai

Visi gyvi organizmai gamina tam tikras slopinančias medžiagas kaip gynybos arba imuninės sistemos dalį, kad galėtų augti ir daugintis konkuruojančioje nišoje. Bakterijos gamina dviejų tipų antimikrobinius peptidus tuos, kurie sintetinami ribosomų (bakteriocinai), ir ne ribosomų susintetintus antimikrobinius baltymus, kuomet nėra šiuos antimikrobinius peptidus koduojančių struktūrinių genų. Bakteriocinus pirmą kartą literatūroje paminėjo André Gratia 1925 metais. Jie buvo atrasti tiriant *E. coli* antagonistines sąveikas ir pavadinti koliciniais (Chikindas *et al.*, 2018; Roces *et al.*, 2012). 1928 m. buvo pranešta apie tam tikrą *Lactococcus* kamienų gebėjimą slopinti kitus LAB (pienarūgštės bakterijos) kamienus, o vėliau, 1947 m., Mattickas ir Hirshas sukoncentravo iš *Lactococcus lactis* išskirtą slopinančią medžiagą, pavadintą nizinu (Cotter *et al.*, 2005). Šis bakteriocinas iš pradžių buvo išgrynintas ir pradėtas komerciškai platinti 1953 m. Anglijoje, o 1969 m. Jungtinės maisto ir žemės ūkio organizacijos/Pasaulio sveikatos organizacijos maisto priedų ekspertų komitetas pripažino jį saugiu naudoti maisto produktuose. 1953 m. taip pat buvo pasiūlyta vartoti terminą "bakteriocinas" mikroorganizmų gaminamiems antimikrobiniams peptidams įvardyti. Bakteriocinai tai ribosomų susintetinti antimikrobiniai baltymai (AMP), daugelis jų dėl mažo dydžio vadinami antimikrobiniams peptidais. Bakteriocinai pasižymi slopinamuoju (baktericidiniu arba bakteriostatiniu) poveikiu prieš tos pačios rūšies mikroorganizmus arba prieš kitos rūšies ar genties mikroorganizmus (Chikindas *et al.*, 2018; Roces *et al.*, 2012).

Išsamūs šių antimikrobinių medžiagų veikimo mechanizmų tyrimai ir antimikrobinių medžiagų veikimo mechanizmų supratimas yra svarbus medicinoje, kaip alternatyva antibiotikams, ir maisto pramonėje, kaip natūralūs maisto konservantai. Pastaraisiais metais buvo paskelbta daug tyrimų, kuriuose teigiama, kad bakteriocinai gali būti naudojami kaip alternatyva antibakterinėms medžiagoms, bakterinių infekcijų profilaktikai arba gydymui (Darbandi *et al.*, 2021). Bakteriocinus nuo antibiotikų skiria trys pagrindiniai bruožai – formavimasis ribosomose, aktyvumas esant mažoms koncentracijoms (nanomoliariniame diapazone) ir siauras veikimo spektras (Mak, 2018). Bakteriocinus gali išskirti ir gram-teigiamos, ir gram-neigiamos bakterijos (Darbandi *et al.*, 2021)

#### 1.1.1. Gram-neigiamų bakterijų bakteriocinai

Didžioji dalis bakteriocinus gaminančių Gram-neigiamų bakterijų yra priskiriamos *Enterobacteriaceae* šeimai, pvz., patogeninės *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ir *Pseudomonas aeruginosa* (Telhig *et al.*, 2020). Bakteriocinai suskirstyti į dvi pagrindines šeimas: didelės

molekulinės masės baltymus (30–80 kDa), vadinamus koliciniais, ir mažos molekulinės masės peptidus (1–10 kDa), vadinamus mikrocinais. Kolicinų gamybą skatina SOS atsaką reguliuojantis genas, kuris vaidina svarbų vaidmenį daugelio bakterijų atsake į DNR pažeidimus. Mikrocinais yra labai stabilūs hidrofobiniai peptidai, kurie gaminami streso sąlygomis, ypač išėikvojus maistines medžiagas. Kolicinai ir mikrocinais daugiausia randami *E. coli* (Rebuffat, 2011; Gordon and O'Brien, 2006). Paprastai gram-neigiamos bakterijos yra natūraliai atsparios gram-teigiamų bakterijų gaminamiems bakteriocinams dėl savo išorinės membranos, kuri veikia kaip veiksmingas barjeras. Nepaisant to, yra veikimo būdų, kurie destabilizuoja išorinę membraną, leidžia šiems peptidams paveikti gram-neigiamas bakterijas (Prudêncio *et al.*, 2015).

### 1.1.2. Gram-teigiamų bakterijų bakteriocinai

Gram-teigiamų bakterijų bakteriocinai, dažniausiai gaunami iš pieno rūgšties bakterijų (LAB) (Arqués *et al.*, 2015; Eijsink *et al.*, 2002.). Pieno rūgšties bakterijos yra įvairi rūgštims tolerantiškų, fakultatyvinių anaerobų ir fermentuojančių organizmų grupė, kuri paprastai laikoma saugia (GRAS). Todėl USFDA (JAV maisto ir vaistų administracija) jų bakteriocinus laiko saugiais. Taip pat Europos maisto saugos tarnyba (EFSA) suteikė kvalifikuotos saugos prielaidos (QPS) statusą daugumai LAB genčių (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ir kai kuriems *Streptococcus*). LAB išskiriami bakteriocinai yra karštyje stabilūs, jautrūs proteazėms, ribosomų sintetinami antimikrobiniai peptidai, kuriuose vyksta arba nevyksta fermentinis potransliacinis modifikavimo (PTM) procesas (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016; Darbandi *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2018). Daug dėmesio moksliniuose tyrimuose susilaukė gram-teigiamos bakterijos tokios kaip pieno rūgšties bakterijos, įskaitant *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ir *Bacillus* gentis (Soltani *et al.*, 2022).

## 1.2. Bakteriocinų klasės

1993 metais Klaenhammer pirmasis pasiūlė LAB bakteriocinų klasifikaciją pagal kurią ir buvo sudaromos vėlesnės klasifikacijos. Klaenhammer klasifikacijoje buvo išskiriamos keturios pagrindinės klasės:

- I klasė: (lantibiotikai) maži (<5 kDa), membraną veikiantys peptidai, kurių sudėtyje yra neįprastų aminorūgščių tokių kaip lantionino ar β-metil-lantionino ir dehidratuotų aminorūgščių liekanų.
- II klasė: (neturintys lantionino) maži (<10 kDa), termostabilūs, membraną veikiantys peptidai. Ši klasė suskirstyta į tris pogrupius:

- IIa poklasis: pediocino tipo bakteriocinų grupė, aktyvi prieš *Listeria* spp, kurių seka N-gale yra – Y-G-N-G-V-X-C-.
- IIb poklasis: bakteriocinai kurie sudaryti iš dviejų skirtingu peptidų, reikalingų porų formavimui.
- IIc poklasis: tioliu aktyvinami peptidai, kuriems reikalingas sumažintas cisteino likučių aktyvumas.
- III klasė: termolabilūs didelės molekulinės masės (>30 kDa) baltymai.
- IV klasė: kompleksiniai baltymai, kurie sudaryti iš baltymų dalies ir angliavandenių arba lipidų (Klaenhammer, 1993).

Vėliau buvo pasiūlyta IV klasę, kurią sudaro bakteriocinai, kurie sudaro didelius kompleksus su kitomis makromolekulėmis, panaikinti. Kadangi tokie bakteriocinai nėra išgryninti ir yra rimta priežastis manyti, kad šio tipo bakteriocinas yra artefaktas dėl katijoninių ir hidrofobinių bakteriocinų savybių, dėl kurių susidaro kompleksas su kitomis makromolekulėmis (Cleveland *et al.*, 2001).

Dauguma gram-teigiamų bakterijų gaminamų bakteriocinų yra suskirstyti į dvi pagrindines klases, kurios apima paprastai karščiui atsparius mažus (<10 kDa) antibakterinius peptidus: I klasė – po transliacijos modifikuoti bakteriocinai ir II klasė – po transliacijos nemodifikuoti bakteriocinai. Taip pat vėliau buvo siūloma III klasę panaikinti, kuri yra skirta didelės molekulinės masės bakteriocinams, ir buvo rekomenduota atskirti ir vadinti bakteriolizinais (liziniais baltymais) (Cotter *et al.*, 2005). Tačiau, atsižvelgiant į didelių nelizinių bakteriocinų egzistavimą ir neseniai identifikuotus tailocinus gram-teigiamose bakterijose, atrodo pagrįsta palikti III klasę dideliems bakteriocinams (Acedo *et al.*, 2018). Vėliau buvo pasiūlytos įvairios bakteriocinų klasifikavimo schemas kuriomis remiantis buvo siūloma šiek tiek pakoreguota LAB klasifikacija, kuri gali apimti naujus poklasius, kurie atsiranda, remiantis biosintezės mechanizmu ir biologiniu aktyvumu (Arnison *et al.*, 2013). Nors daugiausia dėmesio skiriama bakteriocinams iš LAB, šis klasifikavimas tinka ir žinomiems junginiams iš kitų mikroorganizmų. Siūlomos tris pagrindinės klasės: I klasė – maži po transliacijos modifikuoti peptidai; II klasė – nemodifikuoti bakteriocinai; III klasė – dideli karštyje nestabilūs peptidai, kiekvienas suskirstytas į poklasius (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016):

**I klasė:** ribosomų susintetinti ir po transliacijos modifikuoti peptidai (RiPP). Mažesni nei 10 kDa dydžio. Ši klasė apima visus peptidus, kurie biosintezės metu patiria fermentinį modifikavimą.

- **Ia poklasis:** vadinami lantipeptidai (lantibiotikai). Lantipeptidai yra peptidai, turintys neįprastų aminorūgščių, tokių kaip lantioninas ir/arba (metil)lantioninas (Arnison *et al.*, 2013). Remiantis brandimo procese dalyvaujančiais potransliacinės modifikacijos (PTM) fermentais, lantipeptidus galima suskirstyti į keturis tipus, tačiau lantibiotikais gali būti laikomi tik I tipas ir II tipas (Knerr and van der Donk, 2012) III ir IV tipai neturi žinomo



antimikrobinio aktyvumo (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). Tarp jų geriausiai ištirtas nizinas, I tipo lantibiotikas, kurį gamina *Lactococcus lactis* (Lubelski *et al.*, 2008).

- **Ib poklasis:** cikliniai peptidai. Nuo N- iki C- galo ciklizuoti (angl. head-to-tail cyclization), bakteriocinai yra RiPP grupė, kurios N ir C galai yra sujungti peptidine jungtimi, tokiu būdu paverčiant į žiedinę molekulę (Acedo *et al.*, 2015). Kaip pavyzdys galėtų būti karnociklinas A (CclA), kuris yra stiprus antimikrobinis peptidas iš *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307, pasižymintis plačiu aktyvumo spektru prieš daugelį gram-teigiamų organizmų (Martin-Visscher *et al.*, 2009).
- **Ic poklasis:** saktipeptidai (saktibiotikai) palyginus su lantibiotikais tai yra mažas bakteriocinų poklasis. Tai yra sieros –  $\alpha$ -anglies turintys peptidai, kurie tarpininkauja po transliacinėse modifikacijose (Arnison *et al.*, 2013; Mathur *et al.*, 2015). Geriausiai ištirtas subtilozinas A kuris yra neįgiamo krūvio ciklinis peptidas, kurį gamina *Bacillus subtilis* (Kawulka *et al.*, 2003).
- **Id poklasis:** linijiniai azolo turintys peptidai (LAP), turintys įvairius heterociklinius tiazolo ir (metil)oksazolo žiedų derinius, kurie gaunami iš cisteino, serino ir treonino liekanų per nuo ATP priklausomą ciklodehidrataciją ir vėlesnę nuo flavino mononukleotido priklausomybę (Melby *et al.*, 2011). Priklausantys tiazolu/oksazolu modifikuotų mikrocinų (TOMM) šeimai. Aktualiausias gaminamas LAP yra streptolizinas S (Cox *et al.*, 2015).
- **Ie poklasis:** glikocinai, kuriuose yra glikozilintos aminorūgščių liekanos (Arnison *et al.*, 2013). Glikocinas F buvo pirmasis aprašytas glikocinas iš LAB, kurį gamina *Lactobacillus plantarum*, tačiau mažai žinoma apie glikocinų veikimo mechanizmus (Stepper *et al.*, 2011).
- **If poklasis:** laso peptidai. Laso peptidai yra ribosomiškai susintetintų ir po transliaciniu būdu modifikuotų peptidų (RiPP) klasė. Laso peptido C-galinė uodega yra prijungta prie makrociklinio žiedo, sudaryto iš septynių – devynių N-galo aminorūgščių liekanų. Ši sujungta topologija suteikia jiems didelį šiluminį ir proteolitinį stabilumą ir išskiria juos iš kitų RiPP (Cheng and Hua, 2020).

**II klasė:** nemodifikuoti bakteriocinai. Mažesni nei 10 kDa. Šios klasės bakteriocinai neturi neįprastų modifikacijų. Jiems brendimui nereikia kitų fermentų, išskyrus lyderinės peptidazės ir (arba) transporterio (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

- **Ila poklasis:** į pediociną panašūs bakteriocinai. Plataus spektro antimikrobinės medžiagos (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). Bakteriocinai yra karščiui stabilūs, nemodifikuoti peptidai katijoninėje N-galinėje pusėje turintys dvi cisteino liekanas, sujungtas disulfidiniu tilteliu su konservatyve aminorūgščių seka YGNGV. C-galas yra mažiau konservuotas ir yra susijęs su tikslinės ląstelės specifiškumu (Cui *et al.*, 2012). Pirmasis ir plačiausiai ištirtas

šios klasės atstovas yra pediocinas PA-1, jo genų klasteris, kaip ir daugumos IIa bakteriocinų, yra užkoduotas plazmidėje (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

- **IIb poklasis:** dviejų peptidų bakteriocinai. Bakteriocinai susideda iš dviejų skirtingų peptidų, o aktyvumui reikia abiejų peptidų panašaus kiekio. Pirmasis IIb klasės bakteriocinas laktokokinas G išskirtas iš *Lactococcus lactis*.
- **IIc poklasis:** bakteriocinai be lyderinės sekos. Sintetinami be N-galo lyderinio peptido, kuris paprastai veikia kaip sekrecijos ir modifikavimo atpažinimo seka ir palaiko bakteriociną neaktyvų ląstelės viduje (Masuda *et al.*, 2012). Vienas geriausiai ištirtas ir apibūdintas bakteriocinas be lyderinės sekos yra plazmidėje koduojamas dviejų peptidų enterocinas L50 išskirtas iš *Enterococcus faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1998).
- **IIId poklasis:** nepanašūs į pediociną, vieno peptido bakteriocinai. Šiai grupei priklauso nesusiję linijiniai bakteriocinai, sintetinami su lyderiniu peptidu, kurių struktūra, sekrecijos mechanizmai ir veikimo būdai skiriasi. Kaip pavyzdys: laktokokinas 972, laktokokinas A ir enterocinas B (Franz *et al.*, 2007).

**III klasė:** tai nemodifikuoti, didesni nei 10 kDa bakteriocinai, karštyje nestabilūs antimikrobiniai baltymai, turintys bakteriolizinį arba nelizinį veikimo mechanizmą (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016; Arnison *et al.*, 2013).

- **IIIa poklasis:** bakterioliziniai, paprastai sudaryti iš skirtingų domenų, pavyzdžiui, remiantis sekos analize, enterolizinas A susideda iš N-galo endopeptidazės domeno ir C-galo substrato atpažinimo domeno (Nilsen *et al.*, 2003). Šiam poklasiui taip pat priklauso: zoocinas A (Simmonds *et al.*, 1996), millericinas B (Beukes *et al.*, 2000).
- **IIIb poklasis:** neliziniai bakteriocinai pasižymi baktericidiniu poveikiu, nesukeldami ląstelių lizės, o žudo tikslines ląsteles, sutrikdydami plazminės membranos potencialą. Pavyzdžiui, disgalaktinas išskirtas iš *Streptococcus pyogenes*. (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

### 1.3. SDP toksinas

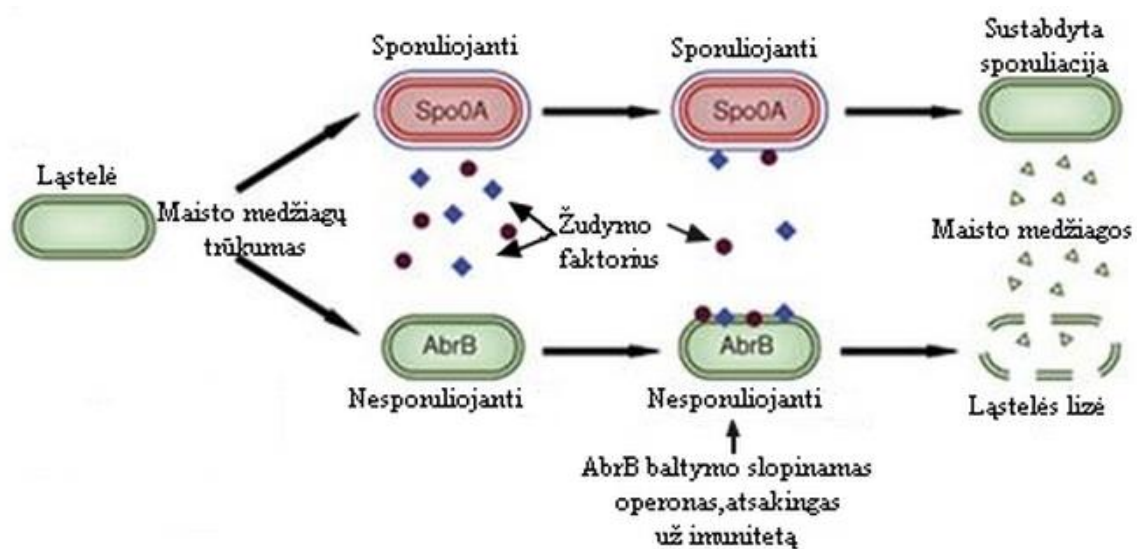
Gamtoje dauguma bakterijų gyvena bioplėvelėse, kur dėl vietos ir maistinių medžiagų konkuruoja tarpusavyje bei su kitomis rūšimis (Kobayashi and Ikemoto, 2019). Bioplėvelėse bakterijų ląstelės prilimpa viena prie kitos ir prie paviršiaus per ekstraląstelių polimerinių medžiagų mišinį, vadinamą bioplėvelės matrica, kuri susideda iš egzopolisacharidų, baltymų, nukleorūgščių ir (arba) lipidų. Kai ląstelės yra įtrauktos į bioplėvelės matricą, jos padidina toleranciją arba atsparumą aplinkos poveikiui, antibiotikams, šeimininko gynybos sistemoms ir kitoms bakterijoms (Branda *et al.*, 2005; Flemming and Wingender, 2010). Taigi bioplėvelės formavimas leidžia bakterijoms išlikti palankioje nišoje ir pretenduoti į teritoriją; tačiau ne visada bioplėvelėse bakterijoms yra palankios

sąlygos. Dėl bioplėvelių savybių, įskaitant didelį ląstelių tankį, sumažėjusį vidinį sklaidumą ir daugeliu atvejų kelių rūšių buvimą, susidaro konkurencijos sąlygos, ypač kai trūksta maistinių medžiagų (Rendueles and Ghigo, 2012).

Gram-teigiama dirvožemio bakterija *B. subtilis* yra pavyzdinis bioplėvelės formavimo organizmas. *B. subtilis* laboratorinėmis sąlygomis formuoja tvirtas bioplėveles, pavyzdžiui, skystos terpės paviršiuje statinio auginimo sąlygomis susidaro granulės arba ant kietos terpės susiraukšlėjusios kolonijos (Branda *et al.*, 2001). *B. subtilis* gamina platų spektrą antibiotikų. Daugelis šių antibiotikų yra ribosomiškai nesusintetinti peptidiniai junginiai, tokie kaip bacilaenas, bacilizinas, fengicinas, iturinas, surfaktinas, kurie, kaip manoma, gamtoje yra svarbūs konkuruojant su kitais organizmais, įskaitant grybus (Stein, 2005). Be to, *B. subtilis* gamina ribosomų būdu susintetintus peptidinius antibiotikus, tokius kaip bakteriocinai ir kitus baltymų kilmės toksinus, kurie paprastai yra veiksmingi prieš kitas genetiškai panašias bakterijas, esančias panašiose ekologinėse nišose. Vienas iš šių baltymų kilmės toksinų, susintetintų ribosomose, yra kanibalizmo toksinas SDP (sporuliaciją nutolinantis baltymas), kurio funkcija yra susijusi su bioplėvelės formavimu (Kobayashi and Ikemoto, 2019).

Susidūrusios su anglies šaltinio apribojimu, gram-teigiamos bakterijos *B. subtilis* inicijuoja išgyvenimo strategiją, vadinama sporuliacija, dėl kurios susidaro labai atsparios endosporos, leidžiančios *B. subtilis* išgyventi net ilgą nepalankių sąlygų periodą. Siekiant išvengti įsipareigojimo šiam energijos reikalaujančiam ir negrįžtamam procesui, *B. subtilis* naudoja kitą strategiją, vadinama „kanibalizmu“, kad kuo ilgiau atidėtų sporuliaciją. Kanibalizmas apima sporuliaciją lėtinančio baltymo (SDP) gamybą ir sekreciją (Höfler *et al.*, 2016). SDP toksinas yra sintetinamas iš vidinės SdpC baltymo sekos ir yra koduojamas *sdpABC* operone. SdpC yra 203 aminorūgščių baltymas, turintis N-gale signalinį peptidą ir C-galo hidrofobinį domeną. Po sekrecijos nuskėlus signalinę seką, SdpC toliau paverčiamas į 42 aminorūgščių peptidą, žinomą kaip SDP toksiną, kuris atitinka jau minėtą C-galo hidrofobinį domeną. Manoma, kad SdpA ir SdpB reikalingi SdpC perdirbimui į SDP, o šis apdorojimas yra būtinas SDP toksino veikimui (Perez Morales *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2016). SDP toksinas veikia prasikverbdamas į bakterijų membraną, taip sutrikdydamas protonų varomąją jėgą, ir sukeldamas ląstelių lizę (Lamsa *et al.*, 2012). Lastelėje esantis *sdpRI* operonas koduoja savo transkripcijos represorių SdpR ir antitoksininį SdpI baltymą prieš SDP toksiną. Šis membraninis baltymas apsaugo ląsteles prisijungdamas prie SDP. *SdpABC* ir *sdpRI* operonų transkripciją aktyvuoja Spo0A, kuris aktyvuojamas fosforilinimo būdu (Ellermeier *et al.*, 2006). Spo0A yra aktyvuojamas prasidėjus stacionariai fazei ir jis yra šios fazės vystymosi reguliatorius (Fujita and Losick, 2005). Dalis *B. subtilis* ląstelių gamina SDP toksiną ir SdpI antitoksiną, nes Spo0A baltymo fosforilinimas yra priklausomas nuo bistabilaus reguliavimo mechanizmo (Ellermeier *et al.*, 2006). Dėl šios priežasties, genetiškai identiškose ląstelėse, kurios negamina SdpI antitoksinio baltymo yra

lizuojamos, išskirto SDP toksino (1.1 pav.). Taip pat fosforilintas Spo0A baltymas skatina bioplėvelių susidarymą, ir ląstelės kurios gamina SDP toksiną ir SdpI antitoksiną gali efektyviau kurti bioplėveles, nes yra naudojamos maisto medžiagos, išsiskirtos iš lizuotų *B. subtilis* ląstelių (López *et al.*, 2009). Manoma, kad SDP toksinas atlieka svarbų vaidmenį ankstyvoje bioplėvelės formavimo fazėje, šalindamas nereikalingus ląstelių tipus ir konkurentus aplinkoje (Kobayashi and Ikemoto, 2019).



1.1 pav. Kanibalizmo elgesio modelis. *SdpABC* ir *sdpRI* operonų transkripciją aktyvuoja Spo0A. Dalis *B. subtilis* ląstelių gamina SDP toksiną ir SdpI antitoksiną. AbrB baltymas slopina *sdpRI* – operoną, koduojantį imuniteto baltymą. Ląstelės, kurios negamina SdpI antitoksininio baltymo yra lizuojamos. *B. subtilis* ląstelės kurios turi aktyvų imuniteto baltymą suvaržo lizės metu išsiskyrusias maisto medžiagas ir sporuliacija yra sustabdoma (González-Pastor, 2011)

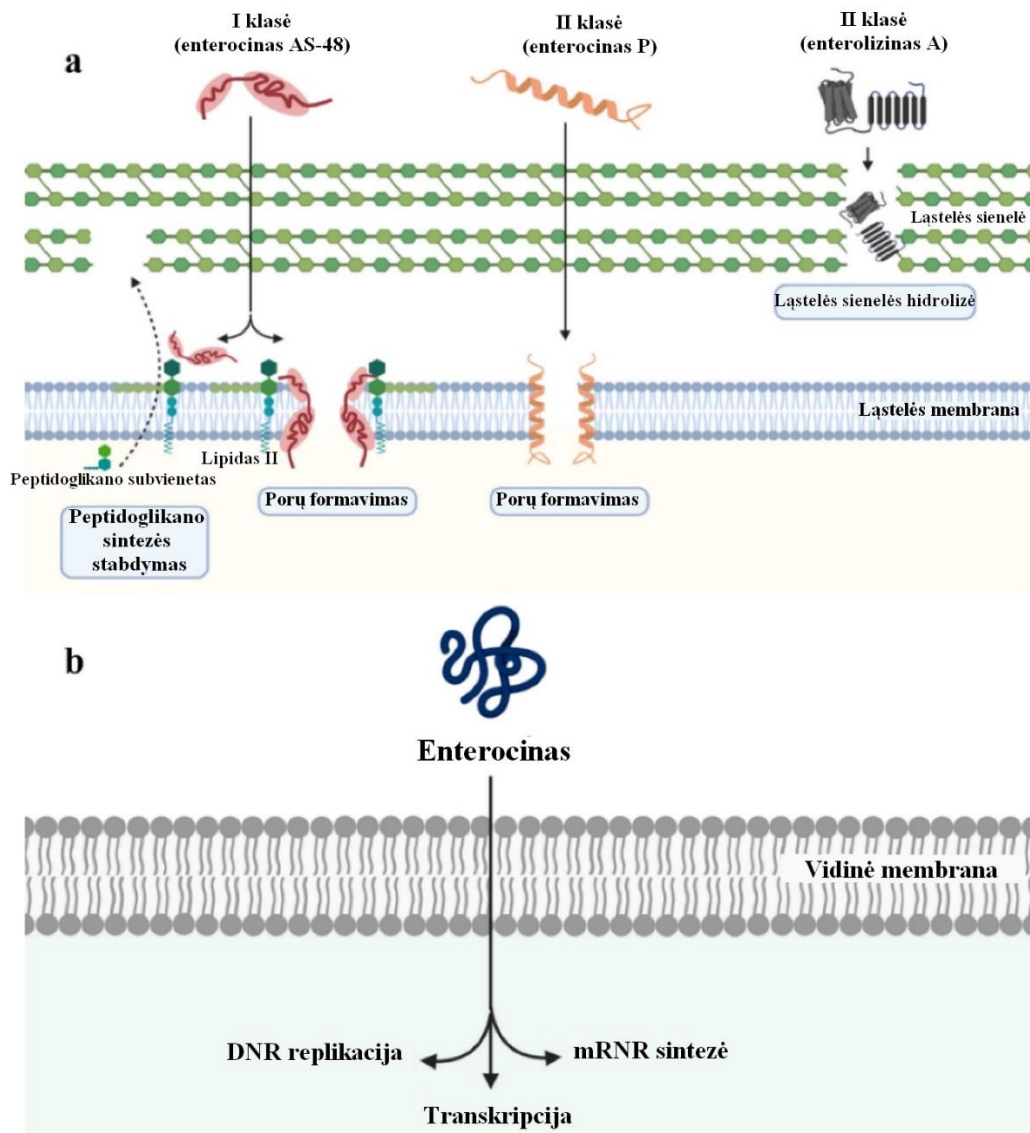
#### 1.4. Bakteriocinų veikimo mechanizmai

Bakteriocinai paprastai apibrėžiami kaip peptidai arba baltymai sintetiniai bakterijų ribosomų, kurie slopina arba naikina kitus giminingus ar nesusijusius mikroorganizmus. Bakteriocinai gali turėti siaurą spektrą, slopindami taksonomiškai artimas bakterijas, arba platų spektrą, slopindami daugybę bakterijų (Mills *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2018). Bakteriocinai gali nužudyti bakterijų ląsteles įvairiais mechanizmais: formuodami poras vidinėje membranoje; slopinant peptidoglikanų biosintezę jungiantis prie lipido II; ir dėl DNR arba RNR degradacijos. Bakteriocinus gaminančios bakterijos yra atsparios savo bakteriocinams, nes gamina imuniteto baltymus, kurie slopina bakteriocino veikimą (Atanaskovic and Kleanthous, 2019). Paprastai porų formavimasis, dėl kurio keičiasi citoplazmos membranos potencialas dėl vandenilio jonų mainų tarp vidinio ir išorinio membranos

paviršių, yra pagrindinis mechanizmas, kuriuo dauguma bakteriocinų iš LAB daro savo antibakterinį poveikį (da Silva Sabo *et al.*, 2014).

Nizinas, labiausiai ištirtas lantibiotikas, gali veikti dviem mechanizmais, jo veikimas yra nukreiptas į peptidoglikano biosintezės mechanizmą, esantį bakterijų ląstelės apvalkale. Taip pat sugeba naudoti lipidinį sluoksnį, kaip prisijungimo vietą, kad palengvintų porų susidarymą, dėl kurio keičiasi citoplazminės membranos potencialas ir galiausiai ląstelės žūsta (Silva *et al.*, 2018).

Kaip kitą pavyzdį galima pateikti enterocinų antibakterinius mechanizmus. Juos galima klasifikuoti į ląstelių apvalkalo ir genų ekspresijos slopinimą (1.2 pav.). Keletas enterocinų gali sąveikauti su specifiniais bakterijų ląstelių receptoriais, įskaitant lipidą II ir kitus susijusius ląstelės sienelės pirmtakus. Be to, dauguma II klasės enterocinų gali sukelti membranos pralaidumą. Enterocinas P yra amfipatinis ir katijoninis peptidas, kuris, kaip įrodyta, sąveikauja su neigiamą krūvį turinčiomis ląstelių bakterijų membranomis ir sukelia žūtį. Dauguma III klasės enterocinų, kurie yra dideli ir karščiui nestabilūs baltymai, gali suardyti ląsteles, katalizuodami ląstelių sienelių hidrolizę. Enterolizinas A gali hidrolizuoti peptidinius ryšius ląstelių peptidoglikane. Be to, enterocinai gali kontroliuoti bakterijas, trukdydami DNR replikacijai ir mRNR sintezei bei transkripcijai (Wu *et al.*, 2022).



1.2 pav. Enterocinų antibakterinis mechanizmas. Enterocinus galima suskirstyti į skirtingas grupes pagal jų veikimo būdą: **a** – keli I klasės enterocinai turi du antimikrobinius metodus. Jie gali prisijungti prie lipido II ir užkirsti kelią peptidoglikanų sintezei. Be to, jie taip pat gali naudoti lipidą II, kad inicijuotų membranos įterpimą ir formuotų poras. II klasės enterocinai paprastai turi amfifilinę spiralinę struktūrą, leidžiančią juos įterpti į ląstelės membraną ir sukelti ląstelės mirtį. III klasės enterocinai, tokie kaip Enterolizinas A, gali suardyti jautrias ląsteles hidrolizuojant specifines ląstelės sienelės peptidines jungtis. **b** – daugelis enterocinų kontroliuoja tikslines bakterijas, trukdydami genų ekspresijai (Wu *et al.*, 2022)

### 1.5. Bakteriocinų panaudojimas

Bakteriocinai ribosominiu būdu sintetinami antimikrobiniai peptidai. Išsamūs bakteriocinų tyrimai atvėrė naujas tyrimų sritis ir išplėtė šių antimikrobinių peptidų taikymo sritis. Galimybė bakteriocinus paversti naujos kartos antibiotikais, kartu su sparčia genetikos ir nanotechnologijų

plėtra, atveria kelią dar platesniam pritaikymui, pavyzdžiui, vėžio gydymui. Nors atlikta keletas įdomių praktinių tyrimų, susijusių su gram-teigiamų bakterijų bakteriociniais, dauguma į taikymą orientuotų tyrimų yra skirti gram-teigiamų mikroorganizmų, daugiausia pieno rūgšties bakterijų, bakteriocinams. Bakteriocinų taikymo sritys plečiasi – nuo maisto produktų iki žmonių sveikatos (Chikindas *et al.*, 2018).

#### 1.5.1. Bakteriocinų panaudojimas maisto pramonėje

Pastaraisiais metais pramoniniuose maisto produktuose dažniau naudojami cheminiai priedai ir yra vis labiau nerimaujama dėl šių cheminių priedų naudojimo mityboje. Dėl šios priežasties atsiranda poreikis ieškoti natūralaus ir šviežio maisto, kuriame nėra cheminių konservantų. Šis faktas, susijęs su augančia minimaliai apdoroto maisto paklausa, paskatino ieškoti veiksmingų natūralių konservantų, tarp kurių šiuos reikalavimus atitinka antibakteriniai junginiai, tokie kaip bakteriocinai (Castro *et al.*, 2011).

Bakteriocinai yra antimikrobiniai peptidai, kurie gali būti laikomi saugiais, nes juos gali lengvai skaidyti žinduolių virškinimo trakto fermentai (Mills *et al.*, 2011). Nors bakteriocinus gamina arba gram-teigiamos, arba gram-neigiamos bakterijos, labiausiai priimtini peptidai maisto konservavimui ar net klinikiniam naudojimui yra tie, kuriuos gamina bakteriocinai iš pieno rūgšties bakterijų (LAB), nes jie pripažįstami saugiais (Chalón *et al.*, 2012). Bakteriocinai iš LAB yra mažos molekulinės masės peptidai arba baltymai. LAB bakterijų gaminami bakteriocinai gali būti naudojami maisto konservavimui dėl jų mikrobiologinių, fiziologinių ir technologinių pranašumų. (Leroy and De Vuyst, 2004). Pavyzdžiui reuterinas ( $\beta$ -hidroksipropionaldehidai), kurį gamina *Lactobacillus Reuteri* yra aktyvus prieš platų bakterijų, pelėsių ir mielių spektrą (Talarico and Dobrogosz, 1989). Taip pat nizinas A, *Lactococcus lactis* gaminamas lantibiotikas, pasižymi plataus spektro aktyvumu prieš gram-teigiamas bakterijas, įskaitant per maistą plintančius patogenus. Jo veikimo mechanizmas pagrįstas bakterijų ląstelės sienelės ardymu formuojant poras ir slopinant ląstelės sienelės biosintezę (Wiedemann *et al.*, 2001). Daugelis tyrimų parodė, kad bakteriocinus ar bakteriociną gaminančias bakterijas galima naudoti maisto produktuose, tokiuose kaip mėsa, pieno produktai, žuvis, alkoholiniai gėrimai, salotos ir fermentuotos daržovės (O’Sullivan *et al.*, 2003). Iki šiol tik nizinas ir pediocinas PA1 buvo parduodami kaip maisto konservantai (Simha *et al.*, 2012). Nors kiti LAB bakteriocinai siūlo daug žadančių perspektyvų ir kuriuos galima naudoti kaip biokonservantus, pavyzdžiui, enterocinas AS-48 (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2011) arba lakcinas 3147 (Suda *et al.*, 2012).

Bakteriocinų taikymas maisto produktų biokonservavimui paprastai apima šiuos būdus: maisto produktų inokuliaciją bakteriociną gaminančia bakterija; išgryninto arba pusiau išgryninto bakteriocino pridėjimas kaip maisto priedo; produkto, anksčiau fermentuoto su bakteriociną

gaminančia bakterija, naudojimas kaip sudedamoji dalis perdirbant maistą (Chen and Hoover, 2003). Daugeliu atvejų bakteriocinai adsorbuojami į maistą lengvai suyra ir taip yra prarandamas antibakterinis aktyvumas. Todėl alternatyvus būdas yra bakteriocinų įterpimas į maisto pakavimo plėveles/dangas, kurios pagerina jų aktyvumą ir stabilumą sudėtingose maisto sistemose (Salgado, 2015). Tokios plėveles padėtų kontroliuoti per maistą plintančias patogenines bakterijas, tokias kaip *Listeria monocytogenes*. Vienas iš būdų kontroliuoti *L. monocytogenes* augimą virtuose mėsos produktuose, kaip apsauginė kultūra galėtų būti naudojama *Lactobacillus sakei* C2, galinti gaminti plataus slopinimo spektro bakteriociną (sakacin C2). Bakteriocinų panaudojimas maisto pramonėje padėtų pagerinti maisto saugą ir kokybę bei sumažinti ekonominius nuostolius. Tai gali prisidėti prie mažų ir vidutinių įmonių plėtros, taip pat ir prie didelių įmonių produktų įvairinimo (Leroy and De Vuyst, 2004).

### 1.5.2. Bakteriocinų panaudojimas medicinoje

Pradėjus plačiai naudoti antimikrobines medžiagas bakterijų atsparumas buvo iškart pastebėtas. Nuo to laiko atsparumo lygis ir toliau smarkiai augo. Pasiiekta tiek, kad iki 2000 m. Pasaulio sveikatos organizacija perspėjo, kad infekcinės ligos gali tapti nepagydomos dėl didelio dauginimuisi atsparių patogenų kiekio. Iš pradžių buvo manoma, kad atsparumas antibiotikams atsirado dėl daugybės atsparių patogeninių kamienų, pvz., MRSA (meticilinui atsparių *Staphylococcus aureus*) ir VRE (vankomicinui atsparių enterokokų), taip pat sveikatos problemų dėl komensinės mikrobu floros sunaikinimo ir net autoimuninių ligų (Bédard *et al.*, 2018).

Skirtingai nuo antibiotikų, nukreiptų į specifinius fermentus, dauguma bakteriocinų naikina tikslines ląsteles formuodami poras ir prasiskverbdami į citoplazminę membraną arba slopindami ląstelės sienelės biosintezę. Dėl šio sudėtingo veikimo būdo patogenams sunku sukurti atsparumą bakteriocinams (Martin-Visscher *et al.*, 2011). Priešingai nei šiuo metu naudojami antibiotikai, bakteriocinai dažnai laikomi natūralesniais. Bakteriocinus inaktyvuoja virškinimo trakte esantys fermentai, tokie kaip tripsinas ir pepsinas, todėl jie nekeičia virškinamojo trakto mikrobiotos (Cleveland *et al.*, 2001). Kadangi antibiotikai ir bakteriocinai turi skirtingus veikimo mechanizmus. Pavyzdžiui kai nizinas derinamas su kai kuriais antibiotikais, gali atsirasti antimikrobinė sinergija. Atsparumo nizinui ir antibiotikams mechanizmai skiriasi. Antibiotikams atsparios ląstelės yra jautrios nizinui, o nizinui atsparios ląstelės yra jautrios antibiotikams (Balciunas *et al.*, 2013). Tačiau gali atsirasti spontaninių mutantų atsparumas bakteriocinams, kuris gali būti susijęs su membranos ir



ląstelės sienelės pokyčiais, tokiais kaip elektrinio potencialo, takumo, membranos lipidų sudėties arba ląstelės sienelės storio pokyčiai šie pokyčiai gali atsirasti po to, kai ląstelė yra veikiamas mažos bakteriocinų koncentracijos arba kaip prisitaikančio atsako į kokį nors kitą stresą dalis (Mantovani and Russell, 2001).

Bakteriocinų pritaikymas medicinoje apima įvairių ligų gydymą. Lantibiotikai yra pritaikomi farmacijoje: kraujo spaudimo, uždegimų ir alergijų, odos infekcijų, herpes gydyme. Kolicinai: urogenitalinės infekcijos, hemoraginio kolito, hemolizinio ureminio sindromo gydyme. Mikrocina: veikia kaip antibakterinis agentas, salmoneliozės gydyme (Balciunas *et al.*, 2013). Atlikti tyrimai parodė, kad bakteriocinas baktofencinas A išskirtas iš gram-teigiamų *Lactobacillus salivarius* (Bédard *et al.*, 2018) turi slopinamąjį poveikį *Staphylococcus aureus* ir *Listeria monocytogenes*, taikydami į bakterijos ląstelės sienelę (Bédard *et al.*, 2019). Pavyzdžiui, buvo įrodyta, kad mikrocinas J25 pasižymi dideliu antimikrobiniu poveikiu prieš daugeliui vaistų atsparias *Salmonella* ir *E. coli* (Yu *et al.*, 2019). Be to, bakteriocinai gali būti naudojami, kaip daugeliui vaistų atsparių *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. inhibitoriai (Kumarasamy *et al.*, 2010). Siekiant išlaikyti šiuolaikinės medicinos gebėjimą gydyti bakterines infekcijas, dabar skubiai reikia sukurti naujų agentų, skirtų iki šiol nenaudojamiems bakterijų taikiniams ir mechanizmams (Bédard *et al.*, 2018).

### 1.5.3. Bakteriocinų pritaikymas vėžio terapijoje

Bakteriocinai taip pat gali būti pritaikomi vėžio gydymui. Vėžys išlieka viena iš pagrindinių mirties priežasčių visame pasaulyje, nepaisant pažangos jo gydymo ir nustatymo srityje. Įprastos chemoterapinės medžiagos, naudojamos vėžiui gydyti, pasižymi nespecifiniu toksiškumu sveikoms kūno ląstelėms, kurios sukelia įvairius šalutinius poveikius. Taip pat žinoma, kad vėžio ląstelės gydymo metu išvysto atsparumą chemoterapijai. Taigi naujų vaistų nuo vėžio poreikis kasdien didėja. Kai kurie eksperimentiniai tyrimai parodė terapinį bakteriocinų potencialą prieš įvairių tipų vėžio ląstelių linijas. Kai kurie bakteriocinai, palyginti su normaliomis ląstelėmis, parodė selektyvų citotoksiškumą vėžio ląstelėms. Dėl to jie yra perspektyvūs kandidatai tolesniems tyrimams ir klinikiniams tyrimams (Kaur and Kaur, 2015).

Bakteriocinai yra katijoniniai peptidai, todėl jie pirmiausia jungiasi prie neigiamo krūvio vėžio ląstelių membranų, palyginti su normaliomis ląstelių membranomis, kurios yra neutralaus krūvio (Hoskin and Ramamoorthy, 2008). Selektyvų bakteriocinų prisijungimą prie vėžinių ląstelių galima paaiškinti vėžinių ląstelių membranų skirtumais. Vėžinių ląstelių membranų takumas yra didesnis, palyginti su normaliomis ląstelėmis, ir tai palengvina membranos destabilizaciją. (Sok *et al.*, 1999). Taip pat, vėžio ląstelių membranos paviršiaus plotas yra daug didesnis, palyginti su normaliomis

ląstelėmis, todėl prie vėžinių ląstelių membranos prisijungia daugiau antimikrobinų peptidų (Kaur and Kaur, 2015). Yra žinoma, kad kolicinai pasižymi priešvėžiniu poveikiu įvairioms žmogaus navikinių ląstelių linijoms *in vitro*, pavyzdžiui, krūties vėžiui, storosios žarnos vėžiui, kaulų vėžiui (Chumchalova and Smarda, 2003; Kaur and Kaur, 2015). Tyrimai su pelėmis *in vivo* taip pat parodė apsauginį kolicinų priešvėžinį poveikį, stebimas vidutinės auglio masė sumažėjimas 61 % (Cursino *et al.*, 2002). Taip pat yra žinoma apie mikrociną E492 toksinį poveikį įvairioms žmogaus piktybinėms ląstelių linijoms, tokioms kaip HeLa (žmogaus gimdos kaklelio adenokarcinoma), Jurkat (T ląstelės, gautos iš ūminės T ląstelių leukemijos), RJ2.25 (Burkitt limfomos atmaina) (Hetz *et al.*, 2002). Kadangi bakteriocinai yra neimunogeniški, biologiškai skaidomi ir pasižymi vėžio ląstelėms būdingu toksiškumu, taip pat turėtų būti išbandytas jų potencialas veikti kaip įprastinių vaistų nuo vėžio sinergistai. Šiuo metu yra aktualu, kad bakteriocinų, kaip priešvėžinių vaistų, potencialas būtų panaudotas kuriant saugesnius ir geresnius gydymo būdus (Kaur and Kaur, 2015).

#### 1.6. *Geobacillus* genties bakteriocinai

*Geobacillus* gentis pirmą kartą buvo aprašyta 2001 m. (Nazina *et al.*, 2001). Gentį sudaro termofilinės bakterijos, kurios iš pradžių buvo priskirtos *Bacillus* genčiai. *Geobacillus* yra gram-teigiami, endosporas formuojantys, aerobiniai arba fakultatyviniai anaerobiniai termofilai, optimaliai augantys 50–60 °C temperatūroje. Tačiau kai kurių rūšių ar kamienų augimo temperatūra gali svyruoti nuo 37 °C iki 80 °C. Atlikti tyrimai parodė, kad *Geobacillus* rūšys turi didesnę gebėjimą formuoti bioplėveles oro ir skysčio sąsajose, o ne povandeniniuose paviršiuose (Zhao *et al.*, 2013). Šios genties atstovai yra išskirti iš daugybės aplinkos pavyzdžių: nuo požeminių naftos telkinių iki vidutinio ar net amžinojo įšalo temperatūros dirvožemio. Paprastai jie neturi specialių augimo reikalavimų ir gali panaudoti įvairius anglies šaltinius (Coorevits *et al.*, 2012; Kananavičiūtė and Čitavičius, 2015; Zebrowska *et al.*, 2022; Zeigler, 2014). Kadangi *Geobacillus* gali augti aukštoje temperatūroje šios rūšies bakterijos aptinkamos maisto produktuose, nes išgyvena terminio apdorojimo sąlygas. Vienas iš pavyzdžių yra tai, kad gali išgyventi pramoninį pieno pasterizavimą, o po to sporos prilimpa prie paviršių, sudygsa ir sudaro bioplėvelę, todėl pieno produktai sugenda (Seale *et al.*, 2012). Nors ir nėra patogeniški, šios rūšies atstovai, tačiau tokios kaip *G. stearothermophilus* yra probleminė sporas formuojanti bakterija, sutinkama visame pasaulyje gaminamuose pieno produktuose (Rückert *et al.*, 2004).

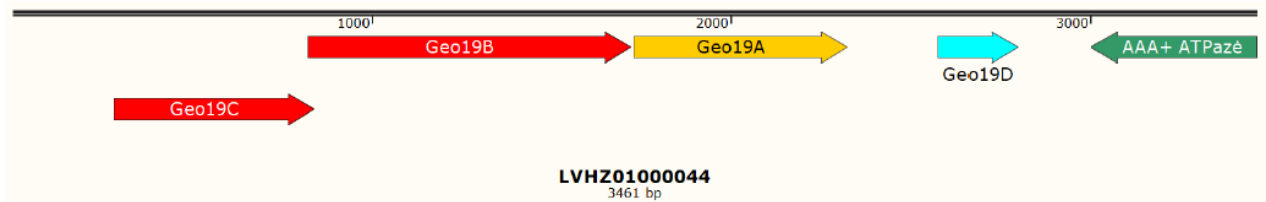
Termofilinių bakterijų gaminamų bakteriocinų tyrimų yra atlikta labai nedaug. Dauguma jų aprašyti neaiškiai, o jų aminorūgščių sekos nenustatytos. *Geobacillus* genties termofilinės bakterijos yra gyvybiškai svarbių fermentų šaltinis ir plačiai naudojamos biotechnologijose ir pramonėje. Kadangi dauguma bakteriocinų yra gaunami iš gram-teigiamų bakterijų, *Geobacillus* taip pat galima

laikyti turtingu tokių antimikrobinių peptidų šaltiniu. Nauji šios srities duomenys gali padėti termofilinių bakterijų gaminamus bakteriocinus pritaikyti pramonės srityje. Yra daug bakterijų rūšių ir kamienų, gaminančių bakteriocinus, kurios niekada nebuvo iširtos (Vaičiškaitė *et al.*, 2019; Zebrowska *et al.*, 2022).

Du labiausiai iširti bakteriocinai yra geobacilinas I ir geobacilinas II, jie išskirti iš *G. thermodenitrificans* NG-80-2 kamieno. Geobacilinas I ir II priskiriami I klasės Intibiotikam (Garg *et al.*, 2012). Neseniai buvo nustatytas *G. stearothermophilus* 15 gaminamas didelės molekulinės masės bakteriocinas – geobacilinas 26. Geobacilinas 26 yra naujas antibakterinis baltymas, jo molekulinė masė yra 24,5 kDa (be lyderinio peptido), jis yra termolabilus ir neturi potransliacinių modifikacijų, reikalingų biologiniam aktyvumui užtikrinti, o šios savybės būdingos III klasės bakteriocinams (Vaičiškaitė *et al.*, 2019). Taip pat iš kitos termofilinės bakterijos neseniai buvo identifikuotas bakteriocinas palidocinas, kuris buvo išskirtas iš *Aeribacillus pallidus* 8 bakterijos kamieno ir priskirtas I klasei ir glikocinų poklasiui (Ie poklasis). Tai po transliacijos modifikuojamas bakteriocinas, kuris pasižymi specifiniu S-ryšiu prijungta gliukoze cisteino liekanoje (Kaunietis *et al.*, 2019). Atlikti tyrimai parodo, kad termofilinės bakterijos yra geras ir neištirtas naujų antibakterinių medžiagų, tokių kaip bakteriocinai, šaltinis (Vaičiškaitė *et al.*, 2019).

### 1.7. Atlikti tyrimai

Ankstesnių darbų metu *G. stearothermophilus* 15 genome identifikuotas genas koduojantis Geo19 ir nustatyta jo aminorūgščių seka (priskirtas numeris: LVHZ01000044), genų klasteris pavaizduotas 1.3 pav. Taip pat buvo nustatyta, kad bakteriocino Geo19 aminorūgščių seka yra panaši į *B. subtilis* produkuojamo SDP toksino peptido pirmtaką. Baltymo Geo19B seka turi 36,9 % panašumą į SdpB baltymą, Geo19C seka 32,1 % panaši į SdpA, o Geo19A (bakteriocino pirmtakas) seka 25 % panaši į SdpC (SDP toksino pirmtakas) (Ulinaitė, 2020). Remiantis literatūros duomenimis yra žinoma, kad nesubrendusio SdpC bakteriocino peptido molekulinė masė yra 22,22 kDa, be signalinio peptido – 18,79 kDa (Müller *et al.*, 2000), subrendusio SdpC peptido – 4,3 kDa (Liu *et al.*, 2010). Manoma, kad bakteriocino Geo19 be signalinio peptido molekulinė masė yra 19 kDa. su signaliniu peptidu – 22 kDa. Įvertinus panašumą į SDP bakteriociną, ir tai, kad Geo19 bakteriocinai greičiausiai nėra po transliacijos modifikuojami. Numanoma subrendusio Geo19 molekulinė masė be signalinės sekos yra mažesnė už 10 kDa ir galėtų būti priskirtas II klasės bakteriocinams (Ulinaitė, 2020; Vilpiškaitė, 2021).



1.3 pav. Geobaciliną 19 koduojantis genų klasteris *G. stearothermophilus* 15 genome. Bakteriocino pirmtakas – geltona spalva, hipotetinis baltymas – mėlyna, AAA+ šeimos ATPazė – žalia, genai koduojantys peptidazes – raudona

Taip pat ankstesnių darbų metu siekiant susintetinti aktyvų *Geo19* ir įvertinti *geo19ABCD* genų klasterio koduojamų baltymų funkcijas, genai buvo klonuoti į raiškos vektorius pCDFDuet-1, pETDuet-1 ir pRSFDuet-1, kurie buvo perkelti į skirtingus raiškos kamienus (*E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3), BL21 (DE3) ir *B. subtilis* NZ8900). Tačiau susintetinti aktyvaus bakteriocino nepavyko (Ulinauskaitė, 2020; Vilpišauskaitė, 2021).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

#### 2.1.1. Plazmidės

DNR klonavimui naudotos pCDFDuet-1 (Novagen), pET26b(+) (Novagen), pNW33N-ptaGFP (Frenzel *et al.*, 2018), pRSFDuet-1 (Novagen) plazmidės (2.1 lentelė).

2.1 lentelė. Naudotos plazmidės ir bakterijų kultūros

Bakterijų kultūros	Plazmidės	Atrankos žymuo
<i>E. coli</i>	pCDFDuet-1	spektinomocinas,
	pRSFDuet-1	kanamicinas
	pET26	kanamicinas
<i>G. thermoglucosidasius</i>	pNW33N-ptaGFP	chloramfenikolis

#### 2.1.2. Bakterijų kamienai ir augimo sąlygos

Darbe naudotas *E. coli* DH5 $\alpha$  (Novagen) klonavimo kamienas bei skirtingi *E. coli* raiškos kamienai: Arctic Express (DE3) (Agilent), C41 (DE3) (Novagen), Rosetta (DE3) (Novagen) Darbe taip pat naudoti termofiliniai bakterijų kamienai: *G. thermoglucosidasius* DSM 2542, *G. stearothermophilus* 15, ir *G. stearothermophilus* 9A11. *E. coli* kamienai auginti Luria-Bertani (LB) terpėje 37 °C temperatūroje 180 aps./min. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 kamienas augintas skystoje 2SPY terpėje ir agarizuotoje TSA terpėje 55 °C temperatūroje 200 aps./min. (Sheng *et al.*, 2017). *G. stearothermophilus* 15 ir *G. stearothermophilus* 9A11 kamienai auginti maitinamojo buljono (MB) terpėje 55 °C temperatūroje 200 aps./min. Darbe naudotos augimo terpės ir jų sudėtys aprašytos 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Naudotos terpės

Terpės pavadinimas	Sudėtis
GYT	100 mL/L glicerolio (Roth) 1,25 g/L mielių ekstrakto (Bacto) 2,5 g/L triptono (Roth)
LB (Roth)	10 g/L peptono 5 g/L mielių ekstrakto 10 g/L NaCl
MB	5 g/L NaCl (Roth) 10 g/L peptono (Roth) 5 g/L mėsos ekstrakto (Merck)
SOC	5 g/L mielių ekstrakto (Bacto) 20 g/L peptono (Roth)

	0,5 g/L NaCl (Roth) 0,186 g/L KCl (Merck) 2,4 g/L MgSO <sub>4</sub> (Merck) 20 mL/L 20 % gliukozės tirpalo (Roth)
2SPY	16 g/L sojų peptono (Bacto) 10 g/L mielių ekstrakto (Bacto) 5 g/L NaCl (Roth)

Agarizuota MB terpė buvo gaminama į terpę pridedant 15 g/L agarą (Oxoid). *E. coli* kamienų auginimui naudota komercinė agarizuota LB (Roth) terpė. *G. thermoglucosidarius* DSM 2542 kamieno auginimui naudota komercinė agarizuota TSA (Becton Dickinson) terpė. Į SOC terpę po sterilinimo pridedama filtruota (0,22 μm) gliukozė, NaCl, KCl ir MgSO<sub>4</sub>. Esant poreikiui terpės buvo papildomos atitinkamais antibiotikais: kanamicinas 30 μg/mL, spektinomocinas 50 μg/mL, chloramfenikolis 10 μg/mL (*G. thermoglucosidarius*) ir 34 μg/mL (*E. coli* Rosetta (DE3)), gentamicinas 20 μg/mL (Arctic Express (DE3)).

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

Klonavimo darbams buvo atliekama PGR naudojant Phusion HF polimerazę (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Kolonijų PGR metu naudojama PfuX7 polimerazė (Nørholm, 2010) su Green DreamTaq polimerazės buferiu (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Naudoti pradmenys pateikti 2.3 lentelėje.

### 2.3 lentelė. Naudoti PGR pradmenys

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'-3'	Restrikcijos saitas
Geo 19A-NcoI.F	TCAGTCCATGGGCAAAAAGGTTCTATCTCTACTAGCT ATATTCACCTTTAGTAGTGCCA	NcoI
-spGeo19A-PagI	CATGAATCATGAAAGAATTAATAAGATTACTCCGGTG AGGAGCT	PagI
Geo19A-XhoI.R	ATGCACTCGAGTTAGGGAATTCTTTCGGCAATTAAGT CAATGTATTGTTCTCTAGC	XhoI
ACYCDuetUp1	GGATCTCGACGCTCTCCCT	–
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	–
Geo19-pNW-pta.F	AGGGAGGATTCGTTCCCGGGGATCGAAAGATAGGG GGAATTTTAATAAGGTCATGAATCAG	–
Geo19-pNW-3TER.R	TTAAGCTGGCTTGGCGGCGTCCTAGTTAGGGAATTCT TTCGGCAATTAAGTCAATGTATTGT	–

### 2.2.2. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė buvo atliekama agarozės gelyje siekiant nustatyti PGR produkto ilgį ir/arba koncentraciją. Elektroforezės metu mėginiai išskirstomi 1 % agarozės gelyje su etidžio bromidu (AppliChem) (0,1 µg/mL). Sistema užpildoma 1 × TAE buferiniu tirpalu (Thermo Fisher Scientific). DNR elektroforezė vykdoma veikiant 100 V įtampai, 30 min. Po elektroforezės geliai vizualizuojami ir analizuojami naudojant gelių dokumentavimo įrangą MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging System). Kartu su mėginiais į gelį taip pat įleidžiami DNR fragmentų ilgio standartai GeneRuler (Thermo Fisher Scientific) arba MassRuler (Thermo Fisher Scientific), kad būtų galima įvertinti PGR produkto ilgį ir/arba koncentraciją.

### 2.2.3. DNR išskyrimas, valymas ir klonavimas

Genominei DNR išskirti naudojamas GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific) rinkinys. Plazmidinei DNR iš bakterijų kultūrų išskirti naudojamas GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) arba ZR plazmid Miniprep – Classic (Zymo Research) rinkiniai. DNR valymui naudojamas GeneJET PCR Purification (Thermo Fisher Scientific) arba ZR DNA Clean and Concentrator – 5 (Zymo Research) rinkiniai. DNR skyrimai ir valymai atliekami pagal rinkinių gamintojų protokolus. DNR karpymas atliekamas pagal gamintojo pateiktą protokolą naudojant Fast Digest (FD) restriktazes: PagI, NcoI, XhoI, PaeI, BamHI (Thermo Fisher Scientific). DNR ligavimas atliekamas naudojant T4 DNR ligazę (Thermo Fisher Scientific) arba NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB) klonavimo rinkiniai naudojami pagal gamintojo rekomendacijas.

### 2.2.4. Geno *geo19A* klonavimas į pET26b(+) vektorių

Genas *geo19A*, koduojamas *G. stearothermophilus* 15 kamieno genome, buvo pagausintas PGR metodu. Pagausinimui naudoti Geo19A-NcoI.F ir Geo19A-XhoI.R pradmenys. Gautas PGR produktas *geo19A* – sukarpytas su restriktazėmis: NcoI ir XhoI. Plazmidė pET26b(+) sukarpyta naudojant NcoI ir XhoI restriktazes ir suliguota su *geo19A* naudojant T4 DNR ligazę. Ligavimo mišinys elektroporacijos metodu perkeltas į *E. coli* DH5α ląsteles. Teigiami transformantai, turintys naują konstruktą pET26-pelB-*geo19A*, atrinkti kolonijų PGR metodu naudojant pradmenis ACYCDuetUp1 ir T7 Terminator. Atrinkti teigiami transformantai buvo persėti į šviežią LB terpę su kanamicinu ir auginti per naktį. Ryte iš bakterijų kultūros išskirtas konstruktas pET26-pelB-*geo19A*.

*G. stearothermophilus* 15 genome koduojamam bakteriocino pirmtako be lyderinės sekos genui pagausinti naudojamas PGR metodas. Pagausinimui naudoti -spGeo19A-PagI ir Geo19A-XhoI.R

pradmenys. Gautas PGR produktas *geo19A(-sp)* – sukarpytas su restriktazėmis: PaeI ir XhoI. Plazmidė pET26b(+) sukarpyta naudojant NcoI ir XhoI restriktazes ir suliguota su *geo19A(-sp)* naudojant T4 DNR ligazę. Ligavimo mišinys elektroporacijos metodu perkeltas į *E. coli* DH5α ląsteles. Teigiami transformantai, turintys naują konstruktą pET26-pelB-*geo19A(-sp)*, atrinkti kolonijų PGR metodu naudojant pradmenis ACYCDuetUp1 ir T7 Terminator. Atrinkti teigiami transformantai buvo persėti į šviežią LB terpę su kanamicinu ir auginti per naktį. Ryte iš bakterijų kultūros išskirtas konstruktas pET26-pelB-*geo19A(-sp)*.

#### 2.2.5. Genų *geo19A*, *geo19B* ir *geo19C* klonavimas į pNW33N vektorių

Genų klasteris *geo19ABC*, koduojamas *G. stearothermophilus* 15 kamieno genome, buvo pagausintas PGR metodu. Pagausinimui naudoti Geo19-pNW-pta.F ir Geo19-pNW-3TER.R pradmenys ir gautas PGR produktas *geo19ABC*. Plazmidė pNW33N-ptaGFP buvo sukarpyta restriktazėmis BamHI ir PaeI, iškerpant GFP geną, ir suliguota su *geo19ABC* naudojant NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix klonavimo rinkinį. Ligavimo mišinys elektroporacijos metodu perkeltas į *E. coli* DH5α ląsteles. Teigiami transformantai, turintys naują konstruktą pNW33N-pta-*geo19ABC*, atrinkti apšviečiant UV lempa, kolonijos su insertu nešvietė žaliai, o ląstelės su pNW33N-ptaGFP švytėjo žaliai. Atrinkti teigiami transformantai buvo persėti į šviežią LB terpę su chloramfenikoliu ir auginti per naktį. Ryte iš bakterijų kultūros išskirtas, sukonstruotas vektorius pNW33N-pta-*geo19ABC*.

#### 2.2.6. Elektrokompentinių *E. coli* ląstelių ruošimas

*E. coli* DH5α, (DE3), Arctic Express (DE3), C41(DE3) ir Rosetta (DE3) auginamos skystoje LB terpėje per naktį. *E. coli* Arctic Express (DE3) auginimo terpę papildant gentamicinu ir *E. coli* Rosetta (DE3) terpę papildant chloramfenikoliu. Ryte 1 % kultūros persėta į šviežią LB terpę ir toliau auginama tomis pačiomis sąlygomis iki optinio tankio 0,5 (OT600 nm). Pasiekus reikiamą optinį tankį, ląstelės vėsintos ledo vonelėje 10 min. ir centrifuguojamos 20 min. 4000 × g, 4 °C temperatūroje. Ląstelės plaunamos 30 mL steriliu 10 % glicerolio tirpalu ir centrifuguojama 20 min. 5000 × g, 4 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas ir taip ląstelės plaunamos dar 3 kartus centrifuguojant 20 min. 5000 × g, 4 °C temperatūroje. Tuomet supernatantas nupilamas ir ląstelių nuosėdos suspenduojamos 400 μL GYT terpės. Suspenduotos elektrokompentinės ląstelės išpilstomos į mėgintuvėlius po 45 μL ir laikomos -70 °C temperatūroje.



### 2.2.7. Elektrokompentinių *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 ląstelių ruošimas

*G. thermoglucosidasius* DSM 2542 auginamas TSA terpėje per naktį. Ryte ląstelės plaunamos nuo Petri lėkštelės skysta 2SPY terpe. Gauta ląstelių suspensija inokuliuojama į skystą 2SPY terpe, kad galutinis optinis tankis (OT600nm) terpėje būtų lygus 0,1 ir auginama iki 2. Pasiėkus reikiamą optinį tankį, ląstelės vėsintos ledo vonelėje 10 min. Tuomet ląstelės centrifuguojamos 15 min. 2500 × g, 4 °C temperatūroje. Ląstelių nuosėdos plaunamos suspenduojant 30 mL filtruotu GSM (glicerolis – 10 % ml/L, sorbitolis – 0,5 M, manitolis – 0,5 M) buferiu ir centrifuguojama tokiomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas ir taip ląstelių nuosėdos plaunamos dar 3 kartus. Po plovimo ląstelės suspenduojamos 2 ml GSM buferyje. Suspenduotos elektrokompentinės ląstelės išpilstomos į mėgintuvėlius ir laikomos -70 °C temperatūroje.

### 2.2.8. Elektrotransformacija

*E. coli* DH5α transformuotos naudojant elektroporacijos metodą. Į elektrokompentines ląsteles dedama 1 μL DNR ir perkeliama į atvėsintas kiuvetes. Atliekant elektroporaciją naudojamos kiuvetėse su 1 mm tarpu ir taikant 18 kV/cm, 5 ms parametrus. Po elektrotransformacijos ląstelės regeneruotos 1 mL SOC terpėje 1 val. 800 aps./min., 37 °C temperatūroje. Po regeneracijos, transformuotos *E. coli* DH5α ląstelės išsėtos ant agarizuotos LB terpės su atitinkamais antibiotikais ir per naktį inkubuotos termostate. Kolonijų PGR metodu atrenkami teigiami *E. coli* DH5α transformantai. Transformantai, turintys konstrukta, užsėjami į skystą LB terpe su atitinkamu antibiotiku ir auginami per naktį.

Transformacija elektroporacijos metodu į *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 kamieną atliekama naudojant kiuvetes su 1 mm tarpu ir taikant 25 kV/cm, 5 ms parametrus. Į elektrokompentines ląsteles dedama 3 μL plazmidės ir perkeliama į atvėsintas kiuvetes. Po elektrotransformacijos ląstelės regeneruotos 2 ml 2SPY terpėje, kuri papildyta 10ml/L sterilaus glicerolio. Regeneruojama 3 val. 200 aps./min., 52 °C temperatūroje. Po regeneracijos, transformuotos ląstelės išsėjamos ant agarizuotos TSA terpės su antibiotiku chloramfenikoliu ir per naktį inkubuojamos termostate 55°C temperatūroje.

### 2.2.9. Rekombinantinio baltymo biosintezė

*E. coli* C41(DE3) ir *E. coli* Rosetta (DE3) raiškos kamienai su atitinkamai perkeltais konstruktais auginami skystoje LB terpėje su atitinkamais antibiotikais. Ląstelės auginamos iki

optinio tankio 0,5 (OT600). Pasiekus reikiamą optinį tankį genų raiška yra indukuojama naudojant 1 mM IPTG. Ląstelių indukcija vykdoma 3 val.

*E. coli* Arctic Express (DE3) raiškos kamienas su atitinkamai perkeltais konstruktais auginamas skystoje LB terpėje su atitinkamais antibiotikais 200 aps./min., 30 °C temperatūroje. Ląstelės auginamos iki optinio tankio 0,5 (OT600). Pasiekus reikiamą optinį tankį, genų raiška yra indukuojama naudojant 1 mM IPTG induktorių. Ląstelių indukcija vykdoma 24 val., 200 aps./min., 13 °C temperatūroje.

Po indukcijos ląstelės centrifuguojamos centrifuginiuose mėgintuvėliuose prie 7000 × g, 20 min., 4 °C temperatūroje. Nucentrifuguotos ląstelės plaunamos, siekiant pašalinti antibiotikus, suspenduojant 50 mM natrio fosfato buferyje pH 7,4. Nucentrifuguojama 7000 × g, 20 min., 4 °C temperatūroje, supernatantas nupilamas ir plovimas kartojamas dar vieną kartą. Ląstelės toliau ardomos ultragarsu naudojant sonikatoriu (SONICS – Vibra cell) naudoti parametrai: laikas 5 min (on – 5 s, off – 10 s), amplitudė 35 %. Po suardymo ląstelės centrifuguojamos prie 18000 × g, 10 min. Atskiriama tirpi ir netirpi frakcija. Netirpi baltymų frakcija suspenduojama 25 mM natrio fosfato su 8 M urėja buferyje pH 7,4. Ištirpinti netirpios frakcijos baltymai centrifuguojami prie 18000 × g, 10 min.

*G. thermoglucosidarius* DSM 2542 raiškos kamienas su perkeltu pNW33N-pta-geo19ABC konstruktu auginamas per naktį 55 °C temperatūroje ant TSA terpės su chloramfenikoliu, ryte lėkštelė nuplaunama su skysta 2SPY terpe. Tuomet į šviežią 2SPY terpę, su chloramfenikoliu, inokuliuojama ląstelių suspensija taip, kad galutinis optinis tankis (OT600 nm) būtų lygus 0,1. Auginama 55 °C, 200 aps./min. Taip pat, kaip kontrolė, auginamos ląstelės su tuščia plazmide. Kadangi plazmidė turi konstitutyvų promotorių *pta* todėl genų raiškos papildomai indukuoti nereikia. Mėginiai analizei surenkami po 6 val., 8 val., 10 val. indukcijos ir nucentrifuguojami prie 10000 × g, 5 min., atskiriamas supernatantas nuo ląstelių.

#### 2.2.10. Baltymų koncentravimas

Baltymų koncentravimas iš supernatanto buvo atliekamas pagal Wessel ir Flügge (1984) vykdant baltymų ekstrahavimą chloroformu ir metanoliu. Paimama 100 µL mėginio, 1,5 mL tūrio ependorfe, sumaišoma su 400 µL metanolio ir išvorteksuojama. Įpilama 100 µL chloroformo, išvorteksuojama, tuomet įpilama 300 µL dejonizuoto vandens. Susidrumstęs mėginys išvorteksuojamas ir centrifuguojamas 14000 × g, 1 min. Susidaro trys frakcijos: vandens, baltymų ir chloroformo, su pipetmanu nusiurbiamas viršutinis vandeninis sluoksnis, nepaliekiant baltymų – vidurinio sluoksnio. Į ependorfą su likusiomis frakcijomis įpilama 400 µL metanolio,

išvorteksuojama ir centrifuguojama  $20000 \times g$ , 5 min. Pašalinama kiek galima daugiau metanolio nepaliečiant nuosėdų ir džiovinama apie 1 val.

#### 2.2.11. NDS-PAGE baltymų elektroforezė

Tricininė-NDS-PAGE baltymų elektroforezė atliekama pagal Schagger (2006) protokolą. Baltymų skirstymas atliekamas NDS-poliakrilamido gelyje – 4 % koncentruojamajam, 10 % tarpiniame ir 16 % skirstomajame geliuose. Kartu su mėginiais į gelį taip pat leista baltymų liniuotė PageRuler Broad Range Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) arba Multicolor Low Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Po elektroforezės gelis fiksuojamas fiksacijos tirpale 15 min. (70 % H<sub>2</sub>O, 10 % acto rūgšties (Merck), 20 % propanolio (Roth)). Po fiksacijos, gelis yra plaunamas dejonizuotame vandenyje 3 kartus po 10 min. Tuomet gelis dažomas PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Fisher Scientific) dažų pagal gamintojo rekomendacijas. Po elektroforezės geliai vizualizuojami ir analizuojami naudojant gelių dokumentavimo įrangą MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging System).

#### 2.2.12. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas

Indikatorinis *G. stearothermophilus* 9A11 kamienas naudojamas tikrinti bakteriocino antibakterinį aktyvumą. Ruošiant lėkšteles su indikatoriniu kamieniu šviežia *G. stearothermophilus* 9A11 kultūra gazonu užsėjama ant Petri lėkštelės su agarizuota MB terpe ir auginama 55 °C temperatūroje 4-5 val. Tuomet lėkštelės plaunamos nuo Petri lėkštelės skysta MB terpe. Gauta lėkštelių suspensija inokuliuojama į nesustingusią agarizuotą MB terpę kurios galutinis optinis tankis (OT600nm) terpėje būtų lygus 0,5. Terpė gerai išmaišoma ir išpilstoma į Petri lėkšteles.

Tikrinant mėginio antibakterinį aktyvumą šulinėlių difuzijos metodu Petri lėkštelėse su jautriu kamieniu, naudojant sterilių pipetmano antgalį yra padaromi šulinėliai. Į šulinėlius pilama po 50 µL mėginio. Lėkštelės inkubuojamos 55 °C temperatūroje 12-18 val. Po inkubacijos atliekamas inhibicinės zonos vertinimas.

Siekiant įvertinti antibakterinio peptido aktyvumą po tricininės-NDS-PAGE baltymų elektroforzės, gelis yra fiksuojamas ir plaunamas dejonizuotu vandeniu ir perkeliamas į Petri lėkštelę. Ant gelio užpilama agarizuota nesustingusi MB terpė su *G. stearothermophilus* 9A11 kamieniu. Susitingus agarui lėkštelė inkubuojama 12-18 val. 55 °C temperatūroje. Inhibicinės zonos lyginamos su kartu elektroforezės metu gelyje leista baltymų liniuote Multicolor Low Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).



### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Genų *geo19ABC* raiška *E. coli* ląstelėse

Šiame darbe toliau bus bandoma susintetinti aktyvų Geo19 bakteriociną. Ankstesnių darbų metu atliekant Geo19ABCD baltymų raišką *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse susintetinti aktyvaus bakteriocino nepavyko. Buvo iškelta idėja, jog Geo19B ir Geo19C baltymai, galimai svarbūs bakteriocino biosintezėi, yra orientuoti į periplazmą, todėl manoma, kad jie turi sąveikauti su bakteriocino prekursoriumi Geo19A už ląstelės ribų. Ko pasiekti nebuvo įmanoma praeitų darbų metu, kuomet bakteriocino prekursorius Geo19A po biosintezės buvo lokalizuojamas ląstelės viduj. Dėl šios priežasties iškėlėme idėją, jog prie prekursoriaus pridėjus pelB signalinę seką, peptidas bus perkliamas į periplazmą, kurioje galės sąveikauti su membraniniais Geo19BC baltymais.

Šiam tikslui bakteriocino peptido be signalinės sekos genas *geo19A(-sp)* bei genas su signaline seka *geo19A* buvo įklonuotas į pET26b(+) plazmidę kurioje peptido skaitymo rėmelis sujungtas su *E. coli* sekrecijos signaliniu peptidu pelB. Buvo gauti konstruktai pET26-pelB-*geo19A* ir pET26-pelB-*geo19A(-sp)*. Ir taip pat naudoti ankstesnių darbų metu gauti konstruktai: pRSF-*geo19A*, pRSF-*geo19A(-sp)* ir pCDF-*geo19BC*.

##### 3.1.1. Genų raiškos *E. coli* ląstelėse įvertinimas NDS-PAGE metodu

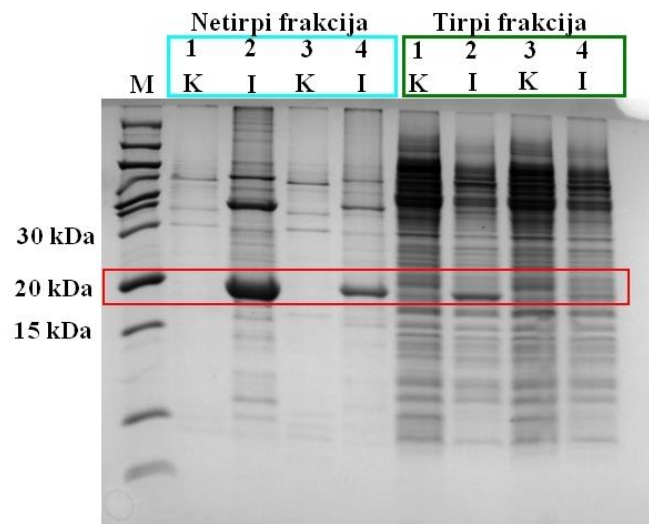
Siekiant susintetinti aktyvų Geo19 bakteriociną visi turimi konstrukti buvo perkelti į skirtingus raiškos kamienus: *E. coli* Arctic Express (DE3), C41 (DE3) ir Rosetta (DE3) (3.1 lentelė). *E. coli* Rosetta (DE3) raiškos kamienas yra išskirtinis tuo, nes yra skirtas sustiprinti baltymų ekspresiją, nes turi retai naudojamų *E. coli* kodonus. *E. coli* Arctic Express (DE3) buvo pasirinktas nes yra auginamas žemesnėje temperatūroje (13°C) ir tikimasi kad tai gali turėti įtakos sintetinant baltymus. *E. coli* C41 (DE3) kamienas dažniausiai naudojamas toksiniams baltymams, tačiau tinka ir netoksišiam ir yra tikimais efektyvios peptidų biosintezės.

3.1 lentelė. Konstrukti, perkelti į *E. coli* Arctic Express (DE3), C41 (DE3) ir Rosetta (DE3) raiškos kamienus. Pilka spalva pažymėti konstrukti, kurie yra gauti ankstesnių darbų metu

Konstrukti	Koekspresuoti genai	Raiškos kamienas
pRSF- <i>geo19A</i>	<i>geo19A</i>	<i>E. coli</i> Arctic Express (DE3)
pRSF- <i>geo19A</i> + pCDF- <i>geo19BC</i>	<i>geo19ABC</i>	
pRSF- <i>geo19A(-sp)</i>	<i>geo19A(-sp)</i>	
pRSF- <i>geo19A(-sp)</i> + pCDF- <i>geo19BC</i>	<i>geo19A(-sp)BC</i>	
pRSF- <i>geo19A</i>	<i>geo19A</i>	<i>E. coli</i> C41 (DE3)
pRSF- <i>geo19A</i> + pCDF- <i>geo19BC</i>	<i>geo19ABC</i>	

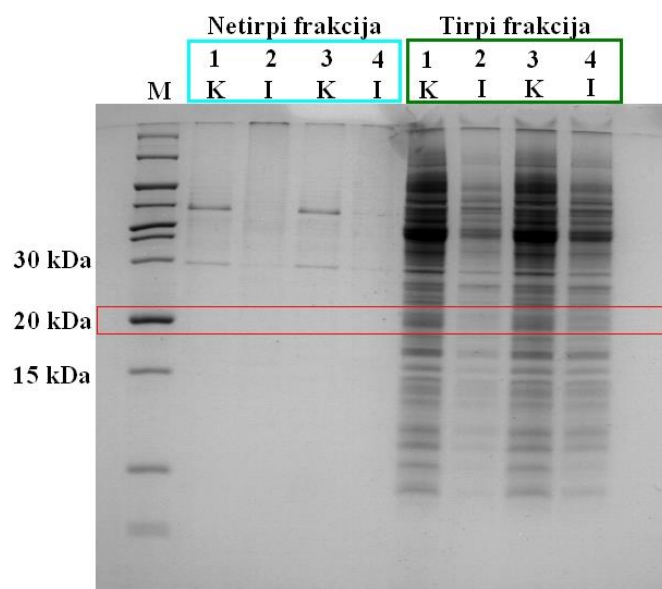
pRSF-geo19A(-sp)	<i>geo19A(-sp)</i>	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)
pRSF-geo19A(-sp) + pCDF-geo19BC	<i>geo19A(-sp)BC</i>	
pET26-pelB-geo19A	<i>geo19A</i>	
pET26-pelB-geo19A + pCDF-geo19BC	<i>geo19ABC</i>	
pET26-pelB-geo19A(-sp)	<i>geo19A(-sp)</i>	
pET26-pelB-geo19A(-sp) + pCDF-geo19BC	<i>geo19A(-sp)BC</i>	

Atlikus *geo19A(-sp)BC* genų raišką *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelėse, jos buvo surinktos ir suardytos. Analizė atlikta naudojant tricininę-NDS-PAGE baltymų elektroforezę. Teorinė Geo19 pirmtako be signalinio peptido molekulinė masė yra 19 kDa. Po indukcijos matome (Pav.3.1), kad šio baltymo sintezė įvyko. Baltymo profilis matomas tiek tirpioje tiek netirpioje frakcijoje. Netirpioje frakcijoje baltymo profilis matomas ryškiau indukavus *geo19A(-sp)* ir *geo19A(-sp)BC* genus, o tirpioje frakcijoje baltymo matosi mažiau. Galima teigti, kad frakcijos buvo ne visiškai atskirtos.



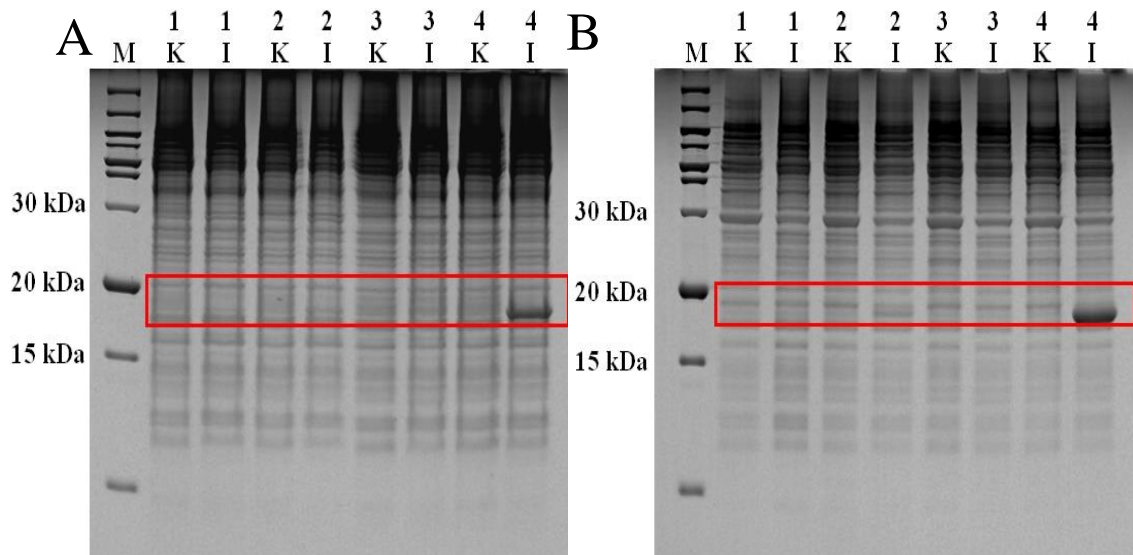
3.1 pav. *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių baltymų analizė tricininėje-NDS-PAGE gelyje po genų *geo19A*, *geo19B* ir *geo19C* koekspresijos. I – indukuota genų raiška, K – neindukuota genų raiška (kontrolė), M – markeris. 1 ir 2 – *geo19A(-sp)*, 3 ir 4 – *geo19A(-sp)BC*

Genų *geo19ABC* ekspresija tokiu pačiu principu buvo vykdoma ir *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelėse, Teorinė Geo19 pirmtako su signaliniu peptidu molekulinė masė yra 22 kDa. Po indukcijos matome, kad baltymo susintetinti nepavyko (3.2 pav). Galima manyti, kad signalinis peptidas trukdo susintetinti Geo19 *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelėse.



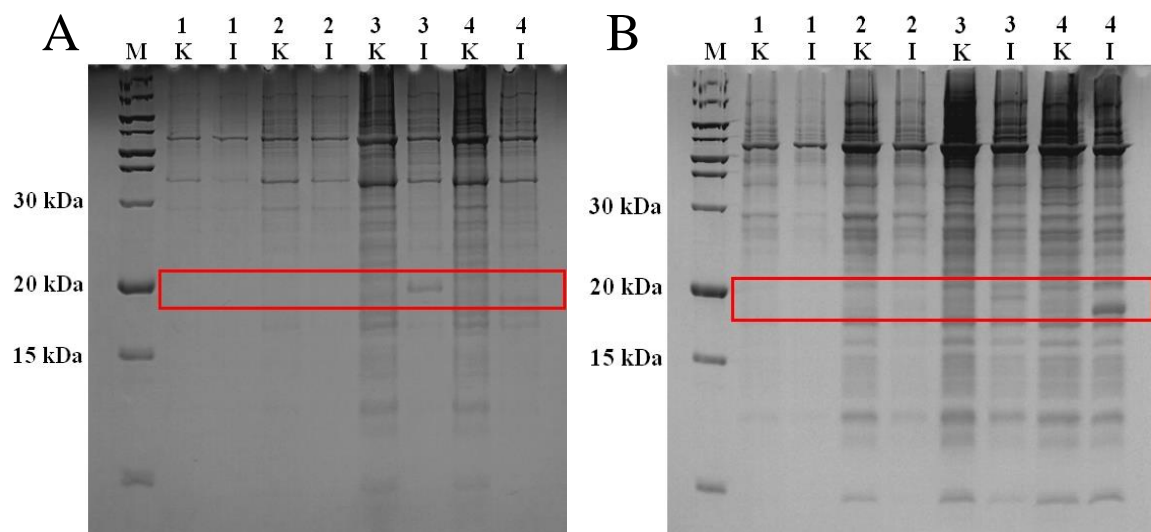
3.2 pav. *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių baltymų analizė tricininiamie-NDS-PAGE gelyje po genų *geo19A* ir *geo19B*, *geo19C* koekspresijos. I – indukuota genų raiška, K – neindukuota genų raiška (kontrolė), M – markeris. 1 ir 2 – *geo19A*, 3 ir 4 – *geo19ABC*

Tuo tarpu atlikus *geo19A(-sp)*, *geo19ABC* genų raišką *E. coli* C41 (DE3) ląstelėse, po indukcijos matome, kad šio baltymo sintezė įvyko (3.3 pav). Baltymo Geo19 profilis matomas tiek tirpioje tiek netirpioje frakcijoje, indukavus tik *geo19A(-sp)* geną. Ekspresuojant *geo19A(-sp)* geną kartu su *geo19BC* genais, baltymo Geo19 sintezė buvo labai silpna. Manoma, kad vienu metu sintetinti skirtingus baltymus, koduojamus skirtingose plazmidėse, ląstelės resursų nepakanka, nes jie naudojami ne vieno, o kelių baltymų sintezei. Dėl to sumažėja kiekvieno iš susintetintų baltymų kiekis ir NDS-PAGE elektroforezėje kai kurių baltymų profilių nematyti. Tačiau atlikus indukciją tik *geo19A* geno arba kartu su *geo19BC* genais baltymo sintezė neįvyko, manoma, kad jo sintezė neįvyko dėl signalinio peptido.



3.3 pav. *E. coli* C41 (DE3) ląstelių baltymų analizė tricininiam NDS-PAGE gelyje po genų *geo19A* ir *geo19B*, *geo19C* koekspresijos. A – netirpių baltymų frakcija, B – tirpių baltymų frakcija. I – indukuota genų raiška, K – neindukuota genų raiška (kontrolė), M – markeris. 1 – *geo19ABC*, 2 – *geo19A(-sp)BC*, 3 – *geo19A*, 4 – *geo19A(-sp)*

Atlikus *geo19A(-sp)*, *geo19ABC* genų raišką *E. coli* Arctic Express (DE3) ląstelėse, po indukcijos matome, kad šio baltymo sintezė įvyko (3.4 pav). Baltymo profilis matomas netirpioje frakcijoje indukavus *geo19A* geną ir tirpioje frakcijoje indukavus *geo19A(-sp)* geną. Todėl manoma kad *E. coli* Arctic Express (DE3) raiškos kamienne baltymo sintezei signalinis peptidas įtakos neturi. Tačiau atlikus indukciją kartu su *geo19BC* genais baltymo sintezė neįvyko.

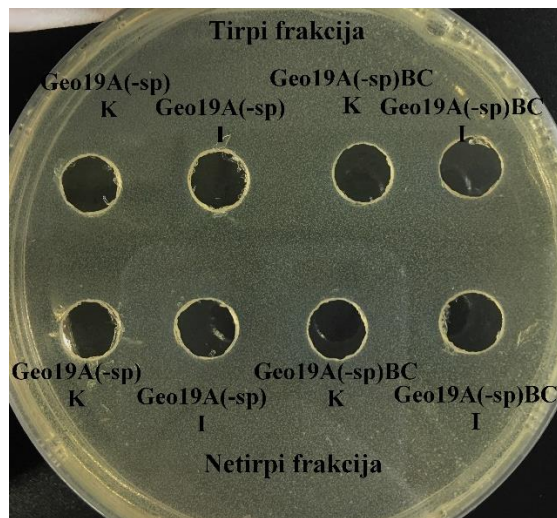


3.4 pav. *E. coli* Arctic Express (DE3) ląstelių baltymų analizė tricininiam NDS-PAGE gelyje po genų *geo19A* ir *geo19B*, *geo19C* koekspresijos. A – netirpių baltymų frakcija, B – tirpių baltymų frakcija. I – indukuota genų raiška, K – neindukuota genų raiška (kontrolė), M – markeris. 1 – *geo19ABC*, 2 – *geo19A(-sp)BC*, 3 – *geo19A*, 4 – *geo19A(-sp)*



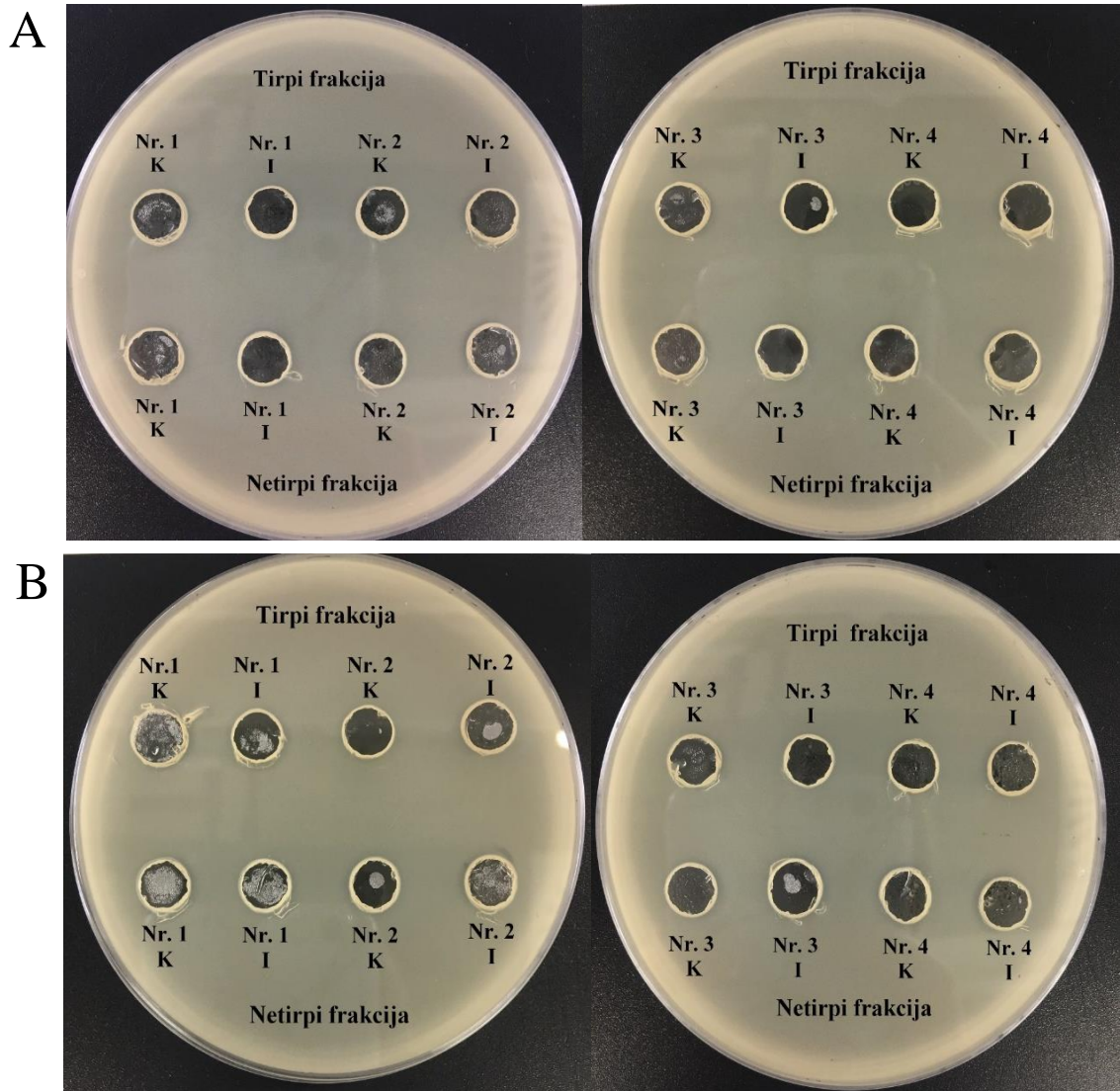
### 3.1.2. Geo19 antibakterinio aktyvumo įvertinimas po genų koekspresijos *E. coli* ląstelėse

Toliau šiame darbe buvo įvertintas antibakterinis bakteriocino aktyvumas prieš jautrų *G. stearothermophilus* 9A11 kamieną. Kadangi, *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelėse, bakteriocino peptidą pavyko susintetinti tik ekspresuojant Geo19 pirmtaką be signalinio peptido, buvo vertinamas tik šių mėginių antibakterinis aktyvumas. Antibakterinio aktyvumo vertinimui pasirinktas šulinėlių difuzijos metodas (3.5 pav.). Įvertinus antibakterinį aktyvumą, galima teigti, kad susintetintas Geo19 baltymas buvo neaktyvus.



3.5 pav. Antibakterinis ląstelių aktyvumas prieš jautrų *G. stearothermophilus* 9A11 kamieną po genų *geo19A(-sp)* ir *geo19B*, *geo19C* koekspresijos *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelėse. I – indukuota genų raiška, K – neindukuota genų raiška (kontrolė)

Taip pat buvo įvertintas antibakterinis bakteriocino aktyvumas ir po ekspresijos *E. coli* C41 (DE3) ir *E. coli* Arctic Express (DE3) kamienuose. Įvertinus antibakterinį aktyvumą šulinėlių difuzijos metodu, galima teigti, kad susintetintas Geo19 baltymas buvo neaktyvus (3.6 pav.).



3.6 pav. Antibakterinis ląstelių aktyvumas prieš jautrų *G. stearothermophilus* 9A11 kamieną po genų *geo19A* ir *geo19B*, *geo19C* koekspresijos. A – *E. coli* C41 (DE3) ląstelėse, B – *E. coli* Arctic Express (DE3) ląstelėse, I – indukuota genų raiška, K – neindukuota genų raiška (kontrolė) 1 – *geo19ABC*, 2 – *geo19A(-sp)BC*, 3 – *geo19A*, 4 – *geo19A(-sp)*

### 3.2. Genų *geo19ABC* raiška *G. thermoglucosidarius* ląstelėse

Nuo *G. stearothermophilus* 15 genominės DNR buvo pagausinti *geo19A*, *geo19B* ir *geo19C* genai ir įklonuoti į pNW33N-ptaGFP plazmidę vietoj GFP geno.

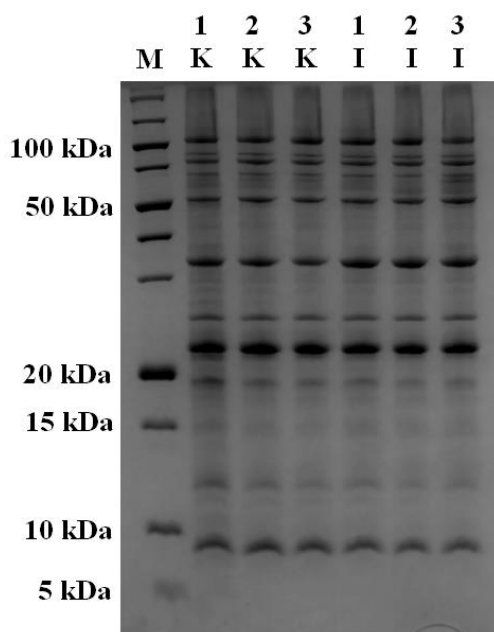
*E. coli* ląstelėse aktyvaus bakteriocino susintetinti nepavyko, todėl buvo pasirinkta *G. thermoglucosidarius* raiškos sistema. Buvo gautas konstruktas pNW33N-pta-*geo19ABC*, kuriame po konstitutyvaus promotoriaus *pta* įklonuotas genų klasteris *geo19ABC*. Šis konstruktas buvo perkeltas į termofilinį kamieną *G. thermoglucosidarius* DSM 2542 (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Konstruktai, perkelti į *G. thermoglucosidasius* raiškos kamieną

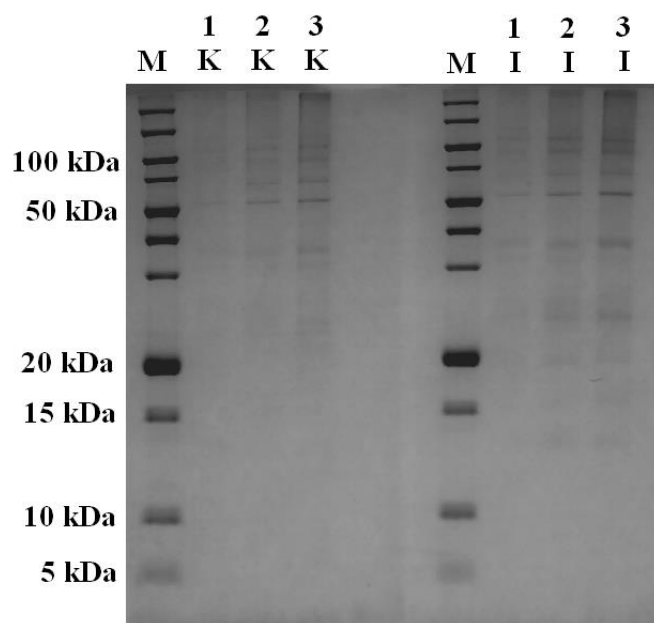
Konstruktai	Koekspresuoti genai	Raiškos kamienas
pNW33N-pta-geo19ABC	<i>geo19ABC</i>	<i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542
pNW33N	–	<i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542

3.2.1. Genų raiškos *G. thermoglucosidasius* ląstelėse įvertinimas NDS-PAGE metodu

Užauginus *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 ląsteles su pNW33N-pta-geo19ABC konstruktu, buvo surinkti ląstelių ir supernatantų mėginiai, Mėginiai analizuojami tricinine-NDS-PAGE baltymų elektroforeze. Atlikus elektroforezė su ląstelėmis Geo19 baltymo profilio nematome (3.7 pav). Tokie patys rezultatai ir atlikus sekretomo elektroforezė (3.8 pav), bet vaizdas nėra aiškus tai tikslų išvadų negalime padaryti. Manoma, kad susintetinto baltymo kiekis galėjo būti labai mažas ir nesimatyti. Nuspręsta toliau įvertinti susintetinto baltymo aktyvumą prieš jautrų kamieną *G. stearothermophilus* 9A11.



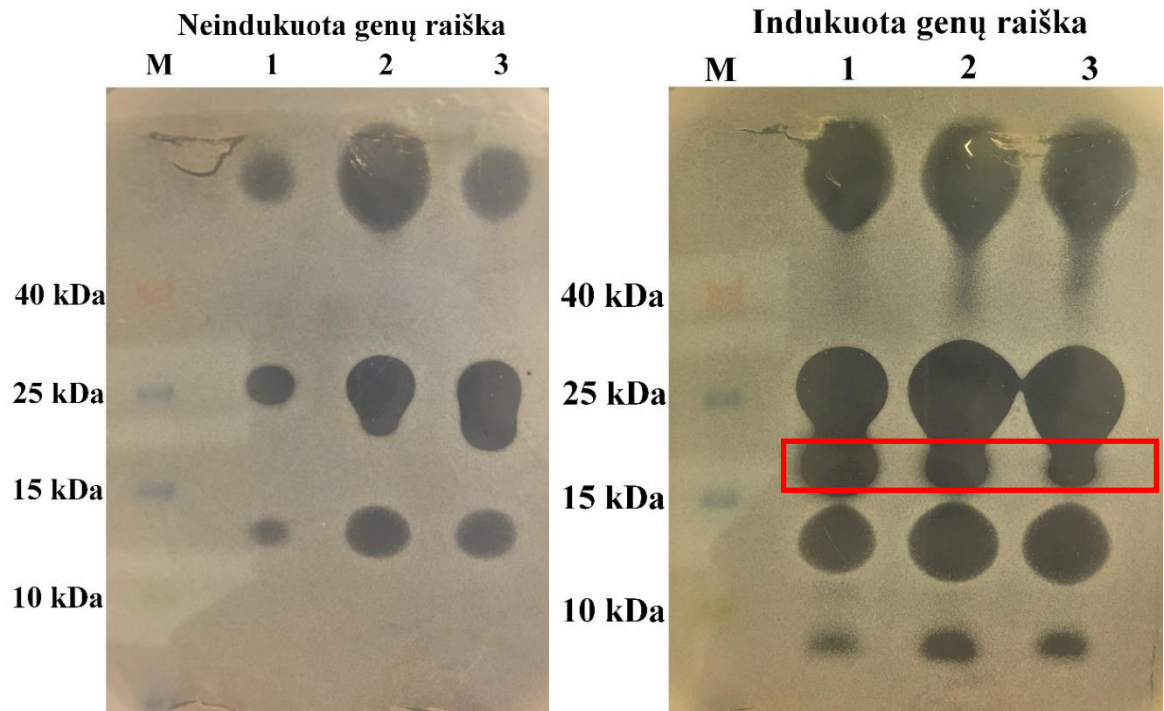
3.7 pav. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 ląstelių analizė tricininės-NDS-PAGE gelyje. I – indukuota genų raiška, K – neindukuota genų raiška, M – markeris, 1 – mėginys imtas po 6 val., 2 – mėginys imtas po 8 val., 3 – mėginys imtas po 10 val.



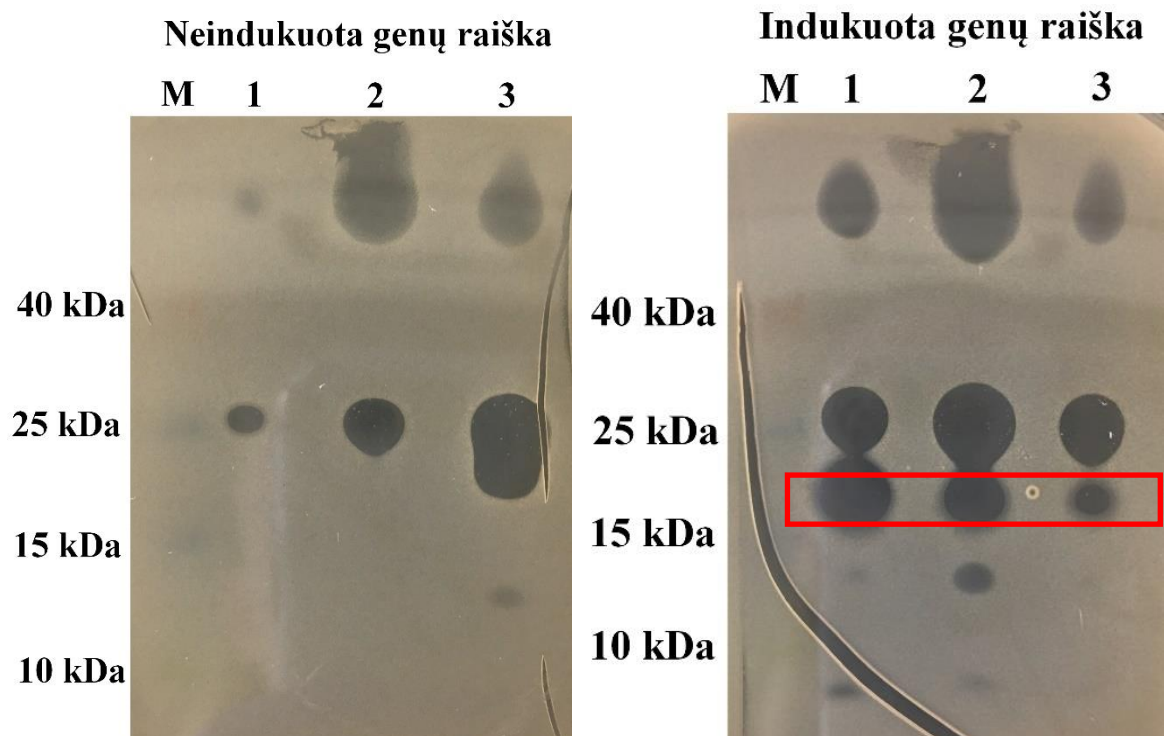
3.8 pav. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 sekretomo analizė tricininės-NDS-PAGE gelyje. I – indukuota genų raiška, K – neindukuota genų raiška, M – markeris, 1 – mėginys imtas po 6 val., 2 – mėginys imtas po 8 val., 3 – mėginys imtas po 10 val.

### 3.2.2. Geo19 antibakterinio aktyvumo įvertinimas po genų koekspresijos *G. thermoglucosidasius* ląstelėse

Tricininės-NDS-PAGE elektroforezės geliai, kuriuose buvo analizuoti sekretomo bei ląstelių mėginiai, buvo užpilti agarizuota terpe su jautriu *G. stearotherophilus* 9A11 kamieniu. Bandymas buvo kartojamas du kartus ir vertinamas aktyvumas. Mėginių su ląstelėmis analizė parodė, kad aktyvumas pasiskirsto visoje lėkštelėje, atskirų zonų nematome, todėl galima teigi, kad ląstelėse esantis didelis kiekis antimikrobinių medžiagų pasilieka ląstelėje ir nėra sekretuojamas už ląstelės. Geliuose su sekretomu matome daug įvairių inhibicijos zonų, kontrolėje matomos 4 aktyvumo zonos ties daugiau nei 40 kDa, 25 kDa, 23 kDa ir 13 kDa dydžiais. Indukuotoje genų raiškos gelyje matomos taip pat šios zonos, bet ir matomos papildomos dvi zonos kurios yra ties 19 kDa ir 6 kDa. Zonos kurios matomos ir kontrolėje, ir su indukuota genų raiška, greičiausiai yra *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 kamieno sintetiniai antimikrobiniai junginiai. Ties 6 kDa matoma zona galėtų būti *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 genome koduojamas, naujas Geo6 bakteriocinas, kurio molekulinė masė 5,5 kDa (Koniuchovaitė, 2021). Matomas aktyvumas ties 19 kDa galėtų būti susintetinto aktyvus Geo19 be signalinio peptido. Bakteriocino Geo19 be signalinio peptido molekulinė masė yra 19 kDa. su signaliniu peptidu – 22 kDa. Baltymo sinezei buvo naudojamas genų klasteris *geo19ABC* su signaliniu peptidu, tačiau kuomet ląstelės sekretuoja baltymą jo signalinė seka yra nukerpama todėl matomas aktyvumas ties 19 kDa (3.9 pav., 3.10 pav.).



3.9 pav. 1 bandymas. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 sekretomo analizė tricininės-NDS-PAGE gelyje užpylus agarizuota terpe su jautriu *G. stearothermophilus* 9A11 kamienu. M – markeris, 1 – mėginys imtas po 6 val., 2 – mėginys imtas po 8 val., 3 – mėginys imtas po 10 val.



3.10 pav. 2 bandymas. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 sekretomo analizė tricininės-NDS-PAGE gelyje užpylus agarizuota terpe su jautriu *G. stearothermophilus* 9A11 kamienu. M – markeris, 1 – mėginys imtas po 6 val., 2 – mėginys imtas po 8 val., 3 – mėginys imtas po 10 val.

### 3.3. Apibendrinimas

Atlikus Geobacilino 19 koduojančių genų raišką *E. coli* raiškos kamienuose galima teigti, kad *E. coli* Rosetta (DE3) ir *E. coli* C41 (DE3) raiškos kamienuose sintetinant Geo19 pirmtaką, be signalinio peptido, baltimo sintezė įvyksta, priešingai nei vykdant baltymo sintezę naudojant bakteriocino pirmtaką su signaliniu peptidu. Tačiau atlikus genų raišką *E. coli* Arctic Express (DE3) ląstelėse matome, kad bakteriocino signalinis peptidas baltimo sintezei įtakos neturi. Vertinant antibakterinį aktyvumą matome, kad pelB signalinė seka, Geo19 pirmtako signalinis peptidas, bei skirtingi *E. coli* raiškos kamienai nedarė įtakos aktyvaus bakteriocino sintezei. Taip pat geno *geo19A* koekspresija kartu su *geo19B* ir *geo19C* genais nedarė įtakos aktyvaus geobacilino 19 biosintezei.

Atlikus genų raišką *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 kamiene, pagal tricininės-NDS-PAGE baltymų elektroforezės rezultatus tikslių išvadų padaryti negalime, tačiau įvertinus baltymo aktyvumą yra manoma, kad baltymo sintezė yra vykdoma ir bakteriocinas susintetinamas aktyvus.

## IŠVADOS

1. *E. coli* Rosetta (DE3), *E. coli* C41 (DE3) ir *E. coli* Arctic Express (DE3) raiškos kamienai neturi įtakos aktyvaus bakteriocino sintezei.
2. Aktyvaus Geo19 produkcijai pelB signalinė seka neturi įtakos.
3. Geo19 pirmtako sintezė be signalinio peptido padeda susintetinti didesnį kiekį bakteriocino, tačiau jis nėra aktyvus.
4. *G. thermoglucosidarius* DSM 2542 raiškos kamiene geobacilino 19 biosintezės įvyko, ir bakteriocinas yra aktyvus, tačiau tai galutinai patvirtinti reikia papildomų tyrimų.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Dovilė Šablevičiūtė  
Magistro baigiamasis darbas

**BAKTERIOCINO GEOBACILINO 19 HETEROLOGINĖ BIOSINTEZĖ**

SANTRAUKA

Bakteriocinai tai ribosomų susintetinti antimikrobiniai baltymai, daugelis jų dėl mažo dydžio vadinami antimikrobiniais peptidais. Bakteriocinai pasižymi slopinamuoju poveikiu prieš tos pačios rūšies mikroorganizmus arba prieš kitos rūšies ar genties mikroorganizmus. Išsamūs šių antimikrobinių medžiagų veikimo mechanizmų tyrimai ir jų supratimas yra svarbus, siekiant juos pritaikyti medicinoje, vėžio gydime ir maisto pramonėje. Nors informacijos sparčiai daugėja, tačiau apie termofilinių bakterijų gaminamų bakteriocinų tyrimų yra atlikta labai nedaug. Nauji šios srities duomenys gali padėti termofilinių bakterijų gaminamus termostabilius bakteriocinus pritaikyti biotechnologijose ir pramonėje.

Šiame tyrime naudojamas *Geobacillus stearothermophilus* 15 kamienas, kuris anksčiau buvo išskirtas iš naftos telkinių Lietuvoje. Šis kamienas gamina du bakteriocinus tai yra geobaciliną 26 (Geo26) kuris yra 26 kDa molekulinės masės ir geobaciliną 19 (Geo19), kuris yra 19 kDa molekulinės masės dydžio. Šiame darbe buvo aprašomi geobacilino 19 tyrimai.

Šio darbo tikslas heterologiškai susintetinti aktyvų Geo19. Pirmiausiai buvo išbandyta heterologinė biosintezė *Escherichia coli* ląstelėse. Siekiant susintetinti aktyvų bakteriociną buvo išbandomi įvairūs variantai naudojant Geo19 pirmtaką su signaliniu peptidu ir be signalinio peptido, taip pat genų raišką kartu vykdant su *E. coli* sekrecijos signaliniu peptidu pelB. Genų raiška vykdoma karu su Geo19 biosintezę koduojančiais genais. Genų sintezė vykdoma skirtinguose *E. coli* raiškos kamienuose: Rosetta (DE3), C41 (DE3) ir Arctic Express (DE3). Nustatyta kad Geo19 pirmtako sintezė be signalinio peptido padeda susintetinti didesnę kiekį bakteriocino, tačiau jis nėra aktyvus ir, kad aktyvaus Geo19 produkcijai pelB signalinė seka neturi įtakos. Kadangi *E. coli* ląstelėse aktyvaus bakteriocino susintetinti nepavyko, toliau buvo išbandyta Geo19 biosintezės genų raiška *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 kamiene. Gauti rezultatai parodė, kad šiame termofiliniame kamiene buvo pasiekta aktyvaus bakteriocino biosintezė, tačiau tai galutinai patvirtinti dar reikia papildomų tyrimų.



VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER  
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Dovilė Šablevičiūtė

Master thesis

**HETEROLOGOUS BIOSYNTHESIS OF BACTERIOCIN GEOBACILLIN 19**

SUMMARY

Bacteriocins are antimicrobial proteins synthesised by ribosomes, many of which are known as antimicrobial peptides because of their small size. Bacteriocins have an inhibitory effect against micro-organisms of the same species or against micro-organisms of a different species or genus. Detailed research and understanding about the mechanisms of action of these antimicrobials is important for their application in medicine, cancer treatment and the food industry. Although the information is rapidly increasing, very little research has been carried out on bacteriocins produced by thermophilic bacteria. New data in this field may lead to the application of thermostable bacteriocins produced by thermophilic bacteria in biotechnology and industry.

The strain used in this study is *Geobacillus stearothermophilus* 15, which was previously isolated from oil fields in Lithuania. This strain produces two bacteriocins, geobacillin 26 (Geo26), which has a molecular mass of 26 kDa, and geobacillin 19 (Geo19), which has a molecular mass of 19 kDa. In this work, the studies on geobacillin 19 were described.

The aim of this work is to heterologously synthesise the active Geo19. First, heterologous biosynthesis was tested in *Escherichia coli* cells. In order to synthesize an active bacteriocin, different variants were tested using the Geo19 precursor with and without a signal peptide, as well as gene expression co-expressed with the *E. coli* secretory signal peptide pelB. Gene expression is carried out in concert with genes encoding Geo19 biosynthesis. Gene fusion is carried out in different *E. coli* expression strains: Rosetta (DE3), C41 (DE3) and Arctic Express (DE3). It was found that the synthesis of the Geo19 precursor without the signal peptide leads to the synthesis of a higher amount of bacteriocin, but that it is not active, and that the production of active Geo19 is not affected by the pelB signal sequence. As no active bacteriocin could be synthesised in *E. coli* cells, the gene expression of Geo19 biosynthesis in *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 was further tested. The results showed that active bacteriocin biosynthesis was achieved in this thermophilic strain, but further studies are still needed to confirm this conclusively.

## LITERATŪRA

1. Acedo, J.Z., Chiorean, S., Vederas, J.C., van Belkum, M.J., 2018. The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 805–828. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy033>
2. Acedo, J.Z., van Belkum, M.J., Lohans, C.T., McKay, R.T., Miskolzie, M., Vederas, J.C., 2015. Solution Structure of Acidocin B, a Circular Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2910–2918. <https://doi.org/10.1128/AEM.04265-14>
3. Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O.P., 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
4. Chen, H., Hoover, D.G., 2003. Bacteriocins and their Food Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2, 82–100. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x>
5. 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>
6. Arqués, J.L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J.M., Medina, M., 2015. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens. *BioMed Res. Int.* 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/584183>
7. Atanaskovic, I., Kleanthous, C., 2019. Tools and Approaches for Dissecting Protein Bacteriocin Import in Gram-Negative Bacteria. *Front. Microbiol.* 10, 646. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00646>

8. 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>
9. Bédard, F., Fliss, I., Biron, E., 2019. Structure–Activity Relationships of the Bacteriocin Bactofencin A and Its Interaction with the Bacterial Membrane. *ACS Infect. Dis.* 5, 199–207. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00204>
10. Bédard, F., Hammami, R., Zirah, S., Rebuffat, S., Fliss, I., Biron, E., 2018. Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof. *Sci. Rep.* 8, 9029. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27225-3>
11. Beukes, M., Bierbaum, G., Sahl, H.-G., Hastings, J.W., 2000. Purification and Partial Characterization of a Murein Hydrolase, Millericin B, Produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 23–28. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.23-28.2000>
12. Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R., 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 11621–11626. <https://doi.org/10.1073/pnas.191384198>
13. Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., Kolter, R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
14. Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A., Campos, C.A., 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Sci.* 87, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.11.006>
15. Chalón, M.C., Acuña, L., Morero, R.D., Minahk, C.J., Bellomio, A., 2012. Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods. *Food Res. Int.* 45, 735–744. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.024>
16. Cheng, C., Hua, Z.-C., 2020. Lasso Peptides: Heterologous Production and Potential Medical Application. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 571165. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.571165>
17. Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., Dicks, L.M., 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
18. Chumchalova, J., Smarda, J. 2003. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiol* 48, 111–115. <https://doi.org/10.1007/BF02931286>
19. Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., Håvarstein, L.S., 1998. Enterocins L50A and L50B, Two Novel Bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, Are

- Related to Staphylococcal Hemolysins. *J. Bacteriol.* 180, 1988–1994.  
<https://doi.org/10.1128/JB.180.8.1988-1994.1998>
20. 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)
  21. Coorevits, A., Dinsdale, A.E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., Logan, N.A., 2012. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly ‘thermoglucosidasius’); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1470–1485.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.030346-0>
  22. Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3, 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
  23. Cox, C.L., Doroghazi, J.R., Mitchell, D.A., 2015. The genomic landscape of ribosomal peptides containing thiazole and oxazole heterocycles. *BMC Genomics* 16, 778.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-2008-0>
  24. 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>
  25. Cursino, L., Šmarda, J., Chartone-Souza, E., Nascimento, A.M.A., 2002. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Braz. J. Microbiol.* 33.  
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000300001>
  26. da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J.M.D., Oliveira, R.P. de S., 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* 64, 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.041>
  27. 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>
  28. Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F., 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication 16.

29. Ellermeier, C.D., Hobbs, E.C., Gonzalez-Pastor, J.E., Losick, R., 2006. A Three-Protein Signaling Pathway Governing Immunity to a Bacterial Cannibalism Toxin. *Cell* 124, 549–559. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.041>
30. Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
31. Franz, C.M.A.P., Van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H., Gálvez, A., 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 293–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x>
32. Frenzel, E., Legebeke, J., van Stralen, A., van Kranenburg, R., Kuipers, O.P., 2018. In vivo selection of sfGFP variants with improved and reliable functionality in industrially important thermophilic bacteria. *Biotechnol. Biofuels* 11, 8. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-1008-5>
33. Fujita, M., Losick, R., 2005. Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev.* 19, 2236–2244. <https://doi.org/10.1101/gad.1335705>
34. Garg, N., Tang, W., Goto, Y., Nair, S.K., van der Donk, W.A., 2012. Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 5241–5246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116815109>
35. Gordon, D.M., O'Brien, C.L., 2006. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology* 152, 3239–3244. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28690-0>
36. Hetz, C., Bono, M.R., Barros, L.F., Lagos, R., 2002. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 2696–2701. <https://doi.org/10.1073/pnas.052709699>
37. Höfler, C., Heckmann, J., Fritsch, A., Popp, P., Gebhard, S., Fritz, G., Mascher, T., 2016. Cannibalism stress response in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 162, 164–176. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000176>
38. Hoskin, D.W., Ramamoorthy, A., 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 357–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008>
39. Kananavičiūtė, R., Čitavičius, D., 2015. Genetic engineering of *Geobacillus* spp. *J. Microbiol. Methods* 111, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.02.002>
40. Kaunietis, A., Buivydas, A., Čitavičius, D.J., Kuipers, O.P., 2019. Heterologous biosynthesis and characterization of a glycocin from a thermophilic bacterium. *Nat. Commun.* 10, 1115. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09065-5>

41. Kaur, S., Kaur, S., 2015. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Front. Pharmacol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00272>
42. Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R.T., Mercier, P., Diaper, C.M., Zuber, P., Vederas, J.C., 2003. Structure of Subtilosin A, an Antimicrobial Peptide from *Bacillus subtilis* with Unusual Posttranslational Modifications Linking Cysteine Sulfurs to  $\alpha$ -Carbons of Phenylalanine and Threonine. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4726–4727. <https://doi.org/10.1021/ja029654t>
43. Klaenhammer, T., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39–85. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90057-G](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90057-G)
44. Knerr, P.J., van der Donk, W.A., 2012. Discovery, Biosynthesis, and Engineering of Lantipeptides. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 479–505. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060110-113521>
45. Kobayashi, K., Ikemoto, Y., 2019. Biofilm-associated toxin and extracellular protease cooperatively suppress competitors in *Bacillus subtilis* biofilms. *PLOS Genet.* 15, e1008232. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008232>
46. Koniuchovaitė .A., 2021. *Naujų antibakterinių peptidų paieška ir biosintezė*. Magistro darbas. Vilniaus universitetas, Vilnius.
47. Kumarasamy, K.K., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C.G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A.V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D.L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J.B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M.A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D.M., Woodford, N., 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study 579–602. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70143-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2)
48. Lamsa, A., Liu, W.-T., Dorrestein, P.C., Pogliano, K., 2012. The *Bacillus subtilis* cannibalism toxin SDP collapses the proton motive force and induces autolysis: Mechanism of action of the SDP cannibalism toxin. *Mol. Microbiol.* 84, 486–500. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08038.x>
49. Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
50. Liu, W.-T., Yang, Y.-L., Xu, Y., Lamsa, A., Haste, N.M., Yang, J.Y., Ng, J., Gonzalez, D., Ellermeier, C.D., Straight, P.D., Pevzner, P.A., Pogliano, J., Nizet, V., Pogliano, K., Dorrestein, P.C., 2010. Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16286–16290. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008368107>

51. López, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R., 2009. Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*: Cannibalism and biofilm matrix. *Mol. Microbiol.* 74, 609–618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>
52. Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G.N., Kuipers, O.P., 2008. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 455–476. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7171-2>
53. 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>
54. Mantovani, H.C., Russell, J.B., 2001. Nisin Resistance of *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 808–813. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.808-813.2001>
55. Martin-Visscher, L.A., Gong, X., Duszyk, M., Vederas, J.C., 2009. The Three-dimensional Structure of Carnocyclin A Reveals That Many Circular Bacteriocins Share a Common Structural Motif. *J. Biol. Chem.* 284, 28674–28681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.036459>
56. Martin-Visscher, L.A., Yoganathan, S., Sit, C.S., Lohans, C.T., Vederas, J.C., 2011. The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment: Extending the activity of LAB and non-LAB bacteriocins. *FEMS Microbiol. Lett.* 317, 152–159. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02223.x>
57. Masuda, Y., Zendo, T., Sonomoto, K., 2012. New type non-lantibiotic bacteriocins: circular and leaderless bacteriocins. *Benef Microbes* 3, 3–12. <https://doi.org/10.3920/BM2011.0047>
58. Mathur, H., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P., 2015. The sactibiotic subclass of bacteriocins: an update. *Current protein & peptide science*, 16(6), 549–558. <https://doi.org/10.2174/1389203716666150515124831>
59. Melby, J.O., Nard, N.J., Mitchell, D.A., 2011. Thiazole/oxazole-modified microcins: complex natural products from ribosomal templates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.02.027>
60. Mills, S., Serrano, Lm., Griffin, C., O'Connor, P.M., Schaad, G., Bruining, C., Hill, C., Ross, Rp., 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>
61. Müller, J.P., Ozegowski, J., Vettermann, S., Swaving, J., Van Wely, K.H., Driessen, A.J., 2000. Interaction of *Bacillus subtilis* CsaA with SecA and precursor proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 367–373.
62. Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., Ivanov, M.V., 2001.

- Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 433–446. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-433>
63. Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H., 2003. Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2975–2984. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003>
64. Nørholm, M. H., 2010. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. *BMC Biotechnol* 10, 21. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-21>
65. O’Sullivan, L., Ryan, M.P., Ross, R.P., Hill, C., 2003. Generation of Food-Grade Lactococcal Starters Which Produce the Lantibiotics Lacticin 3147 and Lacticin 481. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3681–3685. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3681-3685.2003>
66. Perez Morales, T.G., Ho, T.D., Liu, W.-T., Dorrestein, P.C., Ellermeier, C.D., 2013. Production of the Cannibalism Toxin SDP Is a Multistep Process That Requires SdpA and SdpB. *J. Bacteriol.* 195, 3244–3251. <https://doi.org/10.1128/JB.00407-13>
67. Prudêncio, C.V., dos Santos, M.T., Vanetti, M.C.D., 2015. Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. *J. Food Sci. Technol.* 52, 5408–5417. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1666-2>
68. Rebuffat S., 2011. Bacteriocins from Gram-Negative Bacteria: A Classification?. In: Drider D., Rebuffat S. (eds) *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_4)
69. Rendueles, O., Ghigo, J.-M., 2012. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 972–989. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x>
70. Rückert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W., 2004. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.020>
71. Salgado, P.R., 2015. Edible films and coatings containing bioactives. *Curr. Opin. Food Sci.* 7.
72. Sánchez-Hidalgo, M., Montalbán-López, M., Cebrián, R., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., 2011. AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2845–2857. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0724-4>



73. Schägger, H., 2006. Tricine–SDS–PAGE. *Nat Protoc* 1, 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
74. Seale, R.B., Dhakal, R., Chauhan, K., Craven, H.M., Deeth, H.C., Pillidge, C.J., Powell, I.B., Turner, M.S., 2012. Genotyping of Present-Day and Historical *Geobacillus* Species Isolates from Milk Powders by High-Resolution Melt Analysis of Multiple Variable-Number Tandem-Repeat Loci. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7090–7097. <https://doi.org/10.1128/AEM.01817-12>
75. Sheng, L., Kovács, K., Winzer, K., Zhang, Y., Minton, N.P., 2017. Development and implementation of rapid metabolic engineering tools for chemical and fuel production in *Geobacillus thermoglucosidasius* NCIMB 11955. *Biotechnol. Biofuels* 10, 5. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0692-x>
76. 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>
77. 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>
78. Sok, M., 1999. Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. *Cancer Lett.* 6.
79. Soltani, S., Biron, E., Ben Said, L., Subirade, M., Fliss, I., 2022. Bacteriocin-Based Synergetic Consortia: a Promising Strategy to Enhance Antimicrobial Activity and Broaden the Spectrum of Inhibition. *Microbiol. Spectr.* e00406-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00406-21>
80. Stein, T., 2005. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions: Bacillus subtilis antibiotics. *Mol. Microbiol.* 56, 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
81. Stepper, J., Shastri, S., Loo, T.S., Preston, J.C., Novak, P., Man, P., Moore, C.H., Havlíček, V., Patchett, M.L., Norris, G.E., 2011. Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Lett.* 585, 645–650. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.023>
82. Suda, S., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P., 2012. Lactacin 3147--biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications. *Current protein & peptide science*, 13(3), 193–204. <https://doi.org/10.2174/138920312800785021>
83. Talarico, T.L., Dobrogosz, W.J., 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 674–679. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.5.674>

84. 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>
85. Ulinauskaitė, S., 2020. Naujo bakteriocino, produkuojamo termofilinės bakterijos, identifikavimas, klonavimas ir heterologinė raiška. Magistro darbas. Vilniaus universitetas, Vilnius.
86. Vaičiškaitė, 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>
87. Vijay Simha, B., Sood, S.K., Kumariya, R., Garsa, A.K., 2012. Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiol. Res.* 167, 544–549. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.01.001>
88. Vilpišauskaitė, A., 2021. Naujo bakteriocino, produkuojamo termofilinės bakterijos, klonavimas ir heterologinė raiška. Bakalauro darbas. Vilniaus universitetas, Vilnius.
89. Wessel, D., & Flügge, U. I., 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138(1), 141–143. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90782-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90782-6)
90. Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., Sahl, H.-G., 2001. Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *J. Biol. Chem.* 276, 1772–1779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006770200>
91. Wu, Y., Pang, X., Wu, Y., Liu, X., Zhang, X., 2022. Enterocins: Classification, Synthesis, Antibacterial Mechanisms and Food Applications. *Molecules* 27, 2258. <https://doi.org/10.3390/molecules27072258>
92. Xu, Y., Guo, J., Wang, L., Jiang, R., Jin, X., Liu, J., Fan, S., Quan, C.-S., Ha, N.-C., 2016. The Crystal Structure of the YknZ Extracellular Domain of ABC Transporter YknWXYZ from *Bacillus amyloliquefaciens*. *PLOS ONE* 11, e0155846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155846>
93. Yu, H., Li, N., Zeng, X., Liu, L., Wang, Y., Wang, G., Cai, S., Huang, S., Ding, X., Song, Q., Qiao, S., 2019. A Comprehensive Antimicrobial Activity Evaluation of the Recombinant Microcin J25 Against the Foodborne Pathogens *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 by Using a Matrix of Conditions. *Front. Microbiol.* 10, 1954. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01954>
94. 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>

95. Zeigler, D.R., 2014. The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology* 160, 1–11. <https://doi.org/10.1099/mic.0.071696-0>
96. Zhao, Y., Caspers, M.P.M., Metselaar, K.I., de Boer, P., Roeselers, G., Moezelaar, R., Nierop Groot, M., Montijn, R.C., Abee, T., Kort, R., 2013. Abiotic and Microbiotic Factors Controlling Biofilm Formation by Thermophilic Sporeformers. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5652–5660. <https://doi.org/10.1128/AEM.00949-13>