

VILNIAUS UNIVERSITETAS

RAMINTA PRANCKUTĖ

PIENARŪGŠČIŲ IR TERMOFILINIŲ BAKTERIJŲ ANTIBAKTERINIO  
AKTYVUMO IR SUDERINAMUMO SU PREBIOTINIAIS  
OLIGOSACHARIDAIŠ NAUJŲ SINBIOTIKŲ KŪRIMUI ĮVERTINIMAS

Daktaro disertacija  
Biomedicinos mokslai, biologija (01 B)

Vilnius, 2017 metai

Disertacija rengta 2012 – 2016 metais Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto (dabartinio Gyvybės mokslų centro, Biomokslų instituto) Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje

**Moksliniai vadovai:**

Prof. dr. Donaldas Jonas Čitavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B); Laikotarpis: 2012-10-01–2016-01-31;

Prof. dr. Nomedą Kuisienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B); Laikotarpis: 2016-02-01–2016-09-30.

# TURINYS

|  |    |
|--|----|
| SANTRUMPŲ SAŖAŠAS.....   | 6  |
| ĮVADAS .....   | 8  |
| Mokslinis naujumas ir praktinė darbo reikšmė .....   | 11 |
| Ginamieji teiginiai .....  | 13 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA.....   | 14 |
| 1.1 Funkcionalaus maisto koncepcija: probiotikai, prebiotikai, sinbiotikai ir postbiotikai.....                          | 14 |
| 1.1.1 Probiotikai .....  | 14 |
| 1.1.2 Prebiotikai.....   | 18 |
| 1.1.2.1 Inulinas.....  | 20 |
| 1.1.2.2 Palatinozė .....   | 22 |
| 1.1.2.3 $\alpha$ -ciklodekstrinas .....  | 23 |
| 1.1.3 Sinbiotikai.....   | 25 |
| 1.1.4 Postbiotikai .....   | 26 |
| 1.1.5 Bakteriocinai.....   | 27 |
| 1.1.5.1 Gramteigiamų bakterijų bakteriocinų klasifikacija.....   | 27 |
| 1.1.5.2 I klasės bakteriocinų (lantibiotikų) genetinė organizacija, struktūra ir biosintezė .....                        | 30 |
| 1.1.5.3 II klasės bakteriocinų genetinė organizacija, struktūra ir biosintezė .....                                      | 34 |
| 1.1.5.4 Bakteriocinų veikimo mechanizmai .....   | 36 |
| 1.1.5.5 Galimi atsparumo bakteriocinams išsivystymo mechanizmai ..   | 42 |
| 1.1.5.6 Gramteigiamų termofilinių bakterijų bakteriocinai .....  | 44 |
| 1.1.5.7 <i>Geobacillus</i> sp. bakteriocinų klasifikacija, genetinė organizacija, struktūra ir veikimo mechanizmai ..... | 46 |
| 1.1.5.8 Endosporas formuojančių bakterijų bakteriocinų sekrecijos valdymas .....   | 50 |
| 1.1.5.9 Gramteigiamų bakterijų bakteriocinų pritaikymas .....  | 52 |
| 2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....   | 60 |
| 2.1 Darbe naudoti mikroorganizmai .....  | 60 |
| 2.2 Naudotos bakterijų kultivavimo terpės .....  | 61 |
| 2.3 Kultivavimo sąlygos.....   | 62 |
| 2.4 Darbe naudoti oligosacharidai (OS).....  | 63 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.5    | Darbe naudoti pradmenys .....  | 64 |
| 2.6    | Bakterijų genominės DNR išskyrimas .....   | 65 |
| 2.7    | Polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) eksperimentai .....  | 65 |
| 2.8    | DNR elektroforezė agarozės gelyje .....  | 66 |
| 2.9    | Pienarūgščių bakterijų išskyrimas iš jogurtų .....   | 66 |
| 2.10   | Bakterinių kamienų dalinis identifikavimas .....   | 66 |
| 2.11   | Bakterijų kultivavimas skystoje terpėje .....  | 67 |
| 2.12   | Terpių su jautriu kamieniu paruošimas .....  | 67 |
| 2.12.1 | Terpės su jautriais pienarūgščių bakterijų kamienais paruošimas  | 67 |
| 2.12.2 | Terpės su termofiliniu 9A11 kamieniu paruošimas .....  | 67 |
| 2.13   | Antibakterinio aktyvumo nustatymo metodai .....  | 68 |
| 2.13.1 | Užpylimo metodas .....   | 68 |
| 2.13.2 | Šulinėlių metodas .....  | 68 |
| 2.14   | Grubaus antibakterinio preparato (GABP) išskyrimas .....   | 69 |
| 2.15   | GABP fizikocheminių savybių įvertinimas .....  | 69 |
| 2.15.1 | Temperatūros poveikio GABP aktyvumui įvertinimas .....   | 69 |
| 2.15.2 | Fermentų poveikio GABP aktyvumui įvertinimas .....   | 70 |
| 2.15.3 | pH įtakos GABP aktyvumui įvertinimas .....   | 71 |
| 2.15.4 | Detergentų poveikio GABP aktyvumui įvertinimas .....   | 71 |
| 2.16   | Tricino-NDS baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje .....  | 71 |
| 2.17   | Zimogramos paruošimas .....  | 72 |
| 3.     | REZULTATAI IR APTARIMAS .....  | 73 |
| 3.1    | Pienarūgščių bakterijų tyrimai .....   | 73 |
| 3.1.1  | Pienarūgščių bakterijų išskyrimas iš jogurtų .....   | 73 |
| 3.1.2  | Pienarūgščių bakterijų jogurtų izoliatų dalinis identifikavimas ...  | 73 |
| 3.1.3  | Pienarūgščių bakterijų izoliatų antibakterinio aktyvumo<br>įvertinimas .....                                       | 75 |
| 3.1.4  | Pienarūgščių bakterijų kamienų sekretuojamų antibakterinių<br>medžiagų identifikavimas .....                       | 77 |
| 3.1.5  | Pienarūgščių bakterijų gebėjimas įsisavinti oligosacharidus .....  | 79 |
| 3.1.6  | Oligosacharidų įtaka pienarūgščių bakterijų tipinių kamienų ir<br>jogurtų izoliatų antibakteriniam aktyvumui ..... | 83 |
| 3.1.7  | Katabolinės represijos eksperimentai .....   | 87 |
| 3.2    | Termofilinio 118 kamieno tyrimai .....   | 91 |

|  |   |     |
|--|---|-----|
| 3.2.1                                    | Termofilinio antibakteriniu aktyvumu pasižyminčio kamieno atranka   | 91  |
| 3.2.2                                    | Dalinis termofilinio 118 kamieno identifikavimas.....   | 91  |
| 3.2.3                                    | Termofilinio 118 kamieno kultivavimo sąlygų parinkimas .....  | 92  |
| 3.2.4                                    | Oligosacharidų įtaka termofilinio 118 kamieno augimui ir antibakteriniam aktyvumui .....                                    | 94  |
| 3.2.5                                    | Katabolinės represijos eksperimentai .....  | 96  |
| 3.2.6                                    | 118 kamieno sekretuojamos/-ų antibakterinės/-ių medžiagos/-ų išskyrimas.....  | 97  |
| 3.2.7                                    | 118 kamieno sekretuojamos/-ų antibakterinės/ių medžiagos/-ų skaičiaus ir molekulinės masės nustatymas .....                 | 99  |
| 3.2.8                                    | 118 kamieno sekretuojamos antibakterinės medžiagos fizikocheminių savybių įvertinimas.....                                  | 101 |
| 3.2.8.1                                  | Fermentų poveikis GABP antibakteriniam aktyvumui.....   | 101 |
| 3.2.8.2                                  | Temperatūrų poveikis GABP antibakteriniam aktyvumui .....   | 102 |
| 3.2.8.3                                  | pH ir detergentų poveikis GABP antibakteriniam aktyvumui  | 103 |
| 3.3                                      | Antibakterinio aktyvumo spektrų tyrimai .....   | 105 |
| 3.3.1                                    | Oligosacharidų įtakos pienarūgščių bakterijų antibakterinio aktyvumo spektrams tyrimai.....                                 | 105 |
| 3.3.2                                    | Termofilinio 118 kamieno antibakterinio aktyvumo spektro tyrimai  | 110 |
| 3.4                                      | Pienarūgščių ir termofilinių bakterijų kamienų tarpusavio antagonizmo ir toksiško eukariotinėms ląstelėms įvertinimas ..... | 111 |
| APIBENDRINIMAS .....                     |   | 114 |
| IŠVADOS .....                            |   | 118 |
| PUBLIKACIJŲ IR KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS..... |   | 119 |
| Publikacijos .....                       |   | 119 |
| Konferencijos .....                      |   | 120 |
| FINANSINĖ PARAMA .....                   |   | 121 |
| GYVENIMO APRAŠYMAS .....                 |   | 122 |
| PADĖKA .....                             |   | 123 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS .....                |   | 124 |
| Priedas Nr. 1 .....                      |   | 149 |
| Priedas Nr. 2 .....                      |   | 154 |

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- AR – atsako reguliatorius
- ATP - adenzintrifosfatas
- AU – sutartinis antibakterinio aktyvumo vienetas (angl. *Arbitrary Unit*)
- BLIS – į bakteriocinus panašios inhibicinės medžiagos (angl. *Bacteriocin-like Inhibitory Substances*)
- CD – ciklodekstrinas
- CFU – koloniją formuojantis vienetas (angl. *Colony Forming Unit*)
- Da – nesisteminis baltymų molekulinės masės vienetas, lygus  $1.66 \cdot 10^{-27}$  kg
- Dha – 2,3-didehidroalaninas
- Dhb – 2,3-didehidrobutirinas
- EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis
- FAO – Jungtinių tautų maisto ir žemės ūkio organizacija (angl. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)
- FDA – Maisto ir vaistų asociacija (angl. *Food and Drug Association*)
- FOS - fruktooligosacharidai
- GABP – grubus antibakterinis preparatas
- GlcNAc – N-acetilgliukozaminas
- GRAS – visuotinai pripažintas saugiu (angl. *Generally Recognized as Safe*)
- IgA – imunoglobulinas A
- YE – mielių ekstraktas (angl. *Yeast Extract*)
- YPD – mielių ekstrakto-peptono-dekstrozės mitybinė terpė (angl. *Yeast extract-Peptone-Dextrose*)
- LAB – pienarūgštės bakterijos (angl. *Lactic Acid Bacteria*)
- LPS – lipopolisacharidai
- LTA – lipoteichoinės rūgštys (angl. *Lipoteichoic Acids*)
- MB – mitybinio buljono terpė
- minYE – mineralinė terpė su mielių ekstraktu (YE)
- mM9 – modifikuota M9 minimali terpė

MRSA – meticilinui atsparus *Staphylococcus aureus* (angl. *Methicillin Resistant S. aureus*)

NCBI – Nacionalinis biotechnologinės informacijos centras (angl. *National Center for Biotechnology Information*)

NDS – natrio dodecilsulfatas

TA – teichoinės rūgštys (angl. *Teichoic Acids*)

T-NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė su tricinu

TSA – triptono sojos mitybinė terpė (angl. *Tryptone Soya Broth*)

OS – oligosacharidai

OT – optinis tankis

PAG – poliakrilamidinis gelis

PEG – polietilenglikolis

PG – peptidoglikanas

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PL – polimerizacijos laipsnis

PTS – fosfotransferazinė sistema

QS – kolektyvinio atsako sistema (angl. *Quorum Sensing*)

TAE – buferinis tirpalas, sudarytas iš TRIS, acto rūgšties ir EDTA

Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

Tween-80 – polioksietileno sorbitano monooleatas

UV – ultravioletiniai spinduliai

WHO – pasaulinė sveikatos organizacija (angl. *World Health Organization*)

## ĮVADAS

Pastaraisiais dešimtmečiais ženkliai išaugo vartotojų susidomėjimas maisto produktų kokybe ir jų poveikiu sveikatai (Gautam ir Sharma, 2009; Abriouel ir kt., 2011; Mills ir kt., 2011; Balciunas ir kt., 2013; Yang ir kt., 2014; Dixit ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016). Dėl to sparčiai plečiasi funkcionalaus maisto pramonė (Al-Sheraji ir kt., 2013; Dixit ir kt., 2016). Funkcionalaus maisto produktai suteikia naudos vartotojo sveikatai dėl jų sudėtyje esančių natūralių probiotinių, prebiotinių, sinbiotinių ar postbiotinių komponentų (Siró ir kt., 2008; Bosscher ir kt., 2009; Wang, 2009; Al-Sheraji ir kt., 2013; Walsh ir kt., 2014; Pandey ir kt., 2015; Tomar ir kt., 2015; Ambalam ir kt., 2016; Dixit ir kt., 2016). Tačiau tokių maisto produktų prieinamumą vartotojui riboja palyginti aukštos jų kainos (Alvarez-Sieiro ir kt., 2016).

Daugiausiai probiotinėmis savybėmis pasižyminčių bakterijų yra pienarūgščių bakterijų (LAB) tarpe (Truter, 2012; Saad ir kt., 2013; Anandharaj ir kt., 2014; Dixit ir kt., 2016; Dahiya ir kt., 2017). Probiotikai taikomi žarnyno mikrofloros moduliavimui dėl jų antibakterinio aktyvumo, nes LAB bakterijos sekretuoja daug antibakteriniu poveikiu pasižyminčių medžiagų, tarp jų ir bakteriocinus (Dobson ir kt., 2011; Ghosh, 2012; O'Shea ir kt., 2012; Saad ir kt., 2013; Walsh ir kt., 2014; Tomar ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017). Todėl probiotinės bakterijos ir/arba jų sekretuojamos antibakterinės medžiagos yra dažniausiai naudojamos kaip alternatyva antibiotikams ir yra plačiai taikomos maisto pramonėje, medicinoje, žemės ūkyje bei veterinarijoje (Etleva, 2010; Mills ir kt., 2011; Manigandan ir kt., 2012; O'Shea ir kt., 2012; Saad ir kt., 2013; Pandey ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Ambalam ir kt., 2016; Dixit ir kt., 2016; Worapryote ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017).

Dėl ypatingai išplitusio patogeninių ir maistą gadinančių bakterijų atsparumo įprastiems antibiotikams, intensyviai ieškoma naujų antibakteriniu poveikiu pasižyminčių medžiagų. Puikia alternatyva gali būti bakteriocinai (Balciunas ir kt., 2013; Yang ir kt., 2014; Perez ir kt., 2014; Arques ir kt., 2015; Cavera ir kt., 2015; Sumi ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt.,



2016; Ahmad ir kt., 2017; Kaškonienė ir kt., 2017; Maina ir kt., 2017). Bakteriocinai dažniausiai yra katijoninės, hidrofobinės ar amfifilinės molekulės, kurios žudo mikroorganizmus sąveikaudamos su neigiamo krūvio ląstelės voko struktūromis ir sudarydamos poras ir/arba inhibuodamos ląstelės sienelės sintezę (Snyder ir Worobo, 2014, Bastos ir kt., 2015; Cavera ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017). Šiems mechanizms sunkiau išvystyti atsparumą, lyginant su pagrindiniais įprastų antibiotikų taikiniai – fermentais (Mantovani ir kt., 2011; Perez ir kt., 2014; Sumi ir kt., 2015; Maina ir kt., 2017).

Didžiausias bakteriocinų pritaikymo potencialas yra maisto pramonėje, nes jie pasižymi specifiniu antibakteriniu spektru, yra netoksiški ir lengvai degraduojami virškinimo proteazių (Yang ir kt., 2014; Perez ir kt., 2014, Arques ir kt., 2015; Cavera ir kt., 2015; O'Connor ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Worapryote ir kt., 2016). Be to, dauguma LAB ir/ar jų sekretuojamų bakteriocinų yra pripažįstami saugiais maisto priedais (GRAS) (Mills ir kt., 2011; Yang ir kt., 2014; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; López-Cuellar ir kt., 2016). Tačiau didžiausias bakteriocinų pranašumas yra jų stabilumas aukštose temperatūrose ir plačiose pH ribose bei aktyvumas nano- ar net piko-molinėmis koncentracijomis, kas leidžia juos derinti su kitais maisto apdorojimo veiksniais ar taikyti vietoje jų (Mills ir kt., 2011; Lohans ir Vederas, 2012; Perez ir kt., 2014; Arques ir kt., 2015; O'Connor ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Worapryote ir kt., 2016). Tokiu būdu maistas ne tik apsaugomas nuo patogeninių ar maistą gadinančių bakterijų, bet ir išlaikoma jo maistinė vertė ir organoleptinės savybės, sumažinant cheminių konservantų bei fizinių veiksnių naudojimą, kas šiandienos vartotojui yra ypatingai aktualu (Arques ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Worapryote ir kt., 2016; Maina ir kt., 2017).

Intensyviausiai iš gramteigiamų bakterijų produkuojamų bakteriocinų tiriami LAB bakteriocinai dėl plataus šių bakterijų panaudojimo funkcionaliame maiste, kaip probiotinių komponentų ar fermentuojančių kultūrų (Parada ir kt., 2007; Mills ir kt., 2011; Gemechu, 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; López-Cuellar ir kt., 2016; Maina ir kt., 2017). Tačiau pagrindinis LAB bakteriocinų trūkumas yra jų neaktyvumas prieš gramneigiamas bakterijas,

skatinantis naujų, stabilesnių ir platesniu veikimo spektru pasižyminčių bakteriocinų producentų paiešką (Gillor ir kt., 2008; Mills ir kt., 2011; O'Connor ir kt., 2015; Ahmad ir kt., 2017; Kaškonienė ir kt., 2017; Maina ir kt., 2017).

Termofilinės *Geobacillus* sp. bakterijos yra ypatingai perspektyvios šiuo aspektu, nes jų sekretuojami bakteriocinai dažnai yra aktyvūs ne tik prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas, bet ir prieš sporas (Cavera ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016). Be to, dėl termofilinės bakterijų prigimties, jų sekretuojami bakteriocinai dažniausiai pasižymi dar geresniu stabilumu aukštesnėse temperatūrose ir platesnėse pH ribose, nei LAB bakteriocinai (Özdemir ir Biyik, 2012; Pranckutė ir kt., 2015). Šios savybės ypatingai aktualios maisto pramonėje, siekiant sumažinti maisto apsaugai naudojamų fizinių ir cheminių veiksnių vartojimą bei taip atitikti šių dienų vartotojų poreikius ir sumažinti maisto apsaugos kaštus (Mills ir kt., 2011; Arques ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; Maina ir kt., 2017). Be to, dėl bakteriocinų ribosominės sintezės ir organizuotos genetinės struktūros, yra patogų sukurti efektyvius bakteriocinų producentus (Mills ir kt., 2011; Lohans ir Vederas, 2012; Perez ir kt., 2014; Cavera ir kt., 2015; O'Connor ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Maina ir kt., 2017), kas leistų dar labiau sumažinti maisto gamybos kainas.

Prebiotiniai oligosacharidai (OS) selektyviai stimuliuoja probiotinių bakterijų augimą ir/arba funkcijas, todėl yra plačiai taikomi, siekiant pagerinti probiotikų išgyvenamumą, pereinant virškinamąjį traktą, bei skatinti jų augimą žarnyne (Roberfroid ir kt., 2010; Manigandan ir kt., 2012; Al-Sheraji ir kt., 2013; Saad ir kt., 2013; Slavin, 2013; Walsh ir kt., 2014; Valcheva ir Dielaman, 2016; Dahiya ir kt., 2017). Prebiotikai taip pat gali stimuliuoti probiotikų antibakterinį aktyvumą, įskaitant bakteriocinų produkciją (Chen ir kt., 2007; Vamanu ir Vamanu, 2010; Patel ir Goyal, 2012).

## **Darbo tikslas**

Įvertinti termofilinio ir pienarūgščių bakterijų kamienų probiotinį potencialą, suderinamumą su prebiotiniais oligosacharidais ir jų įtaką kamienų

antibakteriniam aktyvumui, bei naujų sinbiotinių kombinacijų veiksmingumą ir jų pritaikymo maisto pramonėje galimybes.

### **Uždaviniai**

1. Įvertinti išskirtų ir tipinių pienarūgščių bei termofilinių bakterijų augimą ir antibakterinį aktyvumą.
2. Įvertinti pienarūgščių ir termofilinių bakterijų gebėjimą įsisavinti komercinius prebiotinius oligosacharidus (palatinozę, inuliną ir  $\alpha$ -ciklodekstriną) bei jų įtaką antibakteriniam aktyvumui.
3. Įvertinti sporuliacijos įtaką termofilinio 118 kamieno antibakteriniam aktyvumui.
4. Nustatyti 118 kamieno sekretuojamos antibakterinės medžiagos prigimtį ir fizikochemines savybes.
5. Įvertinti prebiotinių oligosacharidų įtaką bakterijų antibakterinio aktyvumo spektrui prieš patogenines bakterijas.
6. Įvertinti tirtų bakterijų kamienų tarpusavio antagonizmą ir jų poveikį eukariotinėms ląstelėms.

### **Mokslinis naujumas ir praktinė darbo reikšmė**

Nors probiotikai ir prebiotikai yra intensyviai tiriama ir plačiai taikomi tiek maisto pramonės, tiek kitose srityse (Gosh, 2012; Makinen ir kt., 2012; Al-Sheraji ir kt., 2013; Saad ir kt., 2013; Slavin, 2013; Dixit ir kt., 2016), tačiau duomenų apie šių komponentų kaip galimų sinbiotikų suderinamumą yra mažai (Saminathan ir kt., 2011; Likotrafiti ir kt., 2013; Farinha ir kt., 2015; Liu ir kt., 2015; Pandey ir kt., 2015). Literatūroje yra labai mažai tyrimų, orientuotų į prebiotikų įtaką bakteriocinų produkcijai (Chen ir kt., 2007; Vamanu ir Vamanu, 2010; Patel ir Goyal, 2012), o apie galimybę prebiotikais moduluoti probiotikų antibakterinį aktyvumą prieš patogenines bakterijas duomenų, kiek mums žinoma, išvis nėra.

Šiame darbe tirti komerciniai OS (inulinas, palatinozė ir  $\alpha$ -ciklodekstrinas) yra taikomi kaip prebiotikai (Mussatto ir Mancilha, 2007;

Roberfroid ir kt., 2010; Gosh, 2012; Al-Sheraji ir kt., 2013; Saad ir kt., 2013; Li ir kt., 2014), tačiau apie palatinozės ir  $\alpha$ -ciklodekstrino įtaką probiotinių bakterijų augimui žinoma labai nedaug (Mussatto ir Mancilha, 2007; van Zanten ir kt., 2012), o jų poveikio antibakteriniam aktyvumui bei antibakterinio poveikio spektrui tyrimų visai nėra. Nors inulinas yra vienas geriausiai ištirtų prebiotikų (Roberfroid ir kt., 2010; Souza ir kt., 2011; Patel ir Goyal, 2012; Saad ir kt., 2013; Valcheva ir Dielaman, 2016), tačiau jo tyrimai daugiausiai orientuoti į *Bifidobacterium* sp. bakterijų stimuliavimą (Fahey, 2010; Roberfroid ir kt., 2010; Slavin, 2013; Liu ir kt., 2015; Vandeputte ir kt., 2017), o apie jo poveikį *Lactobacillus* ar *Lactococcus* genčių bakterijoms bei jų antibakteriniam aktyvumui duomenų beveik nėra (Chen ir kt., 2007; Goderska ir kt., 2008; Vamanu ir Vamanu, 2010; Kunova ir kt., 2011; Al-Sheraji ir kt., 2013).

Kai kurios *Geobacillus* genties bakterijos, ypatingai *Geobacillus stearothermophilus*, yra svarbi maisto pramonės problema, nes sukelia konservuotų bei pieno produktų gedimą (Rigaux ir kt., 2014; Hussein ir kt., 2015; André ir kt., 2017). O šiame darbe tirti LAB ir termofilinis 118 bakterijų kamienai pasižymi stipriu antibakteriniu poveikiu prieš *G. stearothermophilus*, todėl šie kamienai ir/arba jų sekretuojamos antibakterinės medžiagos būtų puiki priemonė kovai prieš šias maistą gadinančias bakterijas.

Šiame darbe tirtas termofilinis 118 bakterijų kamienas artimiausias *Aeribacillus pallidus* rūšiai (anksčiau priskirtos *Geobacillus* genčiai (Miñana-Galbis ir kt., 2010)). Pastaraisiais metais aprašytas šios rūšies bakterijų antibakterinis aktyvumas (Muhammad ir Ahmed, 2015), tačiau, remiantis aprašyto kamieno ir jo antibakterinio baltymo tyrimų duomenų ir šio darbo rezultatų palyginimu, galima teigti, kad aprašytas kamienas nesutampa su tirtu šiame darbe. Todėl šiame darbe pirmą kartą aprašytas *Aeribacillus* genties bakterijų sekretuojamas bakteriocinas.

Šiame darbe pirmą kartą aprašytas termofilinių bakterijų gebėjimas įsisavinti prebiotinius OS bei pastarųjų įtaka termofilinių bakterijų antibakteriniam aktyvumui. Taip pat, parodyta, kad termofilinis 118 bakterijų

kamienas yra neaktyvus prieš LAB, bet jautrus tirtų LAB antibakteriniam poveikiui. Be to, *Aeribacillus/Geobacillus pallidus* bakterijos nėra patogeninės, toksiškos ar pavojingos sveikatai (Lücking ir kt., 2013; Gopal ir kt., 2015). Šie duomenys rodo tirtu termofilinių bakterijų kamieno probiotinį potencialą, nes jis galėtų būti naudojamas kartu su LAB probiotiniuose ir/arba fermentuojamuose maisto produktuose. Literatūroje, *Geobacillus* sp. tarpe, probiotikų statusas pasiūlytas tik *Geobacillus thermoleovorans* S1 kamienui (Mahdhi ir kt., 2011).

Tirtu termofilinio 118 kamieno bakteriocino aktyvumas prieš patogenines ir maistą gadinančias bakterijas, netoksiškumas eukariotinėms ląstelėms bei jo stabilumas aukštose temperatūrose ir plačiose pH reikšmėse, rodo didelį jo pritaikymo maisto pramonėje potencialą, leidžiantį sumažinti maisto apdorojimo kaštus, sumažinant fizinių ir cheminių veiksnių panaudojimą, bet nepakenkiant maisto produktų kokybei ir saugumui.

### **Ginamieji teiginiai**

1. Pienarūgštės bakterijos ir termofilinis bakterijų kamienas geba įsisavinti prebiotinius oligosacharidus ir jie teigiamai veikia kamienų antibakterinį aktyvumą.
2. Termofilinis 118 ir pienarūgščių bakterijų kamienai yra aktyvūs prieš maistą gadinančias ir/arba patogenines bakterijas.
3. Prebiotiniai oligosacharidai gali moduluoti antibakterinio aktyvumo prieš patogenines bakterijas spektrą ir/arba poveikio stiprumą.
4. Termofilinio 118 kamieno sekretuojama antibakterinė medžiaga yra bakteriocinas, pasižymintis taikymui maisto pramonėje naudingomis savybėmis.
5. Tirti antibakteriniu aktyvumu pasižymintys kamienai kartu su prebiotiniais oligosacharidais gali būti panaudoti veiksmingų sinbiotinių maisto priedų kūrimui.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Funkcionalaus maisto koncepcija: probiotikai, prebiotikai, sinbiotikai ir postbiotikai

Šiandienos vartotojai vis daugiau dėmesio skiria savo mitybai, nes išaugo bendras ryšio tarp mitybos ir sveikatos suvokimas (Siró ir kt., 2008; Pandey ir kt., 2015; Dixit ir kt., 2016). Todėl nenuostabu, kad vartotojai vis dažniau renkasi maisto produktus, atitinkančius funkcionalaus maisto apibūdinimą – tai maisto produktai, kurie suteikia papildomą naudą sveikatai dėl jų sudėtyje esančių prebiotikų, probiotikų, postbiotikų arba sinbiotikų (Siró ir kt., 2008; Bosscher ir kt., 2009; Wang, 2009; Sousa ir kt., 2011; Al-Sheraji ir kt., 2013; Saad ir kt., 2013; Walsh ir kt., 2014; Pandey ir kt., 2015; Tomar ir kt., 2015; Dixit ir kt., 2016).

### 1.1.1 Probiotikai

Jungtinių tautų (FAO) ir Pasaulio sveikatos organizacijos (WHO) pripažintas apibrėžimas teigia, kad probiotikai, tai – „gyvi mikroorganizmai, kurie, vartojant atitinkamais kiekiais, suteikia naudą šeimininko sveikatai“ (Iannitti ir Palmieri, 2010; Ferreira ir kt., 2011; Saad ir kt., 2013; Walsh ir kt., 2014; Liu ir kt., 2015; Pandey ir kt., 2015; Dahiya ir kt., 2017). Kad tam tikroms bakterijoms būtų suteiktas probiotiko statusas, jos turi atitikti kelis reikalavimus: turi gebėti teigiamai veikti šeimininko sveikatą; būti nepatogeniškos ir netoksiškos; išlikti gyvybingomis pereinant virškinamąjį traktą bei maisto produktų apdorojimo, saugojimo ir vartojimo periodais (Iannitti ir Palmieri, 2010; Ferreira ir kt., 2011; Makinen ir kt., 2012; Maningandan ir kt., 2012; Truter, 2012; Saad ir kt., 2013; Szkaradkiewicz ir Karpiński, 2013; Pandey ir kt., 2015; Reale ir kt., 2015).

1.1 lentelėje pateiktos dažniausiai naudojamos probiotikų rūšys bei dalis jų taikymo patentų. Daugiausiai probiotinių bakterijų yra LAB tarpe, ypačingai *Lactobacillus* ir *Bifidobacterium* gentyse (Iannitti ir Palmieri, 2010; Truter,

2012; Saad ir kt., 2013; Szkaradkiewicz ir Karpiński, 2013; Dixit ir kt., 2016; Dahiya ir kt., 2017). Tačiau yra naudojamos ir kitų genčių probiotinės bakterijos, tarp jų – ir *Bacillus* spp. (Abriouel ir kt., 2011; Mantovani ir kt., 2011; Saad ir kt., 2013; Anandharaj ir kt., 2014; Sumi ir kt., 2015; Dixit ir kt., 2016).

**1.1 lentelė.** Dažniausiai naudojamos probiotikų rūšys ir dalis jų pritaikymo patentų (Dixit ir kt., 2016).

| <b>Gentis</b>            | <b>Probiotinės rūšys</b>   | <b>Pritaikymo patentai</b>   |
|--------------------------|--|--|
| <i>Lactobacillus</i>     | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> ,<br><i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> ,<br><i>L. gasseri</i> , <i>L. paracasei</i> ,<br><i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> ,<br><i>L. rhamnosus</i> | US20160151434A1,<br>US8460917 B2, US6797266<br>B2, EP2477637 A1, EP1824500<br>A1, WO/2015/090349, EP<br>2519108 A1 |
| <i>Bifidobacterium</i>   | <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> ,<br><i>B. breveis</i> , <i>B. catenulatum</i> ,<br><i>B. longum</i>  | EP2318513A1,<br>US20100183559,<br>US20040202749,<br>EP1224867A1,<br>WO/2008/117267A2,<br>EP2990045A1, US8058051    |
| <i>Streptococcus</i>     | <i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> ,<br><i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguinis</i> ,<br><i>S. thermophilus</i>   | WO/1999/053932A1, WO/1995/<br>006736A1, US20140023620,<br>WO1998000035A1   |
| <i>Bacillus</i>          | <i>B. coagulans</i> ,<br><i>B. laterosporus</i> , <i>B. subtilis</i>   | EP0975227A1, US8697055B2,<br>WO1998047374A1,<br>US9144588,<br>US20130302299A1,<br>US5455028A                       |
| <i>Lactococcus</i>       | <i>L. lactis</i>   | EP0573768A2,<br>US20080305089, EP 2467031<br>A1, WO2005034970 A1, EP<br>1243181 A1                                 |
| <i>Enterococcus</i>      | <i>E. faecium</i>  | US 20070098744 A1, EP<br>1510135 A1, WO 2001090311<br>A1   |
| <i>Pediococcus</i>       | <i>P. acidilactici</i>   | US20150246082, WO<br>2011092261 A1, US9011877,<br>EP1656150  |
| <i>Propionibacterium</i> | <i>P. freudenreichii</i> , <i>P. jensenii</i>  | US 7427397 B2, CA 2689862<br>A1, US 9011838 B2   |
| <i>Blautia</i>           | <i>B. producta</i>   | US 20140234260 A1  |
| <i>Saccharomyces</i>     | <i>S. boulardii</i>  | EP 2519108 A1, US 6010695<br>A, US2014020558   |

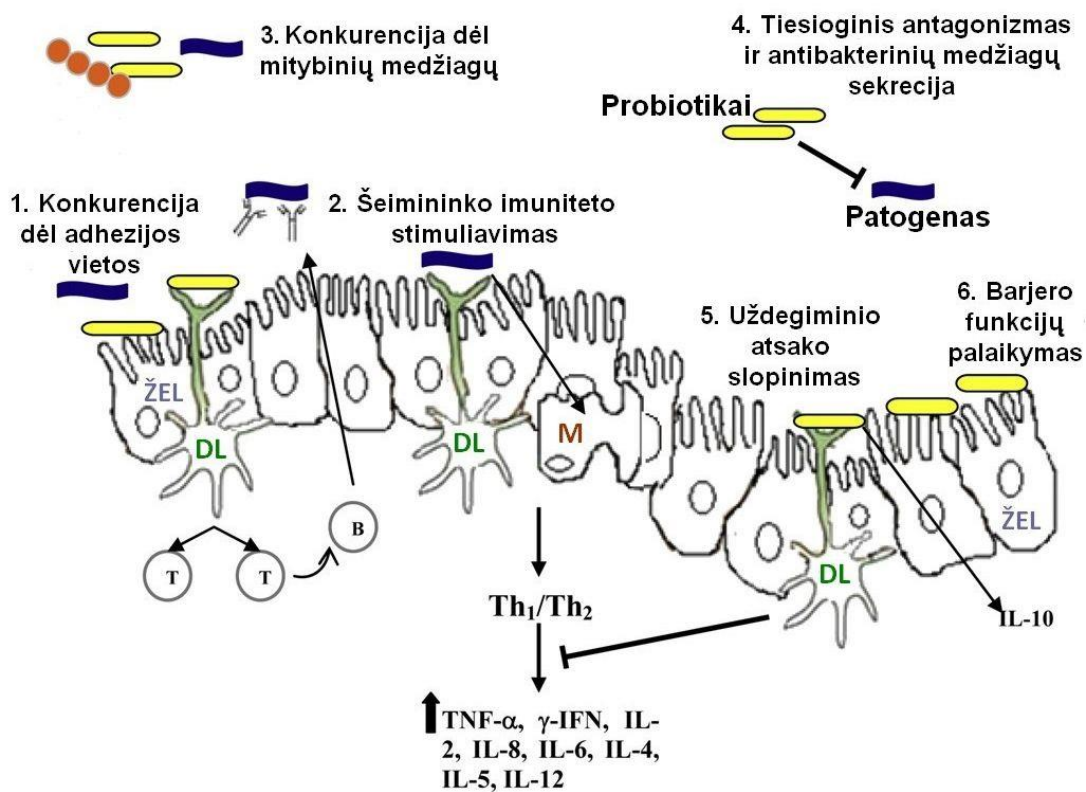
Probiotikų nauda vartotojo sveikatai pasireiškia žarnyno mikrofloros sudėties ir/arba veiklos moduliavimu ir apsauga prieš patogenines bakterijas (Bosscher ir kt., 2009; Truter, 2012; O'Shea ir kt., 2012; Saad ir kt., 2013; Walsh ir kt., 2014; Pandey ir kt., 2015; Tomar ir kt., 2015; Bron ir kt., 2017). Probiotiniai mikroorganizmai šią naudą gali suteikti tiesioginės sąveikos būdu, konkuruodami su patogenais dėl adhezijos vietos bei maistinių išteklių (nišos) ir/arba sekretuodami įvairias antibakterines medžiagas (organines rūgštis, laisvąsias riebalų rūgštis, diacetilus, vandenilio peroksidą, fermentus bei – bakteriocinus) (Dobson ir kt., 2011; Truter, 2012; O'Shea ir kt., 2012; Pandey ir kt., 2015; Ge ir kt., 2016; Loh ir kt., 2017). Taip pat, probiotikai netiesioginiu būdu gali pagerinti žarnyno barjero funkcijas, stimuliuoti šeimininko imuninę sistemą (skatindami IgA, citokinų produkciją, T-ląstelių proliferaciją), bei slopinti patogenų virulentiškumo faktorių raišką (inhibuodami virulentiškumo genų raišką arba sutrikdydami virulentiškumui svarbios kolektyvinio atsako sistemos veiklą patogeninėse bakterijose) (Gillor ir kt., 2008; Ferreira ir kt., 2011; Truter, 2012; Anandharaj ir kt., 2014; Pandey ir kt., 2015; Tomar ir kt., 2015; Gemechu, 2015; Liu ir kt., 2015; Bron ir kt., 2017).

1.1 paveiksle pateikti keli pagrindiniai probiotikų veikimo mechanizmai. Reikėtų paminėti, kad probiotikų aktyvumas prieš patogenines bakterijas ir veikimo mechanizmai yra specifiniai kamienui ir gali varijuoti priklausomai nuo probiotinio kamieno kilmės ir išskyrimo šaltinio (Makinen ir kt., 2012; Tomar ir kt., 2015).

Literatūroje aprašyta daug tyrimų, įrodančių probiotikų naudą vartotojo sveikatai (Ghosh, 2012; Truter, 2012; Saad ir kt., 2013; Tomar ir kt., 2015; Liu ir kt., 2015; Ambalam ir kt., 2016; Dixit ir kt., 2016; Bron ir kt., 2017; Dahiya ir kt., 2017). Probiotikai dažniausiai naudojami žarnyno ligų ar sutrikimų, tokių kaip sisteminės žarnyno infekcijos ir uždegimai, dirgliosios žarnos sindromas, bakterinis, virusinis (rotaviruso) ar antibiotikų vartojimo sukeltas viduriavimas, storosios žarnos vėžys, gydymui ir/arba prevencijai (Iannitti ir Palmieri, 2010; Ferreira ir kt., 2011; Ghosh, 2012; Saad ir kt., 2013; Szkaradkiewicz ir



Karpiński, 2013; Anandharaj ir kt., 2014; Pandey ir kt., 2015; Tomar ir kt., 2015; Ambalam ir kt., 2016; Bharti ir kt., 2016; Dixit ir kt., 2016; Dahiya ir kt., 2017; Bron ir kt., 2017). Taip pat, jie naudingi kovojant su nutukimu, II tipo diabetu, alergijomis, odos ligomis, širdies kraujagyslių ligomis (mažina cholesterolio kiekį kraujyje) ar metaboliniais sutrikimais bei laktozės netoleravimu, gerina mineralų (Ca, Mg) absorbciją bei produkuoja vitaminus (Iannitti ir Palmieri, 2010; Ooi ir Liong., 2010; Roberfroid ir kt., 2010; Ghosh, 2012; Saad ir kt., 2013; Anandharaj ir kt., 2014; Pandey ir kt., 2015; Zhao ir kt., 2015; Walsh ir kt., 2015; Bharti ir kt., 2016; Dixit ir kt., 2016; Dahiya ir kt., 2017).



**1.1 pav.** Pagrindiniai probiotikų veikimo mechanizmai. ŽEL – žarnyno epitelio ląstelė; DL – dendritinė ląstelė; M – žarnyno M ląstelė; IL – interleukinas (Saad ir kt., 2013).

Pastarajame dešimtmetyje ženkliai išsiplėtė ir jų taikymo sritys – gausėja probiotikų taikymo patentų veterinarijos, burnos sveikatos priežiūros, kosmetikos ir asmeninės higienos srityse (Dixit ir kt., 2015). Maisto pramonėje probiotikai nuo seno naudojami kaip fermentuojančios kultūros bei kaip biokonservantai (Makinen ir kt., 2012; Abdulla, 2014; Gemechu, 2015; Bharti ir kt., 2016). Yra parodyta, kad LAB ir jų metabolitai vaidina svarbų vaidmenį,

gerinant maisto produktų mikrobiologinę kokybę bei prailginant galiojimo laiką (Mills ir kt., 2011; Truter, 2012; Cizeikiene ir kt., 2013; Gemechu, 2015; Mozuriene ir kt., 2016; Bartkiene ir kt., 2017). Todėl kuriami ir patentuojami nauji probiotikų vartojimo būdai, pavyzdžiui, probiotikų įmaišymas į šokoladą, kramtomos probiotikų tabletės (Dixit ir kt., 2015), valgomos prebiotinės kilmės plėvelės su probiotikais (Kanmani ir Lim., 2013; Soukoulis ir kt., 2014) bei probiotikų inkapsuliavimas (Heidebach ir kt., 2009; Makinen ir kt., 2012).

### **1.1.2 Prebiotikai**

Prebiotikai dažniausiai yra trumpos grandinės oligosacharidai (OS), kurių polimerizacijos laipsnis (PL) yra tarp 2 ir 10 (pagal IUPAC nomenklatūrą – nuo 3 iki 10), nors dažnai polimerai su didesniu PL taip pat įvardijami kaip OS (Barreteau ir kt., 2006; Roberfroid ir kt., 2010; Saad ir kt., 2013). Dažniausiai vartojami prebiotikai yra fruktooligosacharidai (FOS), galaktooligosacharidai (GOS), izomaltooligosacharidai (IMO), inulinas, laktuliozė, celiulozė, hemiceliuliozė, atsparusis krakmolai bei pektinas (Wang, 2009; Qiang ir kt., 2009; Iannitti ir Palmieri, 2010; Ambalam ir kt., 2016; Dahiya ir kt., 2017).

Prebiotikai dažniausiai yra išskiriami iš augalų. Taip pat jie gali būti sintetiniai cheminiu būdu: iš mono ar disacharidų (transglikozilinimo reakcijos, naudojant bakterinės kilmės glikoziltransferazes) arba iš polisacharidų, juos skaldant fiziniiais veiksniais ar naudojant bakterinės kilmės fermentus (Wang, 2009; Ferreira ir kt., 2011; Al-Sheraji ir kt., 2013; Saad ir kt., 2013).

Prebiotikai apibūdinami kaip „nevirškinami maisto komponentai, kurie teigiamai veikia vartotojo sveikatą, selektyviai stimuliuodami riboto skaičiaus jau esančių žarnyne bakterijų rūšių augimą ir/arba aktyvumą“ (Gibson ir Roberfroid, 1995). Šis apibrėžimas buvo taikomas du dešimtmečius, tačiau pastaraisiais metais pasiūlytas platesnis apibūdinimas, labiau koncentruotas į ekologines ir funkcines mikrofloros charakteristikas. Jame teigiama, kad prebiotikai – tai „nevirškinami junginiai, kurie, juos metabolizuojant žarnyno mikroorganizmams, moduluoja mikrofloros sudėtį ir/arba funkcijas, taip

suteikdami naudą vartotojo sveikatai“ (Bindels ir kt., 2015; Valcheva ir Dielaman, 2016).

Pagrindinė prebiotikų funkcija – žarnyno mikrofloros moduliavimas, inhibuojant patogeninių ir skatinant gerųjų žarnyno bakterijų proliferaciją, o tuo pačiu – ir pastarųjų funkcijas (Macfarlane ir kt., 2008; Qiang ir kt., 2009; Roberfroid ir kt., 2010; Ślizewska ir kt., 2012; Saad ir kt., 2013; Bindels ir kt., 2015; Dixit ir kt., 2015; Pourrabadin ir Zhao, 2015; Tomar ir kt., 2015; Liu ir kt., 2015; Valcheva ir Dielaman, 2016; Dahiya ir kt., 2017; Shokryazdan ir kt., 2017; Vandeputte ir kt., 2017). Todėl prebiotikų teikiama labai įvairi ir plačiai aprašyta nauda sveikatai didžiaja dalimi yra netiesioginė, o sąlygota selektyvaus naudingųjų žarnyno bakterijų augimo skatinimo ir to pasekoje padidėjusios trumpos grandinės riebalų rūgščių (jų fermentacijos produktų) bei antibakterinių medžiagų produkcijos (Roberfroid ir kt., 2010; Ferreira ir kt., 2011; Ślizewska ir kt., 2012; Saad ir kt., 2013; Pourrabadin ir Zhao, 2015; Tomar ir kt., 2015; Valcheva ir Dielaman, 2016; Vandeputte ir kt., 2017). Tačiau prebiotikai žmogui teikia ir papildomos naudos: suteikia sotumo jausmą, padeda kovoti su nutukimu, gerina žarnyno veiklą ir mineralinių medžiagų absorbciją, stiprina žarnyno barjerą bei inhibuoja patogeninių bakterijų adheziją prie žarnyno epitelio (Qiang ir kt., 2009; Roberfroid ir kt., 2010; Ferreira ir kt., 2011; Maningandan ir kt., 2012; Saad ir kt., 2013; Slavin, 2013; Pourrabadin ir Zhao, 2015; Tomar ir kt., 2015; Liu ir kt., 2015; Pandey ir kt., 2015; Dahiya ir kt., 2017; Shokryazdan ir kt., 2017). Todėl prebiotikai yra viena pagrindinių strategijų žarnyno mikrofloros sudėties ir funkcijų reguliavimui. Yra parodyta jų nauda pieno rauginimo kultūrų augimo moduliavimui; žarnyno sveikatos palaikymui; imuninės sistemos stimuliavimui; cholesterolio pašalinimui; širdies kraujagyslių ligų, nutukimo, II tipo diabeto, metabolinio sindromo, vidurių užkietėjimo, storosios žarnos ir kolorektalinio vėžio gydymui ar prevencijai bei bakteriocinų produkcijos stimuliavimui (Iannitti ir Palmieri, 2010; Patel ir Goyal, 2012; Parnell ir Reimer, 2012; Slavin, 2013; Liu ir kt., 2015; Pandey ir kt., 2015; Tomar ir kt., 2015; Ambalam ir kt., 2016; Dahiya ir kt., 2017; Shokryazdan ir kt., 2017; Vandeputte ir kt., 2017).

Ne visi nevirškinami OS yra priskiriami prebiotikams – jie turi atitikti kelis pagrindinius reikalavimus: turi būti atsparūs virškinamojo trakto rūgštingumui ir hidrolizei; būti fermentuojami žarnyno mikroorganizmų ir selektyviai stimuliuoti sveikatai naudingų mikroorganizmų augimą ir/arba aktyvumą (Wang, 2009; Roberfroid ir kt., 2010; Iannitti ir Palmieri, 2010; Sousa ir kt., 2011; Śliżewska ir kt., 2012; Slavin, 2013; Tomar ir kt., 2015; Shokryazdan ir kt., 2017), o siekiant panaudoti juos kaip funkcionalaus maisto komponentus, prebiotikai taip pat turi būti atsparūs maisto produktų apdorojimo sąlygoms ir veiksniams (Barreteau ir kt., 2006; Wang, 2009; Al-Sheraji ir kt., 2013).

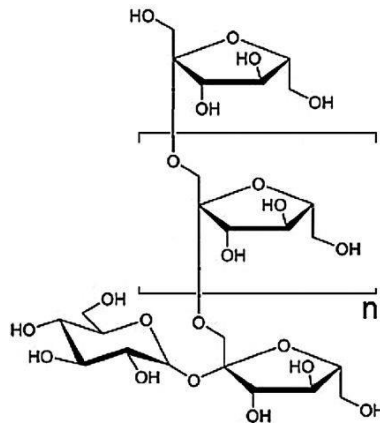
Dauguma OS kilmės prebiotikų pasižymi vidutiniu saldumu (30-60 % gliukozės saldumo), mažu kaloringumu ir žemu glikeminiu indeksu, todėl yra plačiai naudojami ne tik kaip terapiniai maisto papildai, bet ir maisto pramonėje – tiek kaip saldiklių pakaitalai, tiek kaip svarbūs funkcionalaus maisto komponentai (Wang, 2009; Qiang ir kt., 2009; Holub ir kt., 2010; Saad ir kt., 2013). Maisto pramonėje jie taikomi ne tik dėl to, kad yra naudingi sveikatai, bet taip pat pagerina maisto produktų maistinės sudėties, tekstūros ir organoleptines savybes (Wang, 2009; Al-Sheraji ir kt., 2013; Saad ir kt., 2013).

Šiame darbe tirti inulinas, palatinozė (izomaltuliozė) ir  $\alpha$ -ciklodekstrinas taip pat priskiriami funkcionaliems OS ir yra naudojami kaip maisto priedai ir/arba prebiotikai (Fujiwara ir kt., 2007; Mussatto ir Mancilha, 2007; Qiang ir kt., 2009; Roberfroid ir kt., 2010; Ferreira ir kt., 2011; Gosh, 2012; Al-Sheraji ir kt., 2013; Saad ir kt., 2013; Li ir kt., 2014).

### **1.1.2.1 Inulinas**

Inulinas yra vienas geriausiai ištirtų OS ir aprašytų tyrimų gausa patvirtina jo kaip prebiotiko veiksmingumą (Bosscher ir kt., 2006; Wang, 2009; Fahey, 2010; Roberfroid ir kt., 2010; Souza ir kt., 2011; Patel ir Goyal, 2012; Saad ir kt., 2013; Farinha ir kt., 2015; Chung ir kt., 2016). Inulinas – tai linijinis polimeras, sudarytas iš D-fruktozės monomerų, sujungtų  $\beta(2\rightarrow1)$ -glikozidiniiais

ryšiais (1.2 pav.). Pirmasis oligosacharidinės grandinės monomeras gali būti gliukozė arba fruktozė. Inulinas priskiriamas ilgos grandinės (PL iki 60) FOS, bet komerciškai dažniausiai gaminamas kaip įvairaus PL inulinų mišiniai. Jis yra aptinkamas įvairiame augaliniame maiste. Pagrindiniai inulinų šaltiniai yra cikorijos, agavos ir artišokai (Fahey, 2010; Roberfroid ir kt., 2010; Souza ir kt., 2011; Mendlik ir kt., 2012; Saad ir kt., 2013).



**1.2 pav.** Struktūrinė inulino formulė (Leone ir kt., 2014).

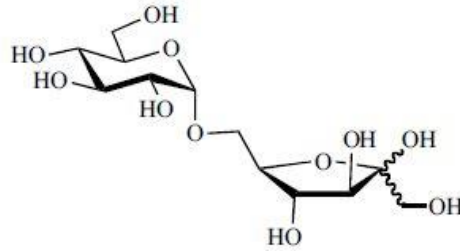
Inulinas yra atsparus metabolizmui šeimininko viršutiniame virškinimo trakte, bet yra fermentuojamas bakterijų storojoje žarnoje, ir tokiu būdu skatina naudingųjų ir slopina patogeninių bakterijų proliferaciją (Bosscher ir kt., 2006; Roberfroid ir kt., 2010; Liu ir kt., 2015; Chung ir kt., 2016; Valcheva ir Dielaman, 2016). Taip pat parodyta, kad inulino poveikis žarnyno mikrofloros sudėčiai yra savitas ir poveikio skirtumai pasireiškia rūšių ir net kamienų lygmenyje (Chung ir kt., 2016).

Literatūroje aprašyta plati inulino teikiama nauda sveikatai. Parodyta, kad jis stimuliuoja imuninę sistemą; mažina patogeninių bakterijų kiekį žarnyne; slopina patogeninių bakterijų sukeltą viduriavimą; pagerina mineralų (Ca, Mg), absorbciją žarnyne (mažina osteoporozės riziką); mažina trigliceridų, riebalų rūgščių ir cholesterolio kiekį kraujyje; mažina nutukimo ir II tipo diabeto išsivystymo riziką; neutralizuoja toksinus bei sumažina storosios žarnos vėžio riziką (Bosscher ir kt., 2006; Fahey, 2010; Roberfroid ir kt., 2010; Ooi ir Liong., 2010; Souza ir kt., 2011; Patel ir Goyal, 2012; Saad ir kt., 2013; Liu ir kt., 2015;

Valcheva ir Dielaman, 2016). Nors inulinas laikomas bifidogeniniu prebiotiku (Bosscher ir kt., 2006; Fahey, 2010; Mendlik ir kt., 2012; Patel ir Goyal, 2012; Liu ir kt., 2015; Vandeputte ir kt., 2017), tačiau literatūroje yra duomenų, rodančių, kad inulinas gali skatinti ir kai kurių *Lactobacillus* spp. bei *Lactococcus* spp. augimą (Goderska ir kt., 2008; Roberfroid ir kt., 2010; Kunova ir kt., 2011; Gänzle ir Follador, 2012; Nazzaro ir kt., 2012; Al-Sheraji ir kt., 2013; Pourrabadin ir Zhao, 2015; Dahiya ir kt., 2017), o taip pat – stimuliuoti bakteriocinų sekreciją (Chen ir kt., 2007; Vamanu ir Vamanu, 2010).

### 1.1.2.2 Palatinozė

Palatinozė (izomaltuliozė) yra sacharozės izomeras ([6-O-( $\alpha$ -D-gliukopiranozil)-D-fruktofuranozė]), sudarytas iš gliukozės ir fruktozės monomerų, sujungtų  $\alpha$ -1,6-glikozidiniu ryšiu (1.3 pav.). Ji natūraliai aptinkama meduje ir cukranendrių sultyse (Jonker ir kt., 2002; Lina ir kt., 2002; Wu ir Birch, 2011; Tan ir kt., 2014). Komerciškai palatinozė gaminama iš sacharozės, fermentų pagalba pertvarkant glikozidinius ryšius iš (1 $\rightarrow$ 2) į (1 $\rightarrow$ 6). Palatinozė saldumu prilygsta maždaug 50 % cukraus saldumo, tačiau dėl stabilesnio  $\alpha$ -1,6-glikozidinio ryšio, yra labai lėtai skaidoma, todėl pasižymi žemu glikeminiu indeksu (Jonker ir kt., 2002; Lina ir kt., 2002; Arai ir kt., 2007; Holub ir kt., 2010; Al-Sheraji ir kt., 2013). Be to, palatinozės neįsisavina žalingosios burnos bakterijos, todėl ji nesukelia karieso (Jonker ir kt., 2002; Lina ir kt., 2002; Holub ir kt., 2010). Dėl minėtų savybių palatinozė plačiai taikoma maisto pramonėje kaip cukraus pakaitalas, ypač maisto produktuose, skirtuose cukriniu diabetu sergantiems žmonėms (Jonker ir kt., 2002; Lina ir kt., 2002; Arai ir kt., 2007; Holub ir kt., 2010). Japonijoje palatinozė turi GRAS statusą ir plačiai naudojama kaip cukraus pakaitalas jau nuo 1985 m. (Jonker ir kt., 2002; Lina ir kt., 2002; Holub ir kt., 2010; Tan ir kt., 2014). EU ji patvirtinta kaip „Novel Food“ (Naujoviškas maistas), o JAV pripažinta GRAS (Holub ir kt., 2010).

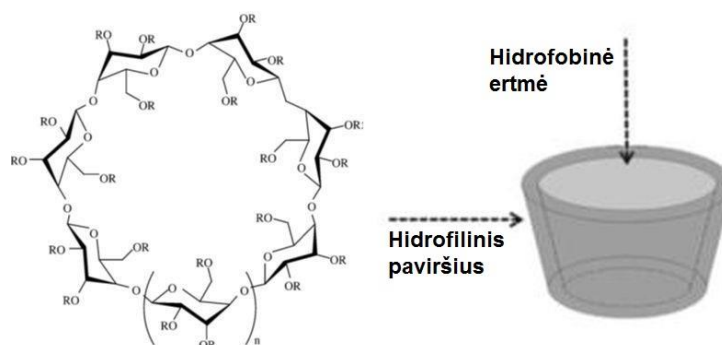


**1.3 pav.** Palatinozės (izomaltuliozės) struktūrinė formulė (Tan ir kt., 2014).

Palatinozė yra disacharidas ir yra labai lėtai, bet beveik visiškai suskaidoma plonosiose žarnose (Jonker ir kt., 2002; Lina ir kt., 2002; Arai ir kt., 2007; Holub ir kt., 2010; Tonouchi ir kt., 2011), todėl ji gali turėti įtakos tik plonojoje žarnoje bei proksimalinėje storosios žarnos dalyje esančioms bakterijoms. Vienos iš tokių – probiotinės *Lactobacillus* spp. bakterijos (Quingley ir Quera, 2006; Walter, 2008; Goderska ir kt., 2008; Ferreira ir kt., 2011). Tačiau palatinozė suteikia ir kitokios naudos sveikatai: tyrimais parodyta, kad palatinozė sumažina plazmos gliukozės bei insulino kiekius, didina jautrumą insulinui ir nesukelia jam atsparumo (Arai ir kt., 2007; Holub ir kt., 2010). Taip pat, ji efektyvi gydant hiperglikemiją bei stabdo riebalų kaupimąsi adipoziniame audinyje (Arai ir kt., 2007; Fujiwara ir kt., 2007).

### 1.1.2.3 $\alpha$ -ciklodekstrinas

Ciklodekstrinai (CD) yra žiediniai OS, sudaryti iš  $\alpha$ -1,4-ryšiais sujungtų gliukozės liekanų (1.4 pav.). Yra trys pagrindinės CD formos:  $\alpha$  (iš 6 monomerų),  $\beta$  (iš 7 monomerų) ir  $\gamma$  (iš 8 monomerų). Pramoniniu būdu CD gaminami iš krakmolo, bet taip pat gali būti gaminami fermentuojant celiuliozę ar krakmolą (Szerman ir kt., 2007; Loftsson ir Duchêne, 2007; Stella ir He, 2008; Al-Sheraji ir kt., 2013; Kurkov ir Loftsson, 2013; Li ir kt., 2014). Šiam procesui naudojamus fermentus – ciklodekstrinų glikoziltransferazes (CGTazes; 1,4-a-D-gliukan:1,4-a-D-gliukopiranoziltransferazes) – produkuoja kai kurios *Bacillus* genties bakterijos (Higuti ir kt., 2004; Szerman ir kt., 2007; Moriwaki ir kt., 2009; Atanasova ir kt., 2011), taip pat – ir kai kurios termofilinės rūšys (Avci ir Dönmez, 2009).



**1.4 pav.** CD struktūra. Kairėje – bendra cheminė CD formulė (Brewster ir Loftsson, 2007).  $\alpha$ -CD atveju, R=H. Dešinėje – CD molekulės erdvinė schema (Pinho ir kt., 2014).

CD molekulių vidus yra hidrofobinis, o išorė – hidrofilinė (1.4 pav.), todėl jie pasižymi gebėjimu formuoti įterptinius kompleksus su kitomis molekulėmis. Be to, yra parodyta, kad CD yra netoksiški (Del Vale, 2004; Loftsson ir Duchêne, 2007; Wagner ir kt., 2008; Stella ir He, 2008; Song ir kt., 2009; Kurkov ir Loftsson, 2013; Li ir kt., 2014). Dėl šių savybių, CD pritaikymas sparčiai auga (Astray ir kt., 2009; Ciobanu ir kt., 2013; Valente ir Söderman, 2014). Jie plačiausiai naudojami farmacijoje, siekiant padidinti vaistų stabilumą, tirpumą ar kaip jų pernešimo priemonės (Del Vale, 2004; Fenyvesi ir kt., 2005; Loftsson ir Duchêne, 2007; Carrier ir kt., 2007; Cal ir Centkowska, 2008; Messner ir kt., 2010; Kurkov ir Loftsson, 2013). Maisto pramonėje CD taikomi kvapų, skonių maskavimui, fiksavimui ar pašalinimui; bioaktyvių komponentų stabilizavimui ir apsaugai, maisto produktų galiojimo laiko prailginimui ir apsaugai (pakuotės su inkapsuliuotomis antibakterinėmis medžiagomis) bei cholesterolio pašalinimui (Del Vale, 2004; Fenyvesi ir kt., 2005; Szenté ir Szejtli, 2004; Astray ir kt., 2009; Kurkov ir Loftsson, 2013; Li ir kt., 2014; Kfoury ir kt., 2015). Jie taip pat taikomi žemės ūkyje, odontologijoje, chemijos, aplinkosaugos, kosmetikos ir tekstilės pramonėse (Del Vale, 2004; Kurkov ir Loftsson, 2013; Sadgrove ir kt., 2015; Pinho ir kt., 2014; Valente ir Söderman, 2014; Li ir kt., 2014).

Nors pramonėje dėl mažesnės gamybos kainos plačiau taikomas  $\beta$ -CD, tačiau  $\alpha$ -CD pasižymi žymiai geresniu tirpumu vandenyje (145 mg/ml) nei  $\beta$ -CD (18,5 mg/ml, 25 °C) (Szejtli, 2004; Loftsson ir Duchêne, 2007; Li ir kt.,



2014). Be to,  $\alpha$ -CD JAV ir Japonijoje pripažintas GRAS (Fenyvesi ir kt., 2005; Loftsson ir Duchêne, 2007; Stella ir He, 2008; Wagner ir kt., 2008; Ciobanu ir kt., 2013; Swift ir kt., 2014; Li ir kt., 2014).

Tyrimais parodyta, kad  $\alpha$ -CD pasižymi sveikatai naudingumu: padeda palaikyti pastovų svorį, padidina adiponektino lygį kraujyje, sumažina trigliceridų, leptino kiekį kraujyje, padidina jautrumą insulinui bei sumažina glikeminį atsaką (Buckley ir kt., 2006; Wagner ir kt., 2008; Swift ir kt., 2014; Li ir kt., 2014). Dėl minėtų savybių  $\alpha$ -CD naudingas siekiant sumažinti širdies kraujagyslių ligų riziką (Wagner ir kt., 2008) bei taikymui diabetu sergantiems žmonėms skirtuose maisto produktuose, o jo gebėjimas surišti 9 kartus daugiau riebalų, nei jo paties masė, rodo didelį  $\alpha$ -CD potencialą kovai su antsvoriu (komercijoje  $\alpha$ -CD prieinamas kaip maisto papildas dietai (FBCx<sup>®</sup>) (Wagner ir kt., 2008; Swift ir kt., 2014; Li ir kt., 2014).

Iš trijų CD formų  $\alpha$ -CD yra atspariausias hidrolizei virškinamajame trakte ir yra fermentuojamas bakterijų storojoje žarnoje (Fenyvesi ir kt., 2005; Kurkov ir Loftsson, 2013; Swift ir kt., 2014; Li ir kt., 2014). Taip pat parodyta, kad  $\alpha$ -CD pasižymi antibakteriniu poveikiu prieš *Bacillus* sp. bakterijas (Zhang ir kt., 2008). Šios savybės rodo didelį  $\alpha$ -CD kaip prebiotiko pritaikymo funkcionaliame maiste potencialą (Li ir kt., 2014).

### **1.1.3 Sinbiotikai**

Sinbiotikai – tai probiotinių bakterijų ir prebiotikų kombinacija, pasižyminti sinergistiniu poveikiu vartotojo sveikatai (Ghosh, 2012; Szkaradkiewicz ir Karpiński, 2013; Pandey ir kt., 2015; Tomar ir kt., 2015). Tai yra daug žadanti šių dienų strategija, ypatingai populiarėjanti funkcionaliame maiste ir plačiai naudojama Europos gamintojų (Pandey ir kt., 2015; Tomar ir kt., 2015). Sinbiotiko veiksmingumas pirmiausiai priklauso nuo naudojamo probiotinio kamieno efektyvumo, o prebiotinis komponentas leidžia pasireikšti pilnam probiotiko potencialui, todėl ypatingai svarbu teisingai parinkti ir

eksperimentais suderinti sinbiotiko komponentus (Saminathan ir kt., 2011; Farinha ir kt., 2015; Tomar ir kt., 2015).

Sinbiotinių kombinacijų veiksmingumas taip pat patvirtintas eile eksperimentinių tyrimų, kuriais parodyta, kad jie gerina mitybinių ir mineralinių medžiagų įsisavinimą, stiprina imunitetą, mažina cholesterolio kiekį kraujyje bei pasižymi priešvėžiniu poveikiu (Le Leu ir kt., 2010; Ghosh, 2012; Likotrafiti ir kt., 2013; Anandharaj ir kt., 2014; Likotrafiti ir kt., 2014; Pandey ir kt., 2015; Tomar ir kt., 2015; Liu ir kt., 2015; Dixit ir kt., 2016).

#### **1.1.4 Postbiotikai**

Gerosios žarnyno bakterijos produkuoja eilę medžiagų, pasižyminčių nauda šeimininko sveikatai, kurios, po bakterijų žūties, lieka organizme ir toliau funkcionuoja, gerindamos šeimininko sveikatą. Tai įvairūs bakterijų metabolitai ar sekretuojami junginiai (organinės rūgštys, sekreciniai fermentai, peptidai ir bakteriocinai) bei pačių ląstelių komponentai (peptidai, teicho rūgštys, peptidoglikano kilmės muropeptidai, egzopolisacharidai, ląstelių paviršiaus baltymai) (O'Shea ir kt., 2012; Klemashevich ir kt., 2014; Tomar ir kt., 2015; Dixit ir kt., 2016). Jie didžiąja dalimi atkartoja ar net yra atsakingi už terapines probiotikų teikiamas naudas (O'Shea ir kt., 2012; Tomar ir kt., 2015). Tačiau postbiotikai yra pranašesni, nes leidžia išvengti su gyvų bakterijų naudojimu susijusių rizikų, tokių kaip atsparumo antibiotikams genų plitimas, kamienui specifiskas virulentiškumas bei sepsis. Be to, postbiotikų privalumas yra jų žinoma cheminė sudėtis, aiškesnis dozavimas bei ilgesnis išsilaikymas (Tomar ir kt., 2015; Dixit ir kt., 2016). Todėl gausėja ir jų pritaikymo tyrimų: yra parodyta, kad postbiotikų ir inulino kombinacija veiksmingai sumažino patogeninių bakterijų proliferaciją (Tomar ir kt., 2015). Taip pat aprašyta eilė sėkmingų bakteriocinų terapijos pavyzdžių, inhibuojant patogeninių bakterijų proliferaciją žarnyne (O'Shea ir kt., 2012; Ahmad ir kt., 2017).

Šiame darbe aktualiausi postbiotikai yra bakteriocinai, todėl literatūrinėje apžvalgoje detaliau aptariamos tik šios molekulių grupės

struktūrinės, genetinės ir fizikocheminės savybės, biosintezė ir pritaikymo potencialas.

### **1.1.5 Bakteriocinai**

Bakteriocinai – tai bakterijų ribosomų natūraliai sintetinami antimikrobiniai peptidai ar baltymai (Tagg ir kt., 1976; Heng ir kt., 2007; Roces ir kt., 2012; Snyder ir Worobo, 2014; Yang ir kt., 2014; Maina ir kt., 2017). Šias baltymines molekules produkuoja įvairūs gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų kamienai, esant stresinėms sąlygoms ar reguliuojant bakterijų populiacijos dydį (Dobson ir kt., 2011; O'Shea ir kt., 2012; Snyder ir Worobo, 2014). Manoma, kad 99% bakterijų produkuoja bent vieną bakteriociną (Gillor ir kt., 2008; Mills ir kt., 2011; Roces ir kt., 2012; Yang ir kt., 2014). Be to, viena bakterijų rūšis gali produkuoti daugiau negu vieną skirtingų tipų bakteriociną (Roces ir kt., 2012; Mirkovic ir kt., 2016; Maina ir kt., 2017).

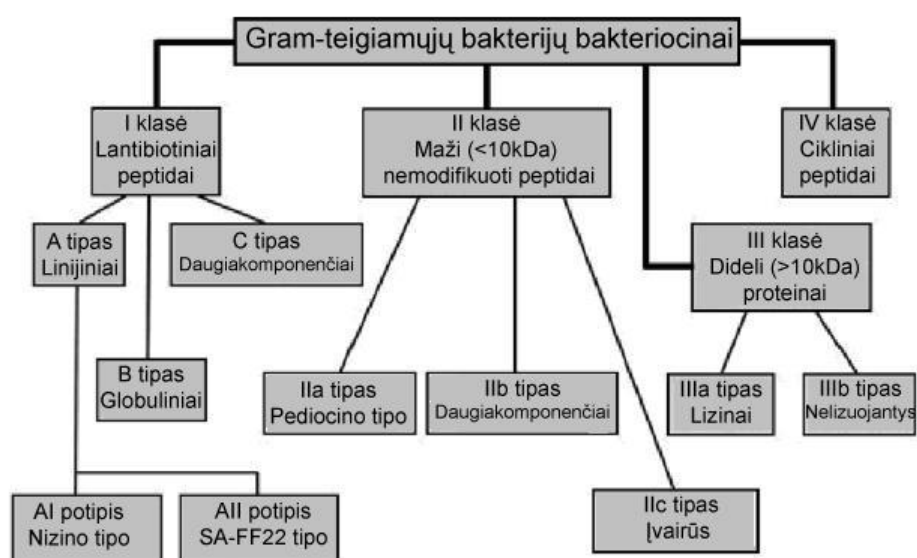
Dauguma gramteigiamų bakterijų sekretuojamų bakteriocinų yra 20-60 am.r. ilgio katijoninės, hidrofobinės ar amfifilinės molekulės (Heng ir kt., 2007; Gillor ir kt., 2008; Özdemir ir Biyik, 2012; Abdulla, 2014; Yang ir kt., 2014; Ahmad ir kt., 2017). Jų letalus poveikis mikroorganizmams dažniausiai pasireiškia porų formavimu ir/arba ląstelės sienlės sintezės inhibavimu. Veikimui svarbios pirminės sąveikos su neigiamą krūvį turinčiomis ląstelės voko struktūromis, tokiomis kaip lipopolisacharidai (LPS) arba lipoteichoinės rūgštys (LTA) (Heng ir kt., 2007; Gillor ir kt., 2008; Roces ir kt., 2012; Snyder ir Worobo, 2014; Khalaf ir kt., 2016; Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017).

#### **1.1.5.1 Gramteigiamų bakterijų bakteriocinų klasifikacija**

Pirmą kartą bakteriocinų veikimas aprašytas 1925 m., kuomet André Grata apibūdino antagonistinį *Escherichia coli* V poveikį prieš *E. coli* Ø bakterijas (Yang ir kt., 2014; Cavera ir kt., 2015; Bastos ir kt., 2015). Pats terminas „bakteriocinas“ buvo pasiūlytas 1953 m. ir buvo paremtas kolicinų charakteristikomis, nes šie tuo metu buvo intensyviausiai tiriami. Todėl iš

pradžių daugiausiai dėmesio susilaukė gramneigiamų bakterijų sekretuojami bakteriocinai (kolicinai). Situacija pasikeitė kuomet 1953 m. pramonėje buvo pritaikytas nizinas. Nuo to laiko bakteriocinų tyrimai susikoncentravo ties gramteigiamomis bakterijomis. Pirmas detalus gramteigiamų bakteriocinų apibūdinimas ir nomenklatūra pateikta 1976 metais (Tagg ir kt., 1976). Todėl nenuostabu, kad per tiek metų apibūdinta daugybė gramteigiamų bakterijų sekretuojamų bakteriocinų. Siekiant susisteminti tokią duomenų gausą, buvo pasiūlyta eilė klasifikacijos sistemų (Bastos ir kt., 2015; Sumi ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017).

Ilgą laiką plačiausiai taikyta gramteigiamų bakterijų bakteriocinų klasifikacijos sistema, paremta Cotter ir kt., 2005 (1.5 pav.), su modifikacijomis (Heng ir kt., 2007). Joje bakteriocinai skirstomi pagrinde pagal jų dydį, struktūrą, modifikacijas bei veikimo pobūdį (Heng ir kt., 2007; Nes ir kt., 2007; Lohans ir Vederas, 2012, Lee ir Kim, 2011).



**1.5 pav.** Modifikuota gramteigiamų bakterijų bakteriocinų klasifikacijos schema, paremta Cotter ir kt., 2005 (Heng ir kt., 2007).

Daugiausiai aprašyta gramteigiamų bakterijų bakteriocinų, kuriuos sekretuoja LAB, nes dauguma jų yra pripažįstamos GRAS ir yra plačiai naudojamos maisto pramonėje (Diop ir kt., 2007; Heng ir kt., 2007; Parada ir kt., 2007; Mills ir kt., 2011; Perez ir kt., 2014; Bastos ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro

ir kt., 2016; Worapryote ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017; Maina ir kt., 2017). Tuo tarpu *Bacillus* sp. genties bakterijos laikomos antru pagal gausą bakteriocinų producentų šaltiniu (Abriouel ir kt., 2011; Lim ir kt., 2016, Zimina ir kt., 2016). Todėl buvo pasiūlyta atskirai klasifikuoti *Bacillus* sp. genties bakteriocinus (Abriouel ir kt., 2011; Sumi ir kt., 2015). Šiame darbe vadovaujamesi apibendrinta klasifikacijos schema, pateikta 1.2 lentelėje.

**1.2 lentelė.** Apibendrinta gramteigiamų bakterijų bakteriocinų klasifikacija (Heng ir kt., 2007; Yang ir kt., 2014; Perez ir kt., 2014; Bastos ir kt., 2015).

| <b>Klasė</b> | <b>Poklasis</b> | <b>Pagrindiniai bruožai</b>  |
|--------------|-----------------|--|
| <b>I</b>     |                 | Lantibiotikai – peptidai (<5 kDa), turintys tioeterinius tiltelius ir neįprastas, modifikuotas aminorūgštis.   |
|              | A               | Linijiniai ir santykinai lankstūs, katijoniniai peptidai.  |
|              | B               | Globulinės struktūros nelankstūs peptidai, neturintys arba turintys neigiamą krūvį.  |
|              | C               | Kelių peptidų lantibiotikai.   |
| <b>II</b>    |                 | Maži (<10 kDa), termostabilūs, nemodifikuoti bakteriocinai, kurie veikia panašiais būdais, kaip lantibiotikai, bet jų receptoriai yra baltymai, o ne lipidai.  |
|              | IIa             | Prieš listeriniai pediocino tipo bakteriocinai.  |
|              | IIb             | Dviejų peptidų bakteriocinai.  |
|              | IIc             | Cikliniai bakteriocinai.   |
|              | IId             | Įvairūs nemodifikuoti bakteriocinai, įskaitant neturinčius signalinės sekos, tioliu aktyvuojamus peptidus, kurių aktyvumui reikia redukuotų cisteino liekanų bei <i>sec</i> keliu sekretuojamus bakteriocinus. |
| <b>III</b>   |                 | Dideli (>25 kDa), termolabilūs baltymai  |
|              | IIIa            | Bakteriolozinai  |
|              | IIIb            | Nelizuojantys baltymai   |

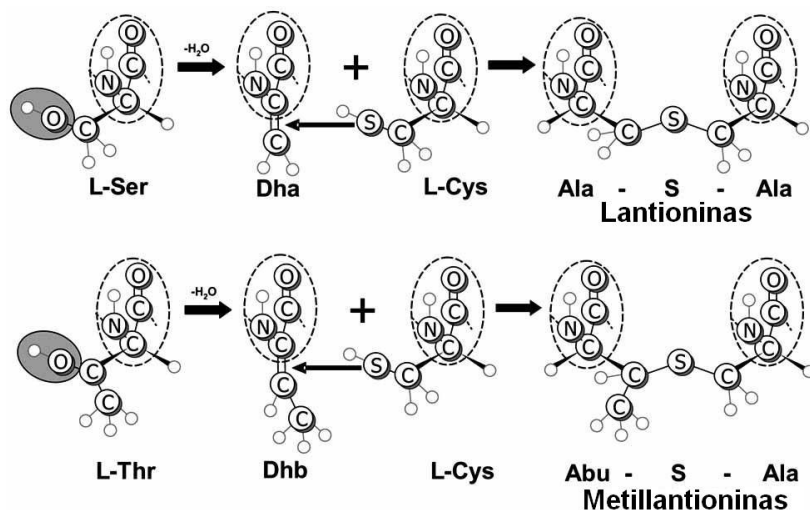
Per pastarąjį dešimtmetį aprašytų gramteigiamų bakterijų bakteriocinų struktūrinė įvairovė prasiplėtė, todėl neseniai pasiūlyta nauja detali klasifikacijos schema, paremta Heng ir kt. (2007); Nes ir kt. (2007), Bierbaum ir Sahl (2009), Nissen-Meyer ir kt. (2009) bei van Belkum ir kt. (2011) (Bastos

ir kt., 2015). Šioje shemoje papildytos I ( pridėtas ID poklasis) ir II ( pridėti IId, IIe, II f poklasiai) klasės. Tačiau šiuo metu dažniausiai vadovaujamosi LAB bakteriocinų suskirstymu į tris dideles klases (Yang ir kt., 2014; Perez ir kt., 2014). Šioje klasifikacijos shemoje cikliniai bakteriocinai perkelti iš III klasės (1.5 pav.) į IIc poklasį, o IV klasės dideli bakteriocinai (1.5 pav.) priskiriami III klasei (1.2 lentelė).

### **1.1.5.2 I klasės bakteriocinų (lantibiotikų) genetinė organizacija, struktūra ir biosintezė**

Šios grupės bakteriocinų skiriamasis bruožas – vidumolekulinės žiedinės struktūros, suformuojamos modifikuojant tam tikras aminorūgštis. Tai maži bakteriocinai (<5 kDa), pasižymintys antibakteriniu aktyvumu prieš giminingas gramteigiamas bakterijas, bet įprastai neaktyvūs prieš gramteigiamas bakterijas (Heng ir kt., 2007; Mills ir kt., 2011; Lee ir Kim, 2011; Perez ir kt., 2014; Ahmad ir kt., 2017; Maina ir kt., 2017).

Lantibiotikai sintetinami kaip prepeptidai su N-galine signaline seka. Po transliacijos vyksta prepeptido aminorūgščių modifikavimas (Lubelski ir kt., 2008; Lee ir Kim., 2011; Perez ir kt., 2014; Snyder ir Worobo, 2014). Lantibiotikų struktūroje yra netipiškų aminorūgščių, paprastai nesutinkamų gamtoje, kaip 2,3-didehidroalaninas (Dha) ir 2,3-didehidrobutirinas (Dhb). Šios aminorūgštys yra serino ir treonino dehidrinimo padariniai. Lantionino (Lan) tioeterinis tiltelis yra suformuojamas, kai dvigubasis Dha ryšys yra atakuojamas gretimo cisteino tiolio (-SH) grupe. Metilantioninas (MeLan) suformuojamas analogiškos reakcijos metu, tik vietoje Dha yra atakuojamas Dhb dvigubasis ryšys (1.6 pav.). Dėl šių tioeterinių tiltelių, lantibiotikų struktūra yra policiklinė. Manoma, kad šie žiedai suteikia peptidui tvirtumo ir prisideda prie jų atsparumo proteoliziniam degradavimui bei terminiam šokui (Piper ir kt., 2009; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Khan ir Oh, 2016; Ahmad ir kt., 2017).



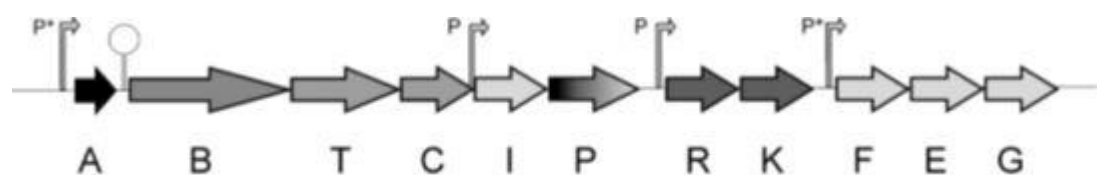
**1.6 pav.** Potransliacinės modifikacijos, aptinkamos lantibiotikuose, formuojant lantionino ir ( $\beta$ -metil)lantionino tiltelius. Pirmiausiai dehidrinamos Ser ir Thr aminorūgščių liekanos iki Dha ir Dhb atitinkamai. Po to vyksta sąveika su cisteino aminorūgščių liekanomis (Piper ir kt., 2009).

Lantibiotikų struktūriniai, biosintezės, modifikavimo, pernašos bei imuniteto genai yra organizuoti į grupes (Heng ir kt., 2007; Lee ir Kim, 2011; Mills ir kt., 2011). Jose šalia struktūrinių lantibiotikų genų (*lanA*) yra genai, atsakingi už bakteriocinų modifikaciją (*lanB*, *lanC*, *lanM* ir *lanD*), brendimą (*lanP*), imunitetą (*lanI* ir *lanFEG*) bei sintezės valdymą (*lanR*, *lanK* ir *lanQ*) (Lubelski ir kt., 2008; Lee ir Kim, 2011). Modifikacijos, pernašos ir valdymo sistemos sudarytos iš indukuojančių peptidų, sensorinių kinazių ir atsako reguliatorių (Lee ir Kim, 2011). Imuniteto baltymai apsaugo šeimininką nuo jo pačio produkuojamo bakteriocino (Snyder ir Worobo; 2014; Bastos ir kt., 2015).

Lantibiotikus iš ląstelės į išorę perneša ATP surišančios kasetės (ABC) tipo pernašos baltymai, turintys hidrofobinius membraną perveriančius domenus. Jie gali veikti dviem būdais: AI lantibiotikus per membraną perneša LanT pernašos baltymai ir tuomet LanP proteazė nuskelia signalinę seką; o AII lantibiotikų atveju abu procesai yra vykdomi vieno LanT pernašos baltymo, turinčio N-galinį proteazinį domeną (Bierbaum ir Sahl, 2009; Lee ir Kim, 2011; Mirkovic ir kt., 2016).

Šios klasės prototipas – nizinas – yra geriausiai ištirtas visais aspektais (Lubelski ir kt., 2008; Perez ir kt., 2014; Bastos ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Maina ir kt., 2017). Jis buvo pirmasis aprašytas lantibiotikas (Snyder ir Worobo; 2014; Cavera ir kt., 2015; Bastos ir kt., 2015). Subrendęs nizinas sudarytas iš 34 aminorūgščių. Yra žinomi 7 natūralūs nizino variantai: A, Z ir Q (produkuoja *Lactococcus lactis* kamienai), U ir U2 (produkuoja *Streptococcus uberis*), bei P (*Streptococcus suis* ir *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*) ir F (*L. lactis* F10), kurie skiriasi tam tikromis aminorūgštimis (Lubelski ir kt., 2008; Khan ir Oh, 2016; Kaškonienė ir kt., 2017).

Nizino biosintezės kelią koduoja genų grupė, sudaryta iš 11 genų (*nisA(Z)BTCIP*, *nisRK* ir *nisFEG*), išsidėsčiusių dideliame nizino-sacharozės transpozone (1.7 pav.) (Cheigh ir Pyun, 2005, Lubelski ir kt., 2008; Perez ir kt., 2014; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Khan ir Oh, 2016).

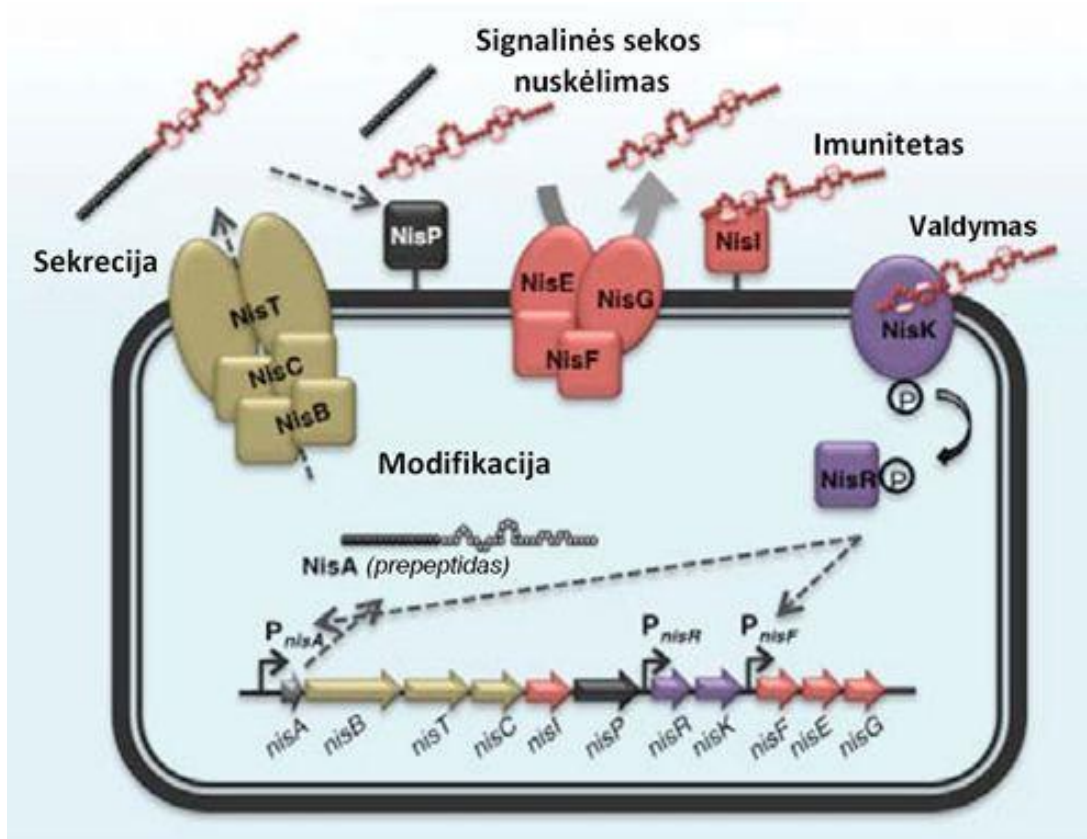


**1.7 pav. Nizino biosintezės genų grupės organizacija.** Regulone yra keturi transkripciniai vienetai. Pirmame operone yra nizino struktūrinis genas (*nisA*), atskirtas nuo modifikacijos genų *nisBTCIP* su įsiterpusiu *nisI*, koduojančiu imuniteto baltymą, ir reguliacinių genų *nisRK* invertuotomis sekomis. Prieš *nisI* geną yra vidinis promotorius (konstitutyvus), leidžiantis pradėti imuniteto baltymo raišką dar iki pilnos nizino produkcijos. Prieš dvikomponentės valdymo sistemos *nisRK* genus yra silpnas promotorius (konstitutyvus). Ketvirtas operonas koduoja imuniteto baltymus NisFEG (ABC pernašos baltymas). P\* pažymėti promotoriai, valdomi dvikomponentės sistemos NisRK (Lubelski ir kt., 2008).

1.8 paveiksle pateikta nizino A biosintezės schema. Pagrindiniai nizino biosintezės kelio elementai aptinkami daugumoje lantibiotikų tik su nedidelėmis variacijomis (Lee ir kim, 2011; Snyder ir Worobo, 2014). Vietoje LanB/C komplekso dehidrinimo ir žiedo formavimo reakcijose (AI poklasio lantibiotikai) gali būti panaudojamas vienas modifikuojantis fermentas LanM (AII poklasio lantibiotikai) (Garg ir kt., 2012; Snyder ir Worobo, 2014; Mirkovic



ir kt., 2016). Kai kurių lantibiotikų genų grupėse koduojamas LanD fermentas, kuris aktyvuoja neįprastų aminorūgščių formavimą, tokių kaip S-[(Z)-2-aminovinilo]-D-cisteino (AviCys) ir S-[(Z)-2-aminovinilo]-(3S)-3-metil-D-cisteino (AviMeCys) (Heng ir kt., 2007).



**1.8 pav.** Nizino A biosintezės schema. Nizinas A sintetinamas ribosomose kaip neaktyvus prepeptidas (NisA), sudarytas iš propeptido ir N-galinės signalinės sekos. Modifikacijos fermentai dehidratuoja (*nisB*) ir ciklizuoja (*NisC*) propeptidą. ABC tipo pernašos baltymas (*NisT*) perkelia modifikuotą prepeptidą už ląstelės ribų, kur proteazė (*NisP*) nuskelia signalinę seką ir atpalaiduoja subrendusį aktyvų niziną A. Tuomet prie jo gali jungtis lipoproteinas (*NisI*), arba veikti kelių baltymų kompleksas, sudarantis ABC pernašos sistemą (*NisFEG*), kuri išmeta niziną A iš ląstelės – taip sudaromas producento imunitetas nizinui A. Dvikomponentė valdymo sistema, sudaryta iš histidino kinazės (*NisK*) ir atsako reguliatorius (*NisR*) aktyvina nizinio A genų grupės sintezę. Nizinas A tarnauja kaip peptidas induktorius, aktyvuojantis savo paties sintezę (Perez ir kt., 2014).

Papildomų baltymų transkripcija ir bakteriocinų produkcija yra valdoma kolektyvinio atsako sistemos (QS), veikiančios nuo ląstelių tankio priklausomu

būdu (Straume ir kt., 2007; Gillor ir kt., 2008; Dobson ir kt., 2011; Lee ir Kim, 2011; Mongkoltharuk, 2012; O'Shea ir kt., 2012; Snyder ir Worobo, 2014; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016). QS sistema yra bakterijose plačiai sutinkamas fenomenas, susijęs su antibakterinių peptidų indukcija, virulentiškumo faktorių raiška, sporuliacija ir kitais fiziologiniais procesais (Gillor ir kt., 2008; Dobson ir kt., 2011; Lee ir Kim, 2011; Mongkoltharuk, 2012).

Bakteriocinų biosintezės valdyme dalyvauja induktoriaus molekulė, histidino proteinkinazė ir atsako reguliatorius (AR). Fosforilintas ir taip aktyvuotas AR veikia kaip transkripcijos aktyvatorius, kuris prisijungia prie bakteriocinų genams specifinių promotorių ir stimuliuoja transkripciją. AR taip pat aktyvuoja genus, koduojančius trikomponentę valdymo sistemą, ir taip sukuriama teigiamas grįžtamasis ryšys (Drider ir kt., 2006; Snyder ir Worobo, 2014; Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017). Induktoriui aplinkoje pasiekus ribinį kiekį, induktorius iš vienos ląstelės gali indukuoti kitas ląsteles, o šios – dar kitas, ir galiausiai per trumpą laiką indukuotos ląstelės sekretuoja didelius bakteriocino kiekius (Straume ir kt., 2007; Lee ir Kim, 2011; O'Shea ir kt., 2012). Nizino A atveju, induktorius yra pati bakteriocino molekulė (Lee ir Kim, 2011; Snyder ir Worobo, 2014).

Trikomponentę valdymo sistemą koduojantys genai identifikuoti nizino (*nisR* ir *nisK*), subtilino (*spaR* ir *spaK*), salivaricino (*salR* ir *salK*), streptokokino A-FF22 (*scnR* ir *scnK*) ir mersacidino (*mrsR1/R2* ir *mrsK2*) genų grupėse (Cheigh ir Pyun, 2005; Lee ir Kim., 2011).

### **1.1.5.3 II klasės bakteriocinų genetinė organizacija, struktūra ir biosintezė**

Daugumos IIa klasės bakteriocinų genai yra plazmidėse, išskyrus genus, koduojančius enterociną A, diverciną V41, sakaciną P ir karbobakteriocinus B2 ir BM1, kurie yra lokalizuoti chromosomoje (Drider ir kt., 2006). Genai dažniausiai organizuoti viename ar keletame operonų. Pediocino AcH/PA-1 atveju keturi bakteriocino biosintezei reikalingi genai yra lokalizuoti viename

operone, kurį sudaro: struktūrinis prebakteriociną koduojantis genas, imuniteto genas, ABC pernašos baltymą koduojantis genas ir papildomą, nežinomos funkcijos baltymą koduojantis genas (Papagianni ir Anastasiadou, 2009; Snyder ir Worobo, 2014).

Ila klasės bakteriocinai savo struktūroje turi konservatyvią YGNGV aminorūgščių seką, vadinamą „pediocinų dėžute“. Yra parodyta, kad struktūroje esančių disulfidinių tiltelių kiekis tiesiogiai koreliuoja su šių bakteriocinų antibakteriniu aktyvumu ir stabilumu (Richard ir kt., 2006; Heng ir kt., 2007; Perez ir kt., 2014).

Pediocinai yra sintetinami su signaline seka, kuri paprastai atskeliama per dvigubo glicino (GG) motyvą, pernašos per ABC tipo pernašos baltymus metu (Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017). Pediocinas AcH/PA-1 sintetinamas biologiškai neaktyvioje 66 aminorūgščių ilgio prepeptido formoje. Įvykus potransliacinėms modifikacijoms, kurių metu atskeliama 18 aminorūgščių ilgio N-galinė signalinė seka, susidaro 44 aminorūgščių ilgio aktyvus peptidas (Papagianni ir Anastasiadou, 2009; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016).

Iib potipio dvikomponenčių bakteriocinų abu peptidai yra sintetinami kaip pirmtakai, turintys 15-30 aminorūgščių ilgio N-galines signalines sekas, su dvigubo glicino (GG) skėlimo motyvais. Nuo C-galinės peptidų dalies signalines sekas ties GG motyvais atskelia ABC pernašos baltymai, kurie tuo pačiu perkelia peptidus per membraną į ląstelės išorę. Signalinė seka sustiprina sąveiką su ABC pernašos sistema ir gali palaikyti bakteriociną neaktyvioje formoje iki jo sekrecijos (Snyder ir Worobo, 2014; Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017). Genai, koduojantys abu peptidus, visuomet aptinkami greta, tame pačiame operone, kartu su imuniteto genais. Kai kurių šios klasės bakteriocinų atveju (laktokokcino G) šiame operone taip pat yra genai, koduojantys ABC pernašos sistemą ir papildomą baltymą. Kitų Iib tipo bakteriocinų atveju (enterocino 1071, plantaricino E/F ir plantaricino J/K) šie genai lokalizuoti atskirame operone, esančiame netoli struktūrinių genų operono. Manoma, kad papildomas

baltymas dalyvauja imuniteto bakteriocinui formavime ir/arba yra reikalingas peptidų pernašai per ABC pernašos sistemą (Nissen-Meyer ir kt., 2009).

Kai kurių dviejų peptidų bakteriocinų raiška vyksta konstitutyviai. Tuo tarpu kitų (termofilino 9, plantaricino E/F, plantaricino J/K, ABP-118 ir NC8) yra valdoma transkripcijos lygyje per trikomponentę signalo perdavimo sistemą, sudarytą iš peptido-feromono, su membrana susijusios histidino kinazės ir AR. Šios sistemos veikimas yra analogiškas kitų bakteriocinų sintezės valdymui trikomponentėmis signalo perdavimo sistemomis nuo ląstelių tankio priklausomu būdu (Fontaine ir kt., 2007; Lee, Kim, 2011; Nissen-Meyer ir kt., 2010; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017). Kai kurie II klasės bakteriocinai, kaip lakticinas Q ir laktokokcinas 972, yra sekretuojami bendruoju sekrecijos *sec* keliu (Heng ir kt., 2007; Todorov, 2009; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017; Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017). Jie priskiriami IId poklasiui (Perez ir kt., 2014).

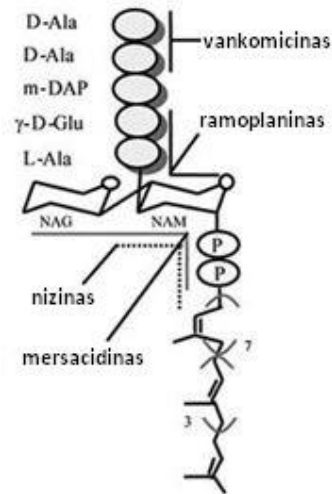
Yra aprašyta apie 20 bakteriocinų, neturinčių signalinės sekos (Perez ir kt., 2014; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Ovchinnikov ir kt., 2016, Towle ir Vederas, 2017), kurie buvo priskiriami IIc poklasiui (įvairių struktūrų nemodifikuoti bakteriocinai) (1.5 pav.) (Heng ir kt., 2007), bet dabartinėje LAB bakteriocinų klasifikacijoje jie priskiriami IId poklasiui (1.2 lentelė). Šie bakteriocinai yra aktyvūs iš karto po transliacijos (Perez ir kt., 2014; Towle ir Vederas, 2017).

#### **1.1.5.4 Bakteriocinų veikimo mechanizmai**

Bakteriocinai dažniausiai veikia formuodami poras ląstelės-taikinio membranoje (Lee ir Kim, 2011, Roces ir kt., 2012; Snyder ir Worobo, 2014; Bastos ir kt., 2015; Sumi ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016). Bakterinių ląstelių citoplazminės membranos pagrinde yra sudarytos iš neigiamą krūvį turinčių kardiolipino, fosfatidilglicerolio ar fosfatidilserino, todėl bakteriocinai, kurie dažniausiai yra katijoniniai, gali būti lengvai pritraukiami prie ląstelių elektrostatinėmis jėgomis (Todorov, 2009; Lee ir Kim, 2011; Bastos ir kt., 2015;

Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017). Jų antibakterinis aktyvumas dažniausiai pasireiškia porų formavimo dėka, tačiau antibakterinio aktyvumo spektras priklauso nuo pačio peptido. Specifinių receptorinių molekulių ląstelių-taikinių paviršiuje buvimas gali lemti antibakterinio aktyvumo spektro skirtumus (Tagg ir kt., 1976; Lee ir Kim, 2011; Bastos ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016).

Lantibiotikų (I klasė) poveikis dažniausiai pasireiškia membranų destabilizavimu, porų formavimu ir/arba ląstelės sienelės sintezės inhibavimu (Heng ir kt., 2007; Lohans ir Vederas, 2012; Ahmad ir kt., 2017). A tipo lantibiotikai yra išstętos amfifilinės peptidinės grandinės pavidalo (Piper ir kt., 2009; Bastos ir kt., 2015; Mirkovic ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017). Jie gali veikti dviem būdais: sudarydami poras jautrių ląstelių membranose ir/arba inhibuodami ląstelės sienelės sintezę (Roces ir kt., 2012; Bastos ir kt., 2015; Khan ir Oh, 2016). Dvigubu veikimu pasižymi nizinas, pediocinas PA-1, lacticinas 3147, pep5, epiderminas ir galiderminas (Egan ir kt., 2016). Abiem atvejais, dažniausias bakteriocinų prisijungimo taikinytis yra lipidas II. Jis yra esminis ląstelės sienelės sintezės pirmtakas, kuris dalyvauja per membraną į išorę perkeliant peptidoglikano (PG) monomerus (Roces ir kt., 2012; Cotter, 2014; Bastos ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016). Lipidas II sudarytas iš baktoprenolio lipido nešėjo (C55-P), per pirofosfatinį tiltelį sujungto su PG monomeru MurNAc-pp-GlcNAc (N-muramil-acetil-pentapeptido-N-acetilgliukozaminas) (Cotter, 2014). Lipidas II yra daugelio lantibiotikų prisijungimo taikinytis, įskaitant porų neformuojančius lantibiotikus (mersacidinas), poras formuojančius lantibiotikus (nizinas, plantaricinas C, galiderminas, amilolizinas, geobacilinas I ir kt.) (Piper ir kt., 2009; Garg ir kt., 2012; Roces ir kt., 2012; Sumi ir kt., 2015), bei dviejų peptidų bakteriocinus, tokius kaip lacticinas 3147 (Martinez ir kt., 2008; Roces ir kt., 2012; Cavera ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016). Pažymėtina, kad lipidas II taip pat yra ir kai kurių antibiotikų (vankomicino) taikinytis (1.9 pav.) (Cotter ir kt., 2005; Roces ir kt., 2012), tačiau vankomicino ir nizino prisijungimo vietos nepersidengia, todėl net vankomicinui atsparios bakterijų rūšys išlieka jautrios nizino poveikiui (Cotter ir kt., 2005; Snyder ir Worobo, 2014; Egan ir kt., 2016).



**1.9 pav.** Antibiotikų (vankomicino ir ramoplanino) ir bakteriocinų (nizino ir mersacidino) jungimosi prie lipido II (undekaprenilpirofosforilMurNAC(pentapeptido)-GlcNAc) vietos NAG – N-acetilgliukozaminas; NAM – N-acilmuramo rūgštis; m-DAP – mezo-diamino pimelo rūgštis (Cotter ir kt., 2005).

Kai kurie AI tipo lantibiotikai, kaip nizinas, pirmiausiai sąveikauja su lipidu II ir tuomet su membrana, sudarydami poras membranoje ir tuo pačiu užkirsdami kelią ląstelės sienelės sintezei, nes blokuojamas lipido II ciklas. Dėl šio specifiškumo lipidui II, nizino aktyvumas pasireiškia nanomolinėmis koncentracijomis (Lee ir Kim, 2011; Roces ir kt., 2012). Tuo tarpu subtilinas jungiasi prie kitos molekulės-taikinio – baktoprenilo pirofosfato – ir sukelia ląstelės membranos pralaidumą panašiu, kaip nuo lipido II priklausomu būdu (Lee ir Kim, 2011). Kai kurių lantibiotikų antibakterinis aktyvumas pasireiškia tik sienelės sintezės blokavimu (Bastos ir kt., 2015).

Visi poras formuojantys bakteriocinai veikia įsiterpdami į taikinio ląstelės citoplazminę membraną (Roces ir kt., 2012; Snyder ir Worobo; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016). Pavyzdžiui, pep5 yra 34 aminorūgščių ilgio stipriai katijoninis lantibiotikas. Teigiamą krūvį peptidui suteikia šešios lizino ir dvi arginino aminorūgščių liekanos. Visos lizino liekanos yra lokalizuotos vienoje molekulės pusėje, o hidrofobinės aminorūgštys – kitoje pusėje, todėl molekulė yra amfifilinė ir tai palengvina porų formavimą membranose. Per šias poras iš bakteriocinu paveiktų ląstelių greitai išteka krūvį turintys jonai, maži metabolitai ir ATP, kas sukelia protonų gradiento išsklaidymą ir visišką

makromolekulių biosintezės sustabdymą (Piper ir kt., 2009; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017).

B tipo lantibiotikai, tokie kaip mersacidinas ir aktagardinas, turi globulinę struktūrą. Jie veikia prisijungdami prie ląstelės membranos lipidų ir slopindami įvairių fermentų aktyvumą (Cotter ir kt., 2005; Bierbaum ir Sahl ; 2009; Zhao ir Kuipers, 2016; Ahmad ir kt., 2017). Mersacidinas yra B tipo lantibiotikų prototipas. Tai vieno peptido lantibiotikas, sudarytas iš 20 aminorūgščių (Heng ir kt., 2007; Zhao ir Kuipers, 2016). Mersacidinas neturi krūvio, yra labai hidrofobiškas ir iki šiol mažiausias aprašytas lantibiotikas. Jis jungiasi prie lipido II ir, nors sąveikoje dalyvauja N-acetilgliukozamino (GlcNAc) cukrus, bet šis lantibiotikas nesijungia ir nesąveikauja su lipidu I. Sąveikoje su lipidu II dalyvauja GxxxxTxs/tCd/Ec(3-10x)C domenai, kuris yra bendras mersacidino ir lakticino 481 tipo bakteriocinams. Priešingai nei nizinas, mersacidinas ir jam giminingi peptidai negali formuoti porų membranoje (Piper ir kt., 2009; Abriouel ir kt., 2011). Dviejų peptidų lantibiotikų atveju, kai vienas iš peptidų yra mersacidino tipo, antrasis peptidas, veikdamas sinergistiškai, suteikia galimybę formuoti poras (Piper ir kt., 2009).

IC – dvikomponenčių lantibiotikų – veikimo metu, A1 peptidas (dar vadinamu  $\alpha$  peptidu) sąveikauja su citoplazmine membrana. Tuomet jungiasi prie lipido II ir blokuoja PG pirmtakų pernašą. A1 peptidas pakeičia konformaciją, sudarydamas prisijungimo vietą peptidui A2 (dar vadinamu  $\beta$  peptidu). Šiam prisijungus, sudaromas poros kompleksas (Bastos ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016). Gerai ištirtas pavyzdys – lakticinas 3147. Nors optimaliam jo aktyvumui yra reikalingi abu peptidai, tačiau globulinis  $\alpha$  peptidas turi mersacidinui būdingą gebėjimą inhibuoti ląstelės sienelės sintezę (Piper ir kt., 2009; Roces ir kt., 2012).

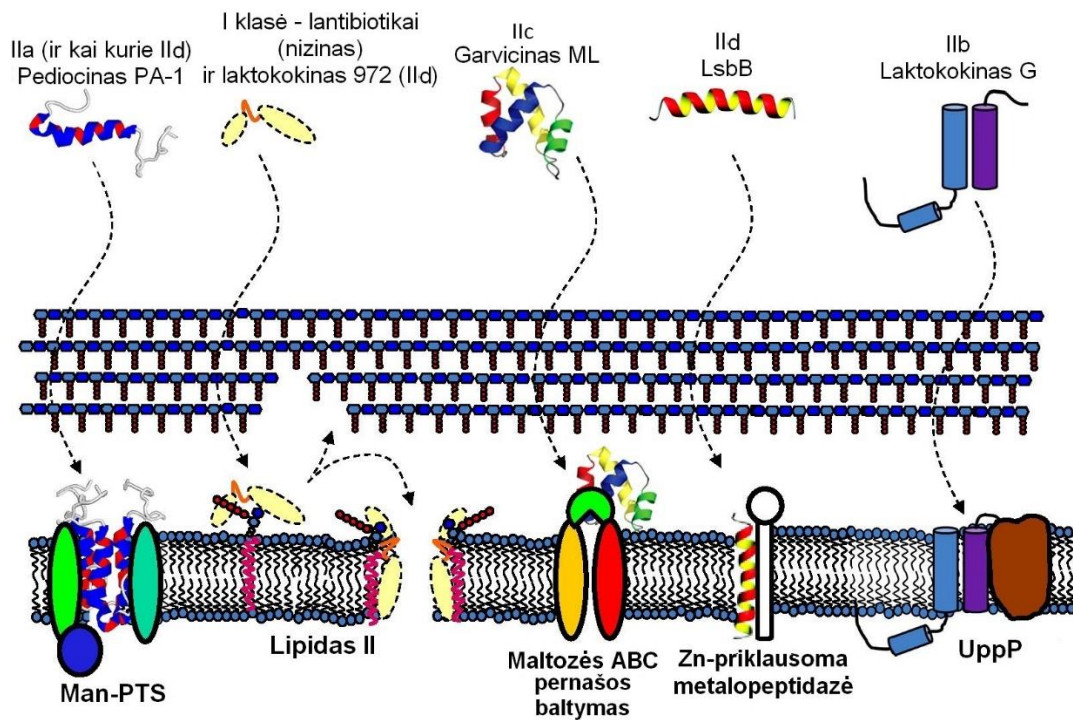
Pastaraisiais metais I klasės bakteriocinams taip pat priskirti tiopeptidai ir botromicinai, kurie veikia inhibuodami baltymų transliaciją, tačiau nėra aišku, koku būdu jie patenka į ląstelę (Cotter, 2014).

Iš II-os klasės bakteriocinų, geriausiai žinomas IIa poklasio – pediocino tipo – bakteriocinų veikimas (Papagianni ir Anastasiadou, 2009; Nissen-Meyer ir kt., 2009; Bastos ir kt., 2015). Pediocinai yra panašios struktūros, 37-48 aminorūgščių ilgio katijoniniai peptidai, kurie tarpusavyje pasižymi 40-60% aminorūgščių homologija (Papagianni ir Anastasiadou, 2009). Jie pasižymi siauresniu antibakteriniu spektru negu lantibiotikai, bet dažniausiai yra aktyvūs prieš *Listeria* spp. bakterijas, todėl dar vadinami antilisteriniais peptidais (Papagianni ir Anastasiadou, 2009; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016). Jie taip pat yra termostabilūs ir veiktūs nanomolinėmis koncentracijomis. Po transliacijos šie bakterocinai nėra papildomai modifikuojami, išskyrus signalinio peptido atskėlimą ir konservatyvaus N-galinio disulfidinio tiltelio suformavimą (kai kurie poklasio nariai turi papildomą C-galinį disulfidinį tiltelį) (Papagianni ir Anastasiadou, 2009; Lohans ir Vederas, 2012; Ahmad ir kt., 2017). Pediocinai turi du struktūrinius regionus: N-galinį, turintį konservatyvią seką -YGNGV-, ir mažiau konservatyvų C-galinį regioną. N galinė -YGNGV- seka yra atsakinga už IIa klasės bakteriocinams būdingą antilisterinį aktyvumą, o C-galinis regionas yra svarbus ląstelės-taikinio atpažinime ir apsprendžia bakteriocino veikimo spektro specifiškumą (Papagianni ir Anastasiadou, 2009; Snyder ir Worobo, 2014; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016).

Pediocino tipo bakteriocinai prisijungimui prie ląstelės-taikinio naudoja manozės fosfotransferazinės sistemos (Man-PTS) komponentus (Cotter, 2014; Bastos ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017). Bakteriocinui prisijungus prie taikinio sukiamas membranos pralaidumas, kurio pasekoje išsklaidomas protonų gradientas bei prarandamas ATP, dėl ko galiausiai sustoja visa ląstelės biosintezė ir ląstelė žūsta (Lohans ir Vederas, 2012; Bastos ir kt., 2015; Cavera ir kt., 2015). Panašiai veikia ir IId poklasio bakteriocinai: parodyta, kad Man-PTS yra ir kai kurių kitų (ne pediocino tipo) linijinių bakteriocinų, kaip laktokokcinų A ir B, taikiny (Cotter, 2014; Bastos ir kt., 2015). Tuo tarpu, laktokokcinas 972 (IId poklasis) inhibuoja septos susidarymą (O'Shea ir kt., 2012; Cotter, 2014; Cavera ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016).



1.10 paveiksle pateikta apibendrinta žinomų bakteriocinų prisijungimui naudojamų receptorių bei veikimo tipų schema (Cotter, 2014). Pastaraisiais metais nustatyta naujų bakteriocinų prisijungimo receptorių (1.10 pav). Pavyzdžiui, parodyta, kad garvicino ML (IIc) taikinytis yra maltozės ABC pernašos sistema (substrato prijungimo ir proteazinis komponentai), o LsbB bakteriocinas (IIId) receptoriumi prisijungimui naudoja nuo cinko priklausomą metalopeptidazę (Cotter, 2014). Tuo tarpu laktokokinas G ir enterocinas 1071 (IIb) prisijungimui prie ląstelės taikinytis naudoja UppP – membraną perveriantį baltymą, kuris defosforilina undekaprenilo pirofosfatą iki undekaprenilo fosfato (Cotter, 2014).



**1.10 pav.** Apibendrinta bakteriocinų prisijungimo receptorių tipų ir veikimo būdų schema. Man-PTS – manozės fosfotransferazinė sistema, UppP – undekaprenilo pirofosfato fosfatazė (Cotter, 2014).

IIb poklasio (dviejų peptidų) bakteriocinai veikia panašiai kaip pediocino tipo (IIa poklasio) bakteriocinai (Martínez ir kt., 2008; Nissen-Meyer ir kt., 2010, Bastos ir kt., 2015). IIb poklasio bakteriocinai padaro membranas pralaidžias įvairioms smulkioms molekulėms (Bastos ir kt., 2015). Jie sudaryti

iš dviejų skirtingų peptidų, ir optimaliam bakteriocino aktyvumui reikalingi abu peptidai, maždaug vienodais kiekiais (Nissen-Meyer ir kt., 2010; Perez ir kt., 2014; Ahmad ir kt., 2017). Tik esant abiem bakteriocino peptidams, aktyvumas pasireiškia nano- ar net pikomolinėmis koncentracijomis. Tuo tarpu pavieniai peptidai nepasižymi antibakteriniu poveikiu net mikromolinėmis koncentracijomis. Tačiau yra parodyta, kad pavienio peptido aktyvumas gali būti atstatytas, derinant jį ne tik su to paties, bet ir jam stipriai homologiško bakteriocino kitu peptidu (Nissen-Meyer ir kt., 2010).

Visi iki šiol aprašyti dviejų peptidų bakteriocinai turi GxxxG aminorūgščių motyvus. Šių motyvų ypač gausu transmembraninėse spiralėse, kartu su „GxxxG-tipo“ motyvais AxxxA ir SxxxS. Yra žinoma, kad šie motyvai palaiko spiralės-spiralės sąveikas membraniniuose baltymuose. Tai įrodo, kad dviejų peptidų bakteriocinai formuoja membranas perveriančias spiralės-spiralės struktūras. Taip pat yra manoma, kad ši struktūra gali sąveikauti su integruotu membranos baltymu, taip sukeliant jo konformacinius pokyčius ir membranos pralaidumą bei, galiausiai, porų susidarymą (Martínez ir kt., 2008; Nissen-Meyer ir kt., 2010, Bastos ir kt., 2015).

### **1.1.5.5 Galimi atsparumo bakteriocinams išsivystymo mechanizmai**

Literatūroje dažniausiai teigiama, kad bakteriocinams nėra įgyjamas atsparumas (Perez ir kt., 2014), tačiau pastaraisiais metais daugėja duomenų, teigiančių priešingai (Mantovani ir kt., 2011; Cotter ir kt., 2013; Bastos ir kt., 2015). Nors greitas bakteriocinų veikimas bei gebėjimas veikti keliais būdais sumažina atsparumo atsiradimo dažnį, tačiau galimybė išlieka; jau yra aprašyti keli atsparumo nizinui atvejai (Bastos ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016).

Atsparumo bakteriocinams išsivystymo mechanizmai gali būti įgimti arba įgyti. Įgimto atsparumo variantas yra imuniteto mėgdžiojimas, kuomet bakteriocino neprodukuojančios bakterijos turi jo imuniteto genus, dar vadinamus „našlaičiais imuniteto genais“. Šis fenomenas aprašytas kai kurių lantibiotikų ir IIa bakteriocinų atvejais (Bastos ir kt., 2015; Ahmad ir kt., 2017).

Kitas įgimto imuniteto variantas – bakteriociną degraduojančių fermentų buvimas atspariose bakterijose. Yra parodyta, kad kai kurie nizinui atsparūs *Bacillus* sp. kamienai turi nizinazę, kuri geba specifiškai perskelti nizino C-galinį lantionino žiedą (Kaur ir kt., 2011; Bastos ir kt., 2015; Ahmad ir kt., 2017). Šis fermentas taip pat aktyvus prieš subtiliną, bet ne bacitraciną, polimiksiną ar gramicidiną (Bastos ir kt., 2015; Ahmad ir kt., 2017). Taip pat nustatytas nizino degradavimas kai kuriuose jo nesekretuojančiuose *L. lactis* kamienuose dėl membranoje lokalizuoto baltymo – NSR proteazės, pašalinančios nizino C-galines dalis (Mantovani ir kt., 2011; Bastos ir kt., 2015).

Įgytas atsparumas išsivysto dėl spontaninių mutacijų ir dažniausiai yra susijęs su ląstelės voko komponentų pokyčiais (Kaur ir kt., 2011; Bastos ir kt., 2015; Ahmad ir kt., 2017). Galimi įvairūs ląstelės sienelės pokyčiai: nenormali sienelės sintezė ir autolizinių inhibavimas, padidėjęs septos storis, didesnis modifikuotų LTA arba ramnozės kiekis (Kramer ir kt., 2008; Kaur ir kt., 2011; Bastos ir kt., 2015). Taip pat gali keistis citoplazminės membranos fosfolipidų sudėtis. Dėl to membranos tampa kietesnėmis ir bakteriocinams sunkiau į jas įsiterpti. Fosfolipidų ir LTA sudėties pokyčiai gali lemti ir bendro neigiamo krūvio sumažėjimą, kuriuo naudodamiesi katijoniniai bakteriocinai priartėja prie membranų (Heng ir kt., 2007; Todorov, 2009; Kaur ir kt., 2011; Snyder ir Worobo, 2014; Bastos ir kt., 2015; Khalaf ir kt., 2016; Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017).

Atsparumą gali suteikti ir padidinta trikomponenčių ATP membraninių pernašos baltymų, kurie išmeta bakteriociną iš atsparios ląstelės, raiška (Bastos ir kt., 2015).

Ila poklasio bakteriocinams atsparumas gali išsivystyti dėl Man-PTS genų raiškos sustabdymo arba slopinimo, nes šios sistemos baltymai yra daugumos Ila poklasio bakteriocinų pirminis receptorius ir veikimo taikynys, reikalingas porų sudarymo inicijavimui (Kaur ir kt., 2011; Bastos ir kt., 2015).

### 1.1.5.6 Gramteigiamų termofilinių bakterijų bakteriocinai

Literatūroje yra nedaug informacijos apie gramteigiamų termofilinių bakterijų bakteriocinus, tačiau susidomėjimas jais sparčiai auga, nes šie bakteriocinai, be kitų bakteriocinams būdingų savybių, dažnai pasižymi geresniu stabilumu aukštose temperatūrose, nei mezofilinių bakterijų produkuojami bakteriocinai, todėl gali būti pritaikyti karščiu apdorojamų maisto produktų apsaugai nuo patogeninių bakterijų (Pokusaeva ir kt., 2009; Özdemir ir Biyik, 2012; Pranckutė ir kt., 2015).

Kol kas geriausiai ištirti bakteriocinai, kuriuos sekretuoja gramteigiamos termotolerantinės *Streptococcus thermophilus* bakterijos, plačiai naudojamos maisto pramonėje kaip termofilinės, pieno produktus fermentuojančios LAB kultūros (Mathot ir kt., 2003; Gilbreth ir Somkuti, 2005; Fontaine ir kt., 2007). Yra išskirta ir apibūdinta daugiau nei dešimt bakteriocinų, kuriuos sintetina šios bakterijos: termofilinas 1277 (Kabuki ir kt., 2007; 2009), termofilinas 9, termofilinas ST-1, termofilinas T, termofilinas A, termofilinas 110, termofilinas 13, termofilinas 347 bei bakteriocinai, kuriuos sekretuoja *S. thermophilus* kamienai ST580, ST134 ir ST81 (Fontaine ir kt., 2007). Termofilinas 13 buvo pirmasis aptiktas ir aprašytas termotolerantių bakterijų bakteriocinas (Marciset ir kt., 1997). Detalesnis minėtų bakteriocinų savybių bei antibakterinių spektrų aprašymas pateiktas priede Nr.1.

Pastarajame dešimtmetyje ženkliai išaugo susidomėjimas kitų termofilinių bei termotolerantių bakterijų sekretuojamais bakteriociniais, ypač *Bacillus* genties 5-tos grupės termofilinių bakterijų, dabar išskirtų į *Geobacillus* sp. (Nazina ir kt., 2001; Pokusaeva ir kt., 2009). Šios bakterijos yra labai įvairios tiek genotipiškai, tiek fenotipiškai, todėl pasižymi skirtingomis fiziologinėmis sąvybėmis, įvairaus tipo metabolizmu bei gebėjimu formuoti sporas, kas leidžia joms išgyventi neįprastose aplinkose (Abriouel ir kt., 2011; Zeigler, 2014; Urbietta ir kt., 2015). Yra žinoma, kad bakterijų antibakterinio aktyvumo spektro susiformavimui didelę įtaką daro aplinka, kurioje jos aptinkamos, todėl kuo įvairesnė aplinka, tuo įvairesniu antibakteriniu spektru

pasižyminių medžiagų producentų galima aptikti (Abriouel ir kt., 2011; Naz ir Rasool, 2013; O'Connor ir kt., 2015; Pranckutė ir kt., 2015; Kaškonienė ir kt., 2017). Literatūroje dažnai minima, kad *Bacillus* genties bakterijos pasižymi platesniu antibakteriniu spektru, negu LAB, ir gali inhibuoti ne tik gramneigiamų bakterijų, bet ir sporų bei grybų augimą (Abriouel ir kt., 2011; Lee ir Kim, 2011; Mongkolthanaruk, 2012; Salazar-Marroquín ir kt., 2016). Be to, *Bacillus* genties bakterijos yra dažnai sutinkamos maisto pramonėje – tiek kaip fermentuojančios kultūros, tiek kaip maistą gadinančios bakterijos (Abriouel ir kt., 2011; Lee ir Kim, 2011; Sumi ir kt., 2015).

Nors kai kurios *Geobacillus* sp. genties bakterijos (ypatingai *G. stearothermophilus*) yra svarbi maisto pramonės problema, nes sukelia konservuoto maisto bei pieno produktų gedimą (Krilavičiūtė ir Kuisienė, 2013; Rigaux ir kt., 2014; Hussein ir kt., 2015; André ir kt., 2017), tačiau pačios jos nėra toksiškos ar pavojingos sveikatai (Touraki ir kt., 2012; Lücking ir kt., 2013; Gopal ir kt., 2015; Sumi ir kt., 2015). Be to, šios genties bakterijų sekretuojami bakteriocinai dažnai pasižymi ne tik platesniu veikimo spektru, bet ir geresniu stabilumu aukštose temperatūrose bei plačiose pH reikšmėse, negu LAB bakteriocinai (Özdemir ir Biyik, 2012; Cavera ir kt., 2015; Pranckutė ir kt., 2015). Kadangi bakteriocinai dažniausiai pasižymi aktyvumu prieš producentui artimas bakterijų rūšis, šios genties bakterijų sekretuojami bakteriocinai galėtų būti pritaikomi kovai prieš minėtas maistą gadinančias rūšis (Özdemir ir Biyik, 2012).

Šiame darbe tirtas antibakteriniu aktyvumu pasižymintis termofilinis endosporas formuojantis bakterijų kamienas. Didelė dalis termofilinių sporas formuojančių bakterijų yra *Geobacillus* sp. tarpe (Miñana-Galbis ir kt., 2010; Krilavičiūtė ir Kuisienė, 2013), todėl šių bakterijų sekretuojami bakteriocinai aptariami plačiau.

### 1.1.5.7 *Geobacillus* sp. bakteriocinų klasifikacija, genetinė organizacija, struktūra ir veikimo mechanizmai

*Geobacillus* genčiai priskiriamos termofilinės *Bacillus* sp. 5-os grupės bakterijos (Nazina ir kt., 2001; Miñana-Galbis ir kt., 2010). *Bacillus* genties bakterijos yra puikus įvairių antibakterinių medžiagų šaltinis (Abriouel ir kt., 2011; Sumi ir kt., 2015; Zhao ir Kuipers, 2016; Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017). Šios bakterijos, skirtingai nei LAB, produkuoja dviejų tipų baltymines antibakterines medžiagas: bakteriocinus ir antibiotinius peptidus. Nors abiejų tipų medžiagos yra baltyminės prigimties, tačiau pasižymi esminiais skirtumais: 1) bakteriocinai yra sintetinami ribosomose, skirtingai nei antibiotiniai peptidai, kurie yra antriniai metabolitai, sintetinami fermentinių reakcijų būdu; 2) dėl sintezės tipų skirtumo bakteriocinų sekrecija prasideda jau logaritminėje augimo stadijoje, tuo tarpu antibiotinių peptidų – tik augimo pabaigoje, stacionarioje fazėje; 3) bakteriocinai dažniausiai pasižymi siauru aktyvumo spektru prieš producentui artimas rūšis, o antibiotinių peptidų aktyvumo spektras nėra toks savitas ir įprastai platesnis, nei bakteriocinų (Tagg ir kt., 1976; Gillor ir kt., 2008; Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017).

Šiuo metu nėra priimtose *Bacillus* sp. bakteriocinų klasifikacijos, nors šios bakterijos laikomos antru pagal gausą bakteriocinų šaltiniu po LAB. *Bacillus* sp. bakteriocinų genetinė organizacija, struktūra bei veikimo mechanizmai didžiąja dalimi atitinka LAB bakteriocinus, todėl didžioji dalis šios genties bakterijų sekretuojamų bakteriocinų klasifikuojami pagal LAB bakteriocinų klases (Abriouel ir kt., 2011; Zhao ir Kuipers, 2016).

Termofilinės *Geobacillus* sp. bakterijos taip pat sekretuoja bakteriocinus (Pokusaeva ir kt., 2009; Zhao ir Kuipers, 2016), tačiau jų yra aprašyti tik keli (Priedas Nr. 1). Iš šios bakterijų genties aprašytos bakteriocinus sintetinančios rūšys yra: *Geobacillus toebii*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *G. stearothermophilus* ir *G. thermoleovorans*.

*G. stearotherophilus* NU-10 kamienas sekretuoja mažos molekulinės masės termociną. Jo struktūroje yra angliavandenių motyvas. Šis bakteriocinas yra jautrus proteoliziniams fermentams, bet atsparus cheminiams veiksniams ir yra stabilus aukštesnėse temperatūrose. Optimali termocino produkcija stebima vėlyvojoje stacionarioje augimo fazėje, neutralaus pH bei 55-65 °C temperatūros sąlygomis (Yule ir Barridge, 1976).

*G. stearotherophilus* kamienai 17, 30, 31 ir 32A, taip pat sekretuoja bakteriocinus, kurie yra aktyvūs ne tik prieš artimas *Geobacillus* sp. rūšis, bet ir prieš kelias patogenines gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas. Šie bakteriocinai yra jautrūs proteolizinių fermentų poveikiui: proteinazė K visiškai inaktyvuoja 32A, 17 ir 31 kamienų bakteriocinus, tačiau kiti proteoliziniai fermentai (tripsinas,  $\alpha$ -chymotripsinas,  $\beta$ -chymotripsinas, ficinas ir papainas), tik nežymiai sumažina 31 ir 32A kamienų sintetinių antibakterinių peptidų aktyvumą. Bakteriocinai yra termostabilūs ir aktyvūs plačiose pH reikšmėse (pH 4-10). Nustatytos *G. stearotherophilus* sekretuojamų bakteriocinų molekulinės masės: 32A kamieno – 7,2 kDa, 17 kamieno – 6,9 kDa, 30 kamieno – 5,6 kDa ir 31 kamieno – 7,1 kDa (Pokusaeva ir kt., 2009).

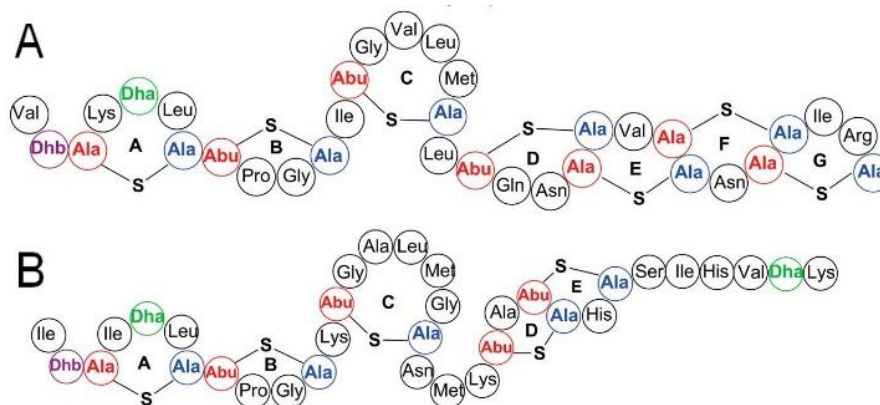
*G. thermoleovorans* S-II kamienas sintetina termoleovoriną S2, o *G. thermoleovorans* kamienas NR-9 – termoleovoriną N9. Šie bakteriocinai inhibuoja visų tirtų, išskyrus pačių producentų, kamienų augimą, tačiau yra neaktyvūs prieš mezofilines *Bacillus* rūšis. Termoleovorinas S2 yra 42 kDa masės bakteriocinas, o termoleovorino N9 molekulinė masė – 36 kDa. Abu termoleovorinus inaktyvuoja proteinazė K ir pepsinas. Abu bakteriocinai yra stabilūs pH intervale 3-10, tačiau termoleovorinas S2 žymiai atsparesnis aukštai temperatūrai nei termoleovorinas N9 (Novotny ir Perry, 1992).

*G. toebii* HBB-218 kamieno bakterijos sekretuoja toibiciną 218. Šis 5,5 kDa bakteriocinas pasižymi antibakteriniu aktyvumu prieš daugumą tirtų gramteigiamų bakterijų, įskaitant termofilines rūšis. Jis taip pat išlieka aktyvus plačiame pH ir temperatūrų intervale. Toibicinas 218 yra inaktyvuojamas

proteazių (pronazė E ir proteinazė K), bei lipazės ir  $\beta$ -glukuronidazės. Tai rodo, kad peptidas gali turėti angliavandenių ir lipidų dalis (Özdemir ir Biyik, 2012).

Buvo parodyta, kad termofilinės *Geobacillus* sp. bakterijos geba sintetinti ir lantibiotikus. *G. thermodenitrificans* NG80-2 genome yra koduojami du bakteriocinai: vienas yra nizino analogas (geobacilinas I), o antrasis priklauso II-ai lantibiotikų klasei (geobacilinas II). Geobacilino I antibakterinis spektras panašus į nizino A, tačiau jis pasižymi geresniu stabilumu, nei nizinas A. Tuo tarpu geobacilinas II neturi jokių žinomų analogų ir pasižymi aktyvumu tik prieš tirtas *Bacillus* rūšis (Garg ir kt., 2012).

Šerdinis GeoAI pirmtako peptidas yra labai panašus į niziną ir subtiliną (1.11 pav.), ypatingai N-galinė peptido dalis, tačiau GeoAI peptide yra dvi papildomos cisteino liekanos. Signalinė prepeptido seka yra sudaryta iš 23 aminorūgščių. Masės spektrometrijos metodais geobacilino I struktūroje nustatytos, 7 dehidratuotos aminorūgštys bei 7 žiedų struktūros (1.11 pav.) – dviem daugiau, nei nizino A struktūroje ir daugiausiai iš visų iki šiol aprašytų lantibiotikų (Garg ir kt., 2012).



**1.11 pav.** Geobacilino I (A) ir nizino A (B) struktūrų palyginimas. Spalvotai pažymėtos modifikuotos aminorūgštys (Garg ir kt., 2012).

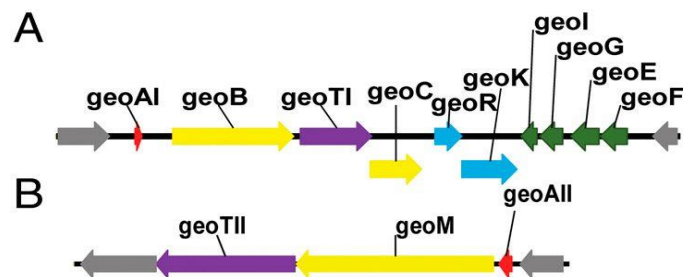
Geobacilino II struktūroje nustatytos 5 modifikuotos aminorūgštys ir 4 žiedų struktūros (1.12 pav.) (Garg ir kt., 2012).





**1.12 pav.** Geobacilino II žiedų topologija, nustatyta tandeminės masių spektroskopijos metodu (Garg ir kt., 2012).

Šalia struktūrinio geobacilino I geno (*geoAI*) nustatyti įprastai lantibiotikų genų grupėse aptinkami genai, koduojantys dehidratazę (*geoB*), ABC pernašos baltymą (*geoT*), ciklazę (*geoC*), dvikomponentę transkripcijos valdymo sistemą (*geoR* ir *geoK*) ir imuniteto baltymus (*geol*, *geoG*, *geoE* ir *geoF*) (1.13 pav.). GeoAII peptido pirmtake aptikta II klasės lantibiotikams būdinga dvigubo glicino skėlimo vieta. Skėlimo efektyvumas padidėja esant GeoTII baltymui, homologiškam ABC pernašos baltymui. GeoTII turi N-galinį cisteino proteazės domeną, reikalingą signalinės sekos pašalinimui (Garg ir kt., 2012).



**1.13 pav.** Geobacilino I (A) ir geobacilino II (B) genų grupės. Prepeptidų genai pavaizduoti raudona, modifikacijos fermentų genai – geltona, valdyme dalyvaujantys genai – mėlyna, imuniteto genai – žalia, pernašos baltymų ir proteazių genai – violetine spalva (Garg ir kt., 2012).

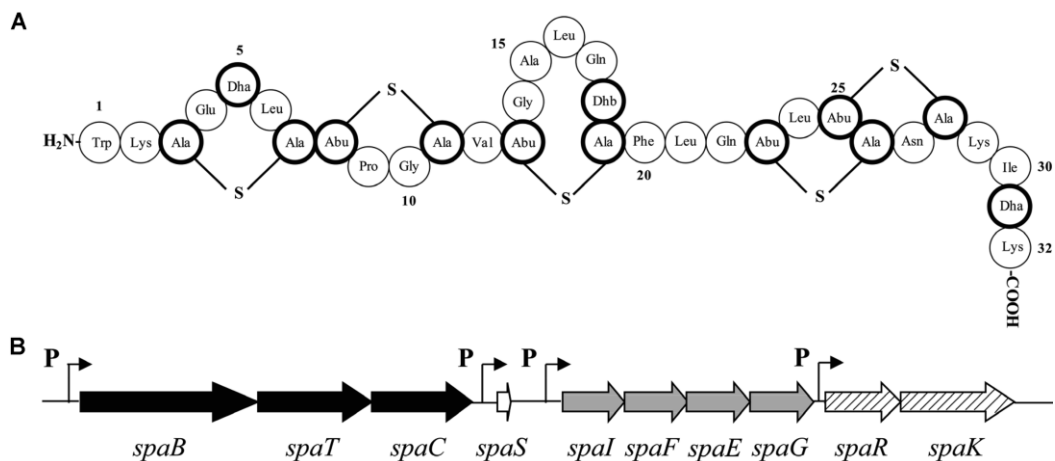
Termofilinis *Bacillus licheniformis* kamienas sekretuoja bacilociną 490, aktyvų prieš daugumą tyrime naudotų *Bacillus* sp. rūšių. Tai 2 kDa masės bakteriocinas, stabilus plačiame pH intervale, bet inaktyvuojamas pronazės E ir proteinazės K. Šis bakteriocinas išlaiko 46,4 % pradinio aktyvumo po 1 val. inkubacijos 100 °C temperatūroje bei išlieka aktyvus po 12 mėnesių saugojimo 4 °C temperatūroje (Martirani ir kt., 2002).

Aprašyti gausėjantys *Geobacillus* sp. ir kitų termofilinių ar termotolerantių bakterijų produkuojamų bakteriocinų tyrimai (Priedas Nr.1)

rodo išaugusį susidomėjimą jų nauda. Pažymėtina, kad pastaraisiais metais net išleistas *G. thermodenitrificans* produkuojamų bakteriocinų pritaikymo patentas (van der Donk ir kt., 2015), o *G. thermoleovorans* kamienui siūlomas probiotinių bakterijų statusas (Mahdhi ir kt., 2011).

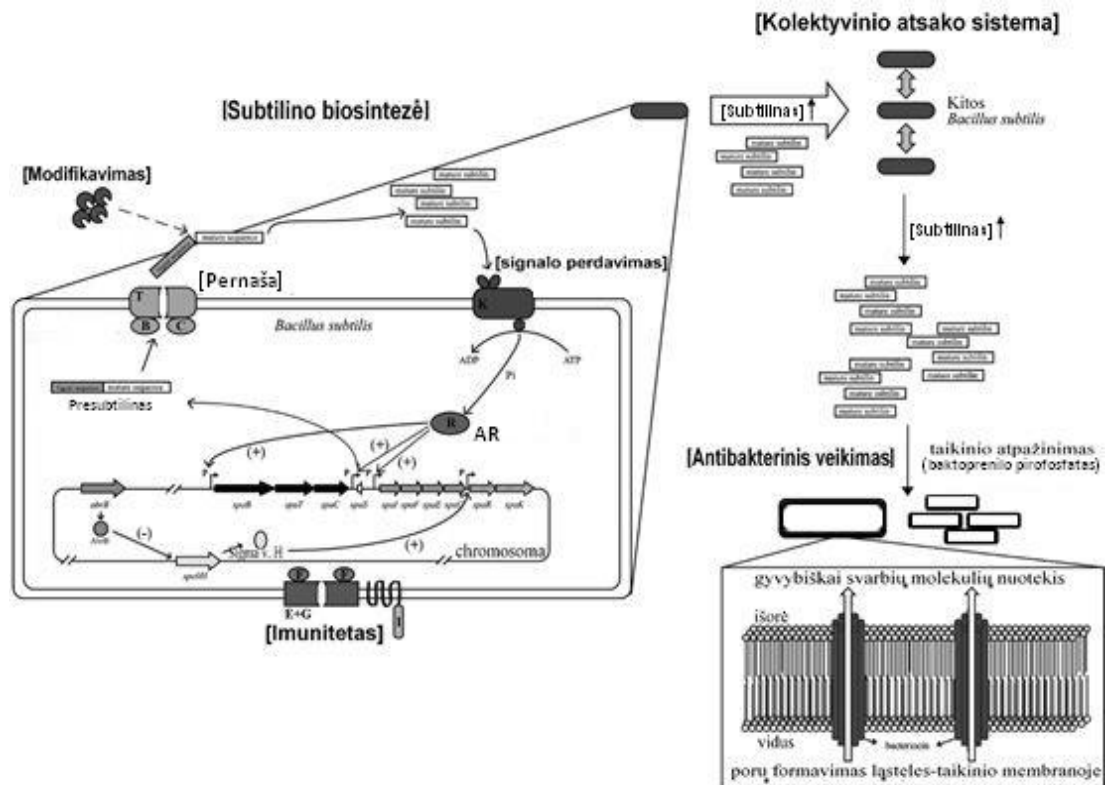
### 1.1.5.8 Endosporas formuojančių bakterijų bakteriocinų sekrecijos valdymas

Subtilinas yra geriausiai ištirtas *Bacillus* genties endosporas formuojančių bakterijų sekretuojamas bakteriocinas (Abriouel ir kt., 2011; Lee ir Kim, 2011). Subtilinas yra lantibiotikas, struktūra labai panašus į niziną. Subrendęs subtilinas sudarytas iš 32 aminorūgščių, kurių 8 yra modifikuotos (1.14 pav.) (Lee ir Kim, 2011; Zhao ir Kuipers, 2016).



**1.14 pav. Subtilino struktūra ir genetinė organizacija. A.** Subtilino struktūros schema. Subrendusio subtilino struktūroje yra viena Dhb, dvi Dha liekanos, bei viena mezo-lantionino (Ala-S-Ala) ir keturios 3-metillantionino (Abu-S-Ala) žiedų struktūros. **B.** Subtilino genų grupės organizacija. Grupė yra sudaryta iš 10 genų – (*spaBTCSIFEGRK*) ir 4 promotorių (lenktos rodyklės ir P), kurie kartu sudaro apie 12 kb. Didžiosiomis raidėmis pažymėti subtilino biosintezėje dalyvaujantys baltymai: B ir C – presubtilino modifikacija; T – pernaša; S – struktūrinis presubtilino genas; I – lipoproteinas (tiesioginė apsauga nuo subtilino); F, E ir G – ABC pernašos baltymai (subtilino išmetimas iš ląstelės); R ir K – dvikomponentė valdymo sistema. Juodos rodyklės žymi potransliacinėms modifikacijoms ir brendimui reikalingus genus; balta rodyklė – struktūrinis genas; pilkos rodyklės – su imunitetu susiję genai; dryžuotos rodyklės – valdymo genai (Lee ir Kim, 2011).

1.15 paveiksle pateikta subtilino biosintezės ir jos valdymo, QS sistemos ir veikimo mechanizmo schema. Subtilino biosintezė taip pat valdoma dvikomponentės sistemos, nuo ląstelių tankio priklausomu būdu (SpaR ir SpaK), kaip ir nizino atveju (Lee ir Kim, 2011). Šie lantibiotikai patys veikia kaip bakteriocinų genų grupės induktoriai (Lubelski ir kt., 2008; Lee ir Kim, 2011; Snyder ir Worobo, 2014).



**1.15 pav.** Subtilino biosintezės, signalo perdavimo, valdymo, QS sistemos veikimo ir antibakterinio veikimo schema. WprA ir Vpr proteolitiškai nuskelia modifikuoto presubtilino signalinę seką. Subrendęs subtilinas indukuoja savo paties sintezę. Jį atpažįsta sensorinė kinazė (SpaK, HK) ir fosforilina atsako reguliatorių (SpaR, AR). Fosforilintas SpaR aktyvina subtilino genų grupės promotorius. Sigma veiksnys H, neigiamai valdomas AbrB, aktyvina *spaR* promotorių. (+) ir (-) nurodo valdymo tipą transkripcijos metu. Subtilinui pasiekus aplinkoje ribinį kiekį, indukuojama subtilino produkcija kitose *B. subtilis* bakterijose (QS sistema). Subtilino antibakterinis aktyvumas pasireiškia jam specifiskai prisijungus prie baktopenilo pirofosfato liekanos ląstelės taikinio membranoje. Tuomet indukuojamas porų formavimas membranoje, sukiantis gyvybiškai svarbių molekulių nuotėkį ir ląstelės žūtį (Lee ir Kim, 2011).

Taip pat, buvo parodyta, kad sigma veiksnys H, valdantis procesus vėlyvoje augimo fazėje bei indukuojantis sporuliaciją, teigiamai veikia *spaR* ir *spaK* genų transkripciją (Abriouel ir kt., 2011; Lee ir Kim, 2011). Aktyvaus eksponentinio augimo metu, kai aplinkoje pakanka mitybinių medžiagų, sigma H veiksnys yra slopinamas AbrB baltymo, dalyvaujančio morfogenezės valdyme. Augimo sąlygoms tapus nepalankioms, AbrB atpalaiduoja ir tokiu būdu aktyvuoja sigma H veiksnį, kuris indukuoja endosporų formavimui reikalingus genus, o tuo pačiu – subtilino sekrecijos genus (Abriouel ir kt., 2011). Šioje stadijoje ląstelė dar nėra pilnai determinuota sporų formavimui ir atsiradus mitybinių medžiagų, vegetatyvinis augimas gali būti atstatytas (González-Pastor, 2010). Tuo tikslu ir indukuojama subtilino sekrecija, nes subtilinas, eliminuodamas kitas bakterijas, sumažina konkurenciją dėl ribotų išteklių bei suteikia papildomų mitybinių medžiagų iš žuvusių ląstelių. Taigi subtilino sintezė yra kontroliuojama dviejų nepriklausomų valdymo sistemų: pačio subtilino sukeltos autoindukcijos (QS) ir sigma veiksnio H indukuojamų procesų (sporuliacijos) valdymo (1.15 pav.) (Abriouel ir kt., 2011; Lee ir Kim, 2011).

Yra parodyta, kad bakteriocinų sekrecija koreliuoja su sporuliacija ir *B. licheniformis* VPS50.2 bei daugumos *B. thuringiensis* bakterijų atvejais (Berić ir kt., 2014; Huang ir kt., 2016). Tačiau sporuliacijos indukcija ne visada teigiamai veikia bakteriocinų raišką – parodyta, kad cereino sekrecija yra inhibuojama, prasidėjus *B. cereus* bakterijų sporuliacijai (Naclerio ir kt., 1993).

#### **1.1.5.9 Gramteigiamų bakterijų bakteriocinų pritaikymas**

Bakteriocinai pasižymi daugeliu pritaikymui biotechnologijoje naudingų savybių. Jie ypatingai perspektyvūs taikymui maisto pramonėje, nes yra netoksiški ir pripažįstami saugiais naudojimui junginiais (Özdemir ir Biyik, 2012; Balciunas ir kt., 2013; Yang ir kt., 2014; Perez ir kt., 2014; Snyder ir Worobo, 2014; O'Connor ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017). Bakteriocinai yra baltyminės prigimties ir lengvai suardomi proteolizinių virškinimo fermentų, todėl neturi didelės įtakos

organizmo mikroflorai, bei jų fragmentai organizme neišlieka pakankamai ilgai, kad kiltų atsparumo išsivystymo grėsmė (Lohans ir Vederas, 2012; Balciunas ir kt., 2013; Yang ir kt., 2014; Perez ir kt., 2014; Maina ir kt., 2017). Bakteriocinai dažniausiai toleruoja aukštas temperatūras bei įvairias pH reikšmes (Lohans ir Vederas, 2012; Özdemir ir Biyik, 2012; Balciunas ir kt., 2013; Perez ir kt., 2014; Farinha ir kt., 2015; O'Connor ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Worapryote ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017; Maina ir kt., 2017). Tačiau svarbiausias pritaikymui yra jų specifinis antibakterinio aktyvumo spektras prieš maistą gadinančias ir patogenines bakterijas bei prieš bakterijų sporas (Gautam ir Sharma, 2009; Mills ir kt., 2011; Perez ir kt., 2014, O'Connor ir kt., 2015; Cavera ir kt., 2015; Sumi ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017).

Gramteigiamos bakterijos yra pagrindinis bakteriocinų, tinkamų pritaikymui biotechnologijoje, šaltinis (Bastos ir kt., 2015). Daugiausia jų produkuoja LAB bei *Bacillus* genties bakterijos (Abriouel ir kt., 2011; Mills ir kt., 2011; Perez ir kt., 2014; Bastos ir kt., 2015; López-Cuellar ir kt., 2016). LAB bakteriocinų platus pritaikymas susijęs su šių bakterijų ilgamečiu naudojimu maisto pramonėje kaip fermentuojančių ir/arba probiotinių kultūrų (Mills ir kt., 2011; Perez ir kt., 2014; Bastos ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; Worapryote ir kt., 2016; Kaškonienė ir kt., 2017). Tačiau pagrindinis LAB bakteriocinų trūkumas yra jų neaktyvumas prieš gramneigiamas bakterijas (Gillor ir kt., 2008; Mills ir kt., 2011; Ahmad ir kt., 2017; Maina ir kt., 2017).

*Bacillus* genties bakterijos laikomos antru pagal gausą bakteriocinų producentų šaltiniu (Abriouel ir kt., 2011; Lim ir kt., 2016; Zimina ir kt., 2016). Nors nemaža dalis šios genties bakterijų priskiriamos maisto patogenams (Abriouel ir kt., 2011; Mongkolthananaruk, 2012), dalis nepatogeninių rūšių taip pat nuo seno naudojamos žmonių ir gyvulių maisto gamyboje (Abriouel ir kt., 2011; Lee ir Kim, 2011, Sumi ir kt., 2015; Zhao ir Kuipers, 2016). Be to, *Bacillus* genties antimikrobiniai peptidai pasižymi platesniu antibakteriniu spektru, negu LAB bakteriocinai – jie geba inhibuoti ir gramneigiamų bakterijų, o kai kurie jų sekretuojami bakteriocinai ir bakteriocinų tipo peptidai (BLIS) –

bakterijų sporų bei grybų augimą (Abriouel ir kt., 2011; Lee ir Kim, 2011; Cavera ir kt., 2015; Sumi ir kt., 2015; Zimina ir kt., 2016).

Šių dienų vartotojai reikalauja, kad maisto produktai būtų naudingi sveikatai, kuo mažiau apdoroti, be cheminių konservantų ir su sumažintu cukraus kiekiu, tačiau išliktų aukštos kokybės, gero skonio, saugūs bei pasižymėtų ilgesniu galiojimo laiku (Gautam ir Sharma, 2009; Abriouel ir kt., 2011; Mills ir kt., 2011; Balciunas ir kt., 2013; Yang ir kt., 2014; Dixit ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; Worapryote ir kt., 2016).

Dėl anksčiau minėto bakteriocinams būdingo aktyvumo ir stabilumo, jų pritaikymas maisto pramonėje leidžia prailginti maisto galiojimo laiką ir sumažinti maistinės kilmės patogenų plitimo per maisto produktus riziką, naudojant mažiau cheminių konservantų bei švelnesnes maisto apdorojimo sąlygas. Tokiu būdu maisto produktuose išsaugoma daugiau vitaminų, maistinių medžiagų ir išlaikomos maisto organoleptinės savybės (Gautam ir Sharma, 2009; Mills ir kt., 2011; Balciunas ir kt., 2013; O'Connor ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Worapryote ir kt., 2016; Maina ir kt., 2017). Dėl to nenuostabu, kad sparčiai gausėja bakteriocinų taikymo maisto pramonėje patentų (López-Cuellar ir kt., 2016).

Iki šiol nei vienas bakteriocinas nėra pasiekęs tokio pritaikymo pramonėje lygmens, kaip nizinas (Maina ir kt., 2017). Šiuo metu jis naudojamas daugiau nei 50-yje šalių (Rezapour ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; López-Cuellar ir kt., 2016; Salazar-Marroquín ir kt., 2016). Kol kas nizinas ir pediocinas PA-1 yra vieninteliai bakteriocinai, patvirtinti naudojimui kaip komerciniai maisto priedai (Mills ir kt., 2011; Arques ir kt., 2015; O'Connor ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016), bet tokių bakteriocinų gretos plečiasi (1.3 lentelė) (López-Cuellar ir kt., 2016).

Maisto pramonėje bakteriocinai gali būti taikomi dviem būdais: *in situ* (naudojant pačias bakteriocinus produkuojančias kultūras), arba *ex situ* (naudojant grynus ar dalinai išgrynintus bakteriocinus) (Khan ir kt., 2010; Mills ir kt., 2011; Lohans ir Vederas, 2012; Balciunas ir kt., 2013; Alvarez-Sieiro ir

kt., 2016; López-Cuellar ir kt., 2016; Worapryote ir kt., 2016; Maina ir kt., 2017). Tačiau *ex situ* būdu gali būti prarandama dalis bakteriocinų aktyvumo dėl difuzijos maiste ar sąveikos su kitais maisto produkto komponentais, bei netinkamos bakteriocino aktyvumui pH aplinkos (LAB bakteriocinai dažniausiai stabilesni rūgštiniame pH), todėl ieškoma efektyvesnių bakteriocinų įvedimo metodų arba naujų, stabilesnių bakteriocinų (Khan ir kt., 2010; Mills ir kt., 2011; Balciunas ir kt., 2013; Naz ir Rasool, 2013; Arques ir kt., 2015; O'Connor ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; Kaškonienė ir kt., 2017).

**1.3 lentelė.** Komerciniam naudojimui gaminami bakteriocinų preparatai (López-Cuellar ir kt., 2016).

| Bakteriocinas            | Komercinis produktas                         | Pritaikymas  | Mikroorganizmai taikiniai   | Gamintojas   |
|--------------------------|--|--|---|--|
| Nizinas A                | Nisaplin <sup>®</sup>                        | Pieno produktai, kulinarija, mėsa, kepiniai ir gėrimai | <i>Listeria</i> spp.,<br><i>Bacillus</i> spp.,<br><i>Clostridium</i> spp.   | Danisco,<br>Copenhagen,<br>Denmark                           |
| Nizinas                  | Chrisin <sup>®</sup>                         | Mėsa, dešrelės ir sūriai                               | <i>Clostridium botulinum</i> ,<br><i>Listeria monocytogenes</i>             | Chr. Hansen,<br>Hørsholm,<br>Denmark                         |
| Nizinas A,<br>Nizinas Z  | Nisin A <sup>®</sup><br>Nisin Z <sup>®</sup> | Pieno produktai, kepiniai, gėrimai, desertai, mėsa     | <i>Listeria</i> spp.,<br><i>Clostridium</i> spp.,<br><i>Bacillus cereus</i> | Handary,<br>Brussels,<br>Belgium                             |
| Mikocinas                | Micocin <sup>® II</sup>                      | Mėsos produktai  | <i>L. monocytogenes</i>   | CanBiocin,<br>Edmonton,<br>Canada                            |
| Pediocinas               | ALTA <sup>®</sup><br>2351; 2341              | Mėsos produktai  | <i>L. monocytogenes</i>   | Kerry<br>Bioscience,<br>Carrigaline, Co.<br>Cork, Ireland    |
| Pediocinas               | Fargo 23 <sup>®</sup>                        | Mėsos produktai  | <i>L. monocytogenes</i>   | Quest<br>International,<br>B.V., Naarden,<br>The Netherlands |
| Pediocinas,<br>sakacinas | Bactoferm<br>FLC <sup>®</sup>                | Mėsos produktai  | <i>L. monocytogenes</i>   | Chr. Hansen,<br>Hørsholm,<br>Denmark                         |

Pastaruoju metu populiarėja nanotechnologijų taikymas, padedantis palaikyti bakteriocinų stabilumą ir apsaugoti juos nuo virškinimo fermentų,

pavyzdžiui, įterpiant į liposomas (Mills ir kt., 2011; Balciunas ir kt., 2013; Blanco-Padilla ir kt., 2014; Arques ir kt., 2015; López-Cuellar ir kt., 2016) ar formuojant nanodaleles (Krivorotova ir kt., 2016; Khan ir Oh, 2016). Bakteriocinai gali būti imobilizuojami ir taip panaudojami bioaktyviose maisto produktų pakuotėse (Gálvez ir kt., 2007; Mills ir kt., 2011; Perez ir kt., 2014; Arques ir kt., 2015; Chopra ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; Damania ir kt., 2016; López-Cuellar ir kt., 2016; Worapryote ir kt., 2016). Jie taip pat gali būti kombinuojami su kitais antibakteriniais veiksniais, pavyzdžiui, aukštu slėgiu (HPP), temperatūra, cheminiais veiksniais (Gautam ir Sharma, 2009; Mills ir kt., 2011; Guerra ir kt., 2013; Perez ir kt., 2014; Arques ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; Khan ir Oh, 2016; Worapryote ir kt., 2016) ar įprastais antibiotikais (Gálvez ir kt., 2007; Balciunas ir kt., 2013; Cavera ir kt., 2015; López-Cuellar ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017). Tai leidžia ne tik padidinti antibakterinį efektyvumą (Cavera ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017), bet ir sumažinti cheminių konservantų kiekius, fizinių veiksnių intensyvumą, bei išsaugoti maisto kokybę (Gautam ir Sharma, 2009; Mills ir kt., 2011; Arques ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Khan ir Oh, 2016; Worapryote ir kt., 2016; Kaškonienė ir kt., 2017; Maina ir kt., 2017). Perspektyvios ir kelių bakteriocinų ar jų producentų kombinacijos, galinčios pasižymėti sinergistiniu poveikiu (Gautam ir Sharma, 2009; Mills ir kt., 2011; Cavera ir kt., 2015; Arques ir kt., 2015; Ahmad ir kt., 2017).

Viena didžiausių XXI-ojo amžiaus problemų sveikatos apsaugos srityje yra dėl neadekvataus antibiotikų vartojimo išaugusi jiems atsparių bakterijų atsiradimo ir plitimo problema (Arques ir kt., 2015; Cavera ir kt., 2015; Sumi ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Khalaf ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017; Maina ir kt., 2017). Kai kurios patogeninių bakterijų rūšys jau yra atsparios visiems naudojamiems antibiotikams bei jų variantams, o dėl atsparių patogenų sukiamų susirgimų kiekvienais metais miršta apie 700 000 žmonių (Towle ir Vederas, 2017). Todėl intensyviai ieškoma naujų antibakteriniu poveikiu pasižyminčių medžiagų (Naz ir Rasool, 2013; Cavera ir kt., 2015; O'Connor ir



kt., 2015; Sumi ir kt., 2015; Khalaf ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017; Loh ir kt., 2017; Kaškonienė ir kt., 2017).

Bakteriocinai laikomi puikia antibiotikų alternatyva patogeninių bakterijų kontrolei (O'Shea ir kt., 2012; Yang ir kt., 2014; Cavera ir kt., 2015; O'Connor ir kt., 2015; Sumi ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016; Kaškonienė ir kt., 2017). Sąlyginai siauras ir specifinis bakteriocinų aktyvumo spektras yra naudingas, nes mažiau žalos padaroma natūraliai mikroflorai, lyginant su įprastais antibiotikais (Lohans ir Vederas, 2012; O'Shea ir kt., 2012; Cavera ir kt., 2015; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016). Be to, pagrindinis bakteriocinų veikimo taikinys, skirtingai nei įprastinių antibiotikų, yra citoplazminė membrana, todėl mažesnė kryžminio atsparumo išsivystymo tikimybė (Balciunas ir kt., 2013; Perez ir kt., 2014; Sumi ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017). Tai, kad jie yra pirminiai metabolitai (palyginti paprastas biosintezės mechanizmas) ir jų genai yra organizuoti į grupes, lokalizuotas judriuose genetiniuose elementuose (kaip plazmidės ar konjugaciniai transpozonai), atveria galimybes jų inžinerijai, o tai leistų moduluoti ne tik jų aktyvumo lygį, bet ir antibakterinį spektrą (Lubelski ir kt., 2008; Mills ir kt., 2011; Lohans ir Vederas, 2012; Perez ir kt., 2014; Cavera ir kt., 2015; O'Connor ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017; Maina ir kt., 2017), bei lengviau kovoti su galimu atsparumo išsivystymu (Bastos ir kt., 2015). Be to, kaip jau minėta anksčiau, kai kurie bakteriocinai pasižymi antifungicidiniu aktyvumu ir yra efektyvūs prieš sporas (Cavera ir kt., 2015; Egan ir kt., 2016). Šiais bei kitais aspektais bakteriocinai yra pranašesni už įprastinius antibiotikus (1.4 lentelė), todėl sulaukia vis daugiau dėmesio medicinos ir veterinarijos srityse (Balciunas ir kt., 2013; Yang ir kt., 2014; Cavera ir kt., 2015; Ahmad ir kt., 2017; Maina ir kt., 2017).

Gramteigiamų bakterijų bakteriocinai ypatingai perspektyvūs medicininiam pritaikymui dėl jų aktyvumo prieš antibiotikams atsparias bakterijų rūšis (Abriouel ir kt., 2011; O'Shea ir kt., 2012; Balciunas ir kt., 2013; Perez ir kt., 2014; Bastos ir kt., 2015; Cavera ir kt., 2015; Ahmad ir kt., 2017).

Bakteriocinai gali būti taikomi įvairių ligų gydymui ir/arba prevencijai: uždegimų, bakterinių odos bei sisteminių infekcijų, spuoguotumo, bakterinės kilmės virškinamojo trakto ligų, enterokolito, karieso (Cotter ir kt., 2005; Yang ir kt., 2014; Arques ir kt., 2015; López-Cuellar ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017).

**1.4 lentelė.** Bakteriocinų ir įprastų antibiotikų palyginimas (Perez ir kt., 2014; Bastos ir kt., 2015; Cavera ir kt., 2015; Munita ir Arias, 2016).

| <b>Charakteristika</b>                   | <b>Bakteriocinai</b>  | <b>Antibiotikai</b>   |
|--|---|---|
| Pritaikymas                              | Maisto pramonė/ medicina  | Medicina  |
| Prigimtis                                | Pirminiai metabolitai   | Antriniai metabolitai   |
| Aktyvumo spektras                        | Dažniausiai siauras, specifinis   | Platus  |
| Aktyvumo intensyvumas                    | Aktyvūs nano-mikro moliūmės koncentracijomis  | Aktyvūs mikro-mili moliūmės koncentracijomis  |
| Jautrumas proteoliziniams fermentams     | Aukštas   | Vidutinis arba jokie  |
| Termostabilumas                          | Aukštas   | Žemas   |
| pH aktyvumo ribos                        | Plačios   | Siauros   |
| Spalva/skonis/kvapais                    | Nebūdinga   | Būdinga   |
| Bioinžinerijos taikymo galimybės         | Taip  | Ne  |
| Pagrindiniai veikimo mechanizmai         | Porų formavimas membranoje, sienelės (PG) sintezės inhibavimas  | Baltymų sintezės, DNR replikacijos ir transliacijos inhibavimas; ląstelės sienelės/PG arba membranos suardymas                  |
| Galimi atsparumo išsivystymo mechanizmai | Ląstelės voko komponentų pokyčiai, bakteriocinus degraduojantys fermentai ar pernašos sistemos, išmetančios bakteriocinus iš ląstelių | Genetiškai pernešami elementai, atsakingi už: antibiotiko inaktyvavimą, išmetimą iš ląstelės, antibiotiko taikinio modifikavimą |
| Toksiškumas eukariotinėms ląstelėms      | Dažniausiai ne  | Dažniausiai taip  |

Bakteriocinai potencialiai gali būti pritaikomi ir priešvėžinėje terapijoje (O'Shea ir kt., 2012; Yang ir kt., 2014; Sumi ir kt., 2015), dėl jų membranos baltymų ir DNR sintezės inhibavimo, sukeliančio apoptozę ar citotoksiškumą

vėžinėse ląstelėse. Buvo tirtas nizino aktyvumas prieš galvos ir kaklo suragėjusių ląstelių karcinomą ir gauti teigiami rezultatai, tiek *in vitro*, tiek *in vivo* eksperimentuose (López-Cuellar ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017). Taip pat parodyta, kad bakteriocinai gali būti aktyvūs ir prieš virusus (Lohans ir Vederas, 2012; Ahmad ir kt., 2017), pavyzdžiui, prieš HSV-1 (*Herpes simplex*) virusą (Todorov ir kt., 2010).

Tuo tarpu veterinarijoje gramteigiamų bakterijų bakteriocinai plačiausiai taikomi galvijų mastito gydymui bei prevencijai (Cotter ir kt., 2005; Anisimov ir Amoako, 2006; Abriouel ir kt., 2011; Sánchez-Hidalgo ir kt., 2011; Mantovani ir kt., 2011; Perez ir kt., 2014; Bastos ir kt., 2015; Ahmad ir kt., 2017).

Bakteriocinai taip pat naudojami augalų apsaugai kaip aktyvūs komercinių biopesticidų priedai (Montesinos, 2007). *Bacillus* sp. bakteriocinai taikomi kovai prieš augalų ligas sukeliančius patogenus (Abriouel ir kt., 2011; Mongkolthananaruk, 2012; Salazar-Marroquín ir kt., 2016). Gramteigiamų bakterijų bakteriocinai taip pat gali būti pritaikomi kaip kontracetinės priemonės (Abriouel ir kt., 2011; López-Cuellar ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017) bei higienos, burnos ir odos priežiūros priemonėse (Mills ir kt., 2011; López-Cuellar ir kt., 2016; Ahmad ir kt., 2017).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Darbe naudoti mikroorganizmai

Darbe tirti LAB kamienai, išskirti iš jogurtų (A ir B izoliatai) bei tipiniai kamienai, įsigyti iš DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) mikroorganizmų kolekcijos (2.1 lentelė).

2.1 lentelė. Darbe naudoti tipiniai LAB kamienai.

| Kamieno pavadinimas                                       | DSM numeris | Sutrumpintas žymėjimas darbe |
|---|-------------|------------------------------|
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>                          | 20079       | LA                           |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | 20081       | LD                           |
| <i>Lactobacillus curvatus</i>                             | 20010       | LC                           |
| <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>            | 20017       | LS                           |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>            | 20481       | LL                           |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>            | 20729       | LL2                          |

2.2 lentelė. Antibakterinio aktyvumo spektro bei poveikio eukariotinėms ląstelėms įvertinimui naudoti bakterijų kamienai ir mielių rūšys.

| Naudoti patogeninių bakterijų kamienai |  |
|--|--|
| Gram+                                  | <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778<br><i>Bacillus cereus</i> DSM 12001<br><i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633<br><i>Clostridium perfringens</i><br><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212<br><i>Enterococcus faecium</i> 402-3/03<br><i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434<br><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117<br><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923<br><i>Staphylococcus aureus</i> MRSA<br><i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615<br><i>Streptococcus pyogenes</i> MPK 2331 |
| Gram-                                  | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883<br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853<br><i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076<br><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028  |
| Naudotos mielių rūšys                  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br><i>Candida albicans</i><br><i>Candida lusitania</i><br><i>Candida guilliermondii</i>  |

Termofilinis 118 kamienas atrinktas iš Vilniaus universiteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kolekcijos. Šio kamieno antibakterinio aktyvumo tyrimuose jautriu kamieniu naudotas *Geobacillus stearothermophilus* NUB36187, įsigytas iš *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC, Nr.: 9A11) (Zeigler, 2001).

## 2.2 Naudotos bakterijų kultivavimo terpės

2.3 lentelėje pateiktos visų šiame darbe naudotų bakterijų kultivavimo terpių sudėtys. mM9 terpės paruošimui reikalingų koncentruotų tirpalų sudėtys aprašytos 2.4 lentelėje.

**2.3 lentelė.** Darbe naudotų bakterijų kultivavimo terpių sudėtis.

| <b>Terpė</b> | <b>Pilnas terpės pavadinimas (šaltinis)<br/>Komponentai</b>                                     | <b>Kiekis (L<sup>-1</sup>)</b> |
|--------------|---|--------------------------------|
| <b>MRSb</b>  | <b>deMan-Rogosa-Sharpe (bazinė)</b> (Saminathan ir kt., 2011)                                   |                                |
|              | Peptonas  | 10 g                           |
|              | Mielių ekstraktas   | 5 g                            |
|              | Na acetatas   | 5 g                            |
|              | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O  | 2 g                            |
|              | (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 2 g                            |
|              | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O  | 0,2 g                          |
|              | MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O  | 0,054 g                        |
| <b>TY</b>    | <b>Nr. 92</b> (DSMZ culture medium list)  |                                |
|              | TSB (Tryptone Soya Broth)   | 30 g                           |
|              | Mielių ekstraktas   | 3 g                            |
| <b>MB</b>    | <b>Mitybinis buljonas</b> (Kaunietis, 2012)   |                                |
|              | Peptonas  | 10 g                           |
|              | Mėsos ekstraktas  | 5 g                            |
|              | NaCl  | 5 g                            |
| <b>mM9</b>   | <b>Modifikuota M9</b> (Pokusaeva ir kt., 2009)  |                                |
|              | Druskų tirpalas (5x)  | 200 ml                         |
|              | Vitaminų tirpalas (1000x)   | 1 ml                           |
|              | Aminorūgščių priedas (1 000x)   | 100 ml                         |
|              | 1 M MgSO <sub>4</sub>   | 2 ml                           |
|              | 1 M CaCl <sub>2</sub>   | 0,1 ml                         |
|              | D-gliukozė  | 2,5 g                          |
|              | Tris-HCl (pH 7,5; 50 mM)  | Iki 1 L                        |
| <b>minYE</b> | Mielių ekstraktas   | 2 g                            |
|              | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  | 5,24 g                         |
|              | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   | 2,77 g                         |
|              | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O  | 0,25 g                         |
|              | NH <sub>4</sub> Cl  | 2,0 g                          |
|              | D+gliukozė  | 2,5 g                          |

2.4 lentelė. Koncentruoti tirpalai, naudojami mM9 terpės ruošimui.

| <b>Tirpalas</b>  | <b>Komponentai</b>                | <b>Kiekis (L<sup>-1</sup>)</b> |
|--|-----------------------------------|--------------------------------|
| <b>Aminorūgščių priedas<br/>(1 000x)</b><br>(Leejeerajumnean ir kt., 2000) | L-alaninas·HCl                    | 89 mg                          |
|  | L-argininas·HCl                   | 316 mg                         |
|  | L-asparaginas·H <sub>2</sub> O    | 150 mg                         |
|  | L-asparto rūgštis                 | 133 mg                         |
|  | L-cisteinas                       | 60 mg                          |
|  | L-glutamo rūgštis                 | 147 mg                         |
|  | glicinas                          | 75 mg                          |
|  | L-histidinas·HCl·H <sub>2</sub> O | 105 mg                         |
|  | L-izoleucine                      | 131,5 mg                       |
|  | L-leucinas                        | 131 mg                         |
|  | L-lizinas·HCl                     | 181,5 mg                       |
|  | L-metioninas                      | 38 mg                          |
|  | L- fenilalaninas                  | 82,5 mg                        |
|  | L-prolinas                        | 115 mg                         |
|  | L-serinas                         | 105 mg                         |
|  | L- treoninas                      | 119 mg                         |
|  | L-triptofanas                     | 25,5 mg                        |
| L-tirozinas  | 90 mg                             |                                |
| L-valinas  | 117 mg                            |                                |
| <b>Vitaminų tirpalas (1000x)</b>   | D-biotinas                        | 10 mg                          |
|  | <i>myo</i> -inozitolis            | 100 mg                         |
|  | niacinas                          | 100 mg                         |
|  | piridoksinas                      | 100 mg                         |
|  | riboflavinas                      | 100 mg                         |
|  | tiaminas                          | 100 mg                         |
| <b>Druskų tirpalas (5x)</b>  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   | 15 g                           |
|  | NaCl                              | 2,5 g                          |
|  | NH <sub>4</sub> Cl                | 5 g                            |

### 2.3 Kultivavimo sąlygos

*Lactobacillus* sp. bakterijų kultivavimui (tiek išskirtų iš jogurtų, tiek tipinių kamienų atvejais) naudota LAB selektyvi MRS terpė, o *Lactococcus* sp. genties bakterijų kultivavimui – TY terpė (2.3 lentelė). Rutininiams persėjimams, biomasės užauginimui bei antibakterinio aktyvumo nustatymui naudotos komercinės terpės (Merck). *Lactobacillus* sp. bakterijos buvo kultivuojamos aerobinėmis sąlygomis, išskyrus LA ir LD kamienus (2.1 lentelė), kurie buvo kultivuojami anaerobinėmis sąlygomis, naudojant „Anaerocult A“ deguonies absorbentą (Merck), plastikinius maišelius su spaustukais arba plastikines sandarias cilindrinės talpas (Merck). Pastarieji kamienai kultivuoti

37 °C temperatūroje, termostate. Tipiniai LS ir LC kamienai (2.1 lentelė) auginti aerobinėmis sąlygomis, 30 °C temperatūroje, termostate arba purtyklėje, taikant 150 aps./min. aeraciją. Išskirti A ir B grupių kamienai auginti be papildomos aeracijos (fakultatyviniai anaerobai), termostate, 30 °C temperatūroje. *Lactococcus* sp. kamienai kultivuoti TSB arba TY terpėse (2.3 lentelė), 37 °C temperatūroje, termostate arba purtyklėje, taikant 150 aps./min. aeraciją.

Termofilinių kamienų kultivavimui naudotos terpės: rutininiams persėjimams, biomasės užauginimui bei antibakterinio aktyvumo nustatymui – MB terpė; augimo, antibakterinio aktyvumo bei skirtingų anglies šaltinių įtakos tyrimams – mineralinė mM9 arba minimali minYE terpės (2.3 lentelė). Priklausomai nuo vykdyto eksperimento, į paruoštą sterilią terpę buvo pridedama iš anksto paruošto ir per 0,22 µm filtrą (BioRad) sterilizuoto MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O druskos tirpalo (1000x). Mangano druskos priedas ruoštas kaip aprašyta straipsnyje (Kaunietis, 2012). Kamienai auginti aerobinėmis sąlygomis, 55 °C temperatūroje, termostate arba purtyklėje, taikant 180 aps./min. aeraciją.

Mieliagrybiai (2.2 lentelė) auginti naudojant YPD terpę: 20 g/l gliukozės, 20 g/l peptono, 10 g/l mielių ekstrakto (Merck) (Digaitiene ir kt., 2012), 30 °C temperatūroje, aerobinėmis sąlygomis. Antibakterinio aktyvumo prieš patogenines bakterijas (2.2 lentelė) tyrimai atlikti Infekcinių ligų ir patogeninės mikrobiologijos institute ir Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje (NVSPL).

## **2.4 Darbe naudoti oligosacharidai (OS)**

Kultivavimui su skirtingais anglies šaltiniais terpės gamintos iš atskirų komponentų (MRSb arba TY terpės, 2.3 lentelė), vietoje gliukozės į paruoštą sterilią terpę pridedant atskirai paruošto ir per 0,22 µm filtrą (BioRad) sterilizuoto atitinkamo anglies šaltinio tirpalo (10 %): gliukozės (G), palatinozės hidrato (TCI America), inulino (Alfa Aesar) arba α-ciklodekstrino (CD) (Merck). OS tirpalai ruošti distiliuotame vandenyje. Galutinė kiekvieno anglies šaltinio koncentracija terpėje: LAB tyrimuose – 1 %, termofilinio 118 kamieno tyrimuose – 0,25 %.

## 2.5 Darbe naudoti pradmenys

2.5 lentelėje pateikti visi šiame darbe naudoti PGR pradmenys, susintetinti Metabion laboratorijoje.

**2.5 lentelė.** Šiame darbe naudoti PGR pradmenys. NT – netaikoma. Tm – pradmens prilydymui taikyta temperatūra.

| Pradmuo            | Seka   | Tm, °C       | Tikėtinas produktas (dydis, bp)                        | Šaltinis                    |
|--------------------|--|--------------|--|-----------------------------|
| 1BACTP             | F: 5'- TGA AGA TGT ATT TGG GTG CGT -3'<br>R: 5'- CAG GAG TTG CTG GTG TTG TT -3'                        | 57<br>58     | Lacticinas<br>3147 (257)                               |                             |
| 2BACTP             | F: 5'- GCG CCT GCA GGG CTT TCT TTC GAT CAC GAT-3'<br>R: 5'- GCG CGT CGA CGG TTC GAT AGT TCG TGC TT -3' | 75<br>75     | Pediocinas<br>PA (541)                                 | Digaitiene ir kt. (2012)    |
| 3BACTP             | F: 5'- CTA TGT ACA CCC GGT TGT AA -3'<br>R: 5'- TTT ATG AAC TAG GCG AAT CA -3'                         | 56<br>52     | Nizinas<br>(590)                                       |                             |
| 4BACTP             | F: 5'- ACA GGT GGA AAA TAT TAT GGT A -3'<br>R: 5'- TTT TGC TTA TTA TTT ATT CCA G -3'                   | 55<br>51     | Sakacinas P<br>(150)                                   |                             |
| m2405              | F: 5'- CAA CAT ATG GCC AAG CGA CGC -3'<br>R: 5'- CGA GAA TTC CGC TAC TAT TTC CC -3'                    | 63<br>63     |  |                             |
| m2406              | F: 5'-TCA CAT ATG AAA AAG AAA TTT GAT TGT GCT-3'<br>R: 5'- TAA GAA TTC GCC CAC TTC TTT AC -3'          | 63<br>59     | Hipotetinis  |                             |
| m2163              | F: 5'- AAA CAT ATG AAA CGA AAG TGC CCC AAA AC-3'<br>R: 5'- TTT GAA TTC GCG ACG ATC TCT TGA ACA TTC-3'  | 66<br>68     | <i>L. paracasei</i><br>ATCC 334<br>baltymas<br>(≤ 300) | Kuo ir kt. (2013)           |
| m2386              | F: 5'- ATT CAT ATG GAC AGC ATC CGT GAT GTT TC -3'<br>R: 5'- TTT GAA TTC GCT GCC AGA ACA AGT TGG TT -3' | 68<br>68     |  |                             |
| m2393              | F: 5'-GCT CAT ATG GAA AAC GGT GGT TTA TGG TCA-3'<br>R: 5'- AAA GAA TTC GGA ATC CCA GAA TGG CAG C -3'   | 69<br>69     |  |                             |
| BACTA164<br>-NIZLL | F: 5'- ATG AGT ACA AAG ATT TTA ACT TGG ATT GGT-3'<br>R: 5'- ATA AAC GAA TGC ACT TAT GAT GTT ACT GT -3' | 64<br>63     | Nizinas  | Swetwivathana ir kt. (2009) |
| BACTWNC<br>-NIZLL  | F: 5'- CCG GAA TTC ATA AGG AGG CAC TCA AAA TG -3'<br>R: 5'- CGG GGT ACC TAC TAT CCT TTG ATT TGG TT -3' | 69<br>69     | Nizinas A  | Millette ir kt. (2008)      |
| LacS               | F: 5'- ATG GAA TTR TTR CCR ACK GCY GCY GTY YTR TA-3'<br>R: 5'- ATG RTG TTT RGC NSW RTA YTT -3'         | 72<br>54     | Lacticinas<br>S  | Rodríguez ir kt. (1995)     |
| AcdT               | F: 5'- ATG ATT TCA TCT CAT CAA AAA ACG -3'<br>R: 5'- CTA AAAACC GTC AGT ATA ACG AAG GC -3'             | 57<br>65     | Acidocinas<br>8120 (141)                               |                             |
| CurA               | F: 5'- GCG CAG GAA TGA TTT CTG TAG GC -3'<br>R: 5'- GCT CTG CCT TCA AAT TAG ACC CTC -3'                | 65<br>65     | Kurvacinas<br>A (179)                                  |                             |
| CurA2              | F: 5'- GCG CAG GAA TGA TTT CTG TAG GC -3'<br>R: 5'- TGG GAT CAT TTG GCG TCT GC -3'                     | 65<br>60     | Kurvacinas<br>A ir imun.<br>genas (837)                | Šis darbas                  |
| SakA               | F: 5'- GCG CAG AGG AGA TTC TTA GTT ATG -3'<br>R: 5'- CAT TCC AGC TAA ACC ACT AGC CC -3'                | 64<br>65     | Sakacinas A<br>(197)                                   |                             |
| SakP               | F: 5'- GCA GAA GTA ACA GCA ATT ACA GGT GG -3'<br>R: 5'- CGC TAG CGT ATT CTT AGA ATA GTG TGC -3'        | 66<br>67     | Sakacinas P<br>(622)                                   |                             |
| BOXA1R             | R: 5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'   | 52           | NT   | Versalovic ir kt. (1994)    |
| 27F<br>1495R       | F: 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'<br>R: 5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'                            | 50.5<br>47.5 | 16S rDNR   | Nuoroda*                    |

\* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10079532>



LAB sekretuojamų antibakterinių medžiagų identifikavimui naudoti PGR pradmenys, atrinkti iš mokslinių publikacijų arba sukonstruoti *in silico*, pagal žinomų bakteriocinų genų sekas (NCBI, GenBank), naudojant Lasergene v7.1 (DNASTAR, JAV) programinį paketą (2.5 lentelė).

## **2.6 Bakterijų genominės DNR išskyrimas**

Genominės DNR skyrimui termofilinis 118 kamienas augintas 5 ml MB terpėje, 55 °C temperatūroje, aeruojant, iki eksponentinės fazės vidurio (apie 5 val.) (Sambrook ir Russell, 2001).

Genominės DNR išskyrimui LAB buvo kultivuojamos skystoje MRS arba TSB terpėje (5 ml tūryje) iki eksponentinės augimo fazės vidurio. Ląstelių biomasė surinkta centrifuguojant. Kamienų genomine DNR išskirta, naudojant GeneJet DNA Extraction Kit<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific).

## **2.7 Polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) eksperimentai**

PGR reakcijų vykdomo eiga ir sąlygos:

- 1) Pirminė matricinės DNR denatūracija – 95 °C 1–5 min.;
- 2) Denatūracija – 95 °C, 1 min.;
- 3) Pradmenų prilydymas – 48-65 °C, priklausomai nuo naudotų pradmenų (2.5 lentelė), 2 min.;
- 4) DNR sintezė – 72 °C, 4 min.;
- 5) Galutinė polimerizacija – 72 °C, 7 min.

2-4 etapai kartojami 29 ar daugiau kartų (priklausomai nuo vykdomo eksperimento tikslo).

Gautų produktų skaičius, dydis ir kiekis įvertinami elektroforezės agarozės gelyje metodu (2.8). PGR produktų valymui bei išskyrimui iš agarozės gelio naudoti PGR gryninimo ir valymo rinkiniai GeneJET PCR Purification Kit<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific) bei GeneJet Gel Extraction Kit<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific). Išvalytų PGR produktų sekoskaita atlikta VU Gyvybės

mokslų centro DNR Sekoskaitos centre. Sekoskaitos duomenų analizė *in silico* atlikta naudojantis NCBI BLAST programa.

## **2.8 DNR elektroforezė agarozės gelyje**

DNR elektroforetinis frakcionavimas vykdytas 1 % arba 0,8 % agarozės gelyje kaip aprašyta Sambrook ir Rusell (2001). DNR molekulinės masės įvertinimui naudoti MassRuler DNA Ladder mix<sup>TM</sup> ir GeneRuler DNA Ladder Mix<sup>TM</sup> (1 kb ir 100 bp) (Thermo Fisher Scientific) žymenys.

## **2.9 Pienarūgščių bakterijų išskyrimas iš jogurtų**

Pienarūgščių bakterijų (LAB) išskyrimas iš jogurtų buvo vykdomas suspendavus 1 g jogurto 100 ml fiziologinio tirpalo. Jogurtas buvo atskiestas naudojant rutininį praskiedimų metodą. Iš suspensijų, gautų praskiedus jogurtą  $10^5$ ,  $10^6$  ir  $10^7$  kartų buvo atliekami išsėjimai (po 100  $\mu$ l suspensijos) ant agarizuotos MRS terpės ir inkubuojama 24-48 val. Bakterijos kultivuotos anaerobinėmis sąlygomis, naudojant Anaerocult A (Merck), 30 °C temperatūroje.

## **2.10 Bakterinių kamienų dalinis identifikavimas**

Termofilinių bakterijų, išskirtų iš dirvožemio virš naftos telkinio, dažymas Gramo metodu ir KOH testai buvo atlikti kaip aprašyta Chandra ir Mani (2011), tik dažyme Gramo būdu vietoje bazinio fuksino naudotas safranino tirpalas (Merck).

LAB izoliatų ir termofilinio 118 kamieno ribosominių genų pagausinimui naudoti universalūs bakterijų 16S rRNR PGR pradmenys (2.5 lentelė). Sekoskaitos duomenys analizuoti, naudojant NCBI BLAST algoritmą.

Išskirtų LAB kamienų skaičiaus įvertinimui buvo atliktas BOX-PGR. Naudotas pradmuo pateiktas 2.5 lentelėje. Taikytos PGR sąlygos aprašytos Versalovic ir kt. (1994). Gauti produktai analizuoti elektroforezės agarozės gelyje metodu (2.8).

## **2.11 Bakterijų kultivavimas skystoje terpėje**

Agarizuotos atitinkamos mitybinės terpės lėkštelėje tankiai užsėjama tiriami kultūra ir inkubuojama atitinkamoje tiriamam kamienui temperatūroje iki vėlyvos logaritminės augimo fazės. Iš užaugusios tiriamos kultūros kolboje su sterilia atitinkama auginimo terpe paruošiamas inokuliatas, kurio  $OT_{590}=1,2$ . Kolbos su atitinkama auginimui naudojama sterilia terpe užsėjamos, pridodant 5 % paruošto inokulianto. Kolbos (su tiriami kultūra bei sterilia terpe (kontrolė)) inkubuojamos atitinkamomis auginamam kamienui aeravimo ir temperatūros sąlygomis. Nustatytais laiko intervalais matuojamas terpės OT, pagal gautus duomenis nubrėžiama tiriamo kamieno augimo kreivė. Eksperimentai kartojami bent tris kartus. Diagramos pateikiamos su apskaičiuotomis standartinio nuokrypio reikšmėmis.

## **2.12 Terpių su jautriu kamieniu paruošimas**

### **2.12.1 Terpės su jautriais pienarūgščių bakterijų kamienais paruošimas**

Jautraus LAB kamieno kultūra tankiai užsėjama agarizuotos MRS terpės paviršiuje ir auginama kamienui optimalioje temperatūroje iki vėlyvos eksponentės. Bakterijos suspenduojamos sterilioje MRS terpėje, paruoštos suspensijos  $OT_{590}=1,2$ . Į agarizuotą, iki  $\sim 45$  °C atvėsintą MRS terpę pridedama 20 % (skaičiuojant galutiniam tūriui) paruoštos bakterijų suspensijos. Terpė gerai išmaišoma ir išpilstoma į sterilias Petri lėkšteles (Pranckutė ir kt., 2014).

### **2.12.2 Terpės su termofiliniu 9A11 kamieniu paruošimas**

Jautraus *G. stearothermophilus* NUB36187 (BGSC Nr. 9A11) kamieno kultūra tankiai užsėjama agarizuotos MB terpės paviršiuje ir inkubuojama iki vėlyvos logaritminės augimo stadijos 60 °C temperatūroje. Bakterijos suspenduojamos sterilioje MB terpėje, paruoštos suspensijos  $OT_{590}=1.5$ . Į agarizuotą, iki  $\sim 50$  °C atvėsintą, MB terpę pridedama 20 % (skaičiuojant

galutiniam tūriui) paruoštos bakterijų suspensijos. Terpė gerai išmaišoma ir išpilstoma į sterilias Petri lėkšteles (Pranckutė ir kt., 2015).

## **2.13 Antibakterinio aktyvumo nustatymo metodai**

### **2.13.1 Užpylimo metodas**

Bakterijų kamienų tarpusavio antagonizmas buvo tirtas užpylimo metodu: ant Petri lėkštelės centre užaugintos testuojamos kultūros užpilama atitinkama agarizuota terpė su inokuliuota kitų, galimai jautrių testuojamo kamieno antibakterinei medžiagai, bakterijų kultūra. Terpių su inokuliuotomis jautriomis bakterijų kultūromis paruošimas aprašytas 2.11 skyriuje. Jei po inkubacijos aplink centre užsėtą kultūrą matoma skaidri zona, galima teigti, kad centre užsėtas kamienas sekretuoja antibakterinę medžiagą, kuriai yra jautrus užpilamoje terpėje inokuliuotas kamienas (Tagg ir kt., 1976; Aween ir kt., 2012; Maria ir Janakiraman, 2012).

### **2.13.2 Šulinėlių metodas**

Antibakterinis aktyvumas kultivavimo eksperimentų metu bei GABP mėginiuose buvo nustatomas šulinėlių metodu (Hyronimus ir kt., 1998). LAB atveju, kultūros mėginiai buvo imami kas dvi valandas (LA kamieno atveju – kas 4 valandas) nuo augimo pradžios. Lėkštelės su inokuliuotu jautriu kamieniu paruošiamos, kaip aprašyta 2.12.1 skyrelyje. 118 termofilinio kamieno auginimo eksperimentuose, antibakterinio aktyvumo nustatymui, kultūros mėginiai buvo imami kas 0,5 arba 1 val. nuo augimo pradžios. Lėkštelių su jautriu 9A11 kamieniu paruošimas aprašytas 2.12.2 skyrelyje.

Visais atvejais iš surinktų kultūrų mėginių lėkštelės nusodinamos centrifuguojant ( $13\,400 \times g$ , 5 min.). Atliekami gautų supernatantų dvigubi praskiedimai. Į agarizuotoje terpėje su inokuliuotu jautriu bakterijų kamieniu (2.12) paruoštus šulinėlius po 100  $\mu$ l koncentracijos mažėjimo tvarka supilstomi praskiesti mėginiai. Šulinėliai paruošiami naudojant vienkartinius sterilius 1 ml tūrio automatinio dozatoriaus antgalius. Pagal mažiausią dar matomą inhibicijos

zoną apskaičiuojamas antibakterinis aktyvumas sutartiniais aktyvumo vienetais (AU/ml), taikant formulę:  $AU/ml = (1 ml \times V^{-1}) / D^{-1}$ , kur V – mėginio tūris ml, D – didžiausias skiedimų skaičius, kuomet šulinėlyje aiškiai matoma inhibicinė zona (Hyronimus ir kt., 1998; Kormin ir kt., 2001).

## **2.14 Grubaus antibakterinio preparato (GABP)**

### **išskyrimas**

500 ml kolbos su 150 ml skystos terpės užsėjamos bakterijų kultūra (2.11), auginama 55 °C temperatūroje iki eksponentinės fazės vidurio. Ląstelės pašalinamos centrifuguojant (10 000 × g, 4 °C, 20 min.). Kultūrinis skystis įsotinamas amonio sulfatu iki pasirinktos koncentracijos ir inkubuojamas ant magnetinės maišyklės 5-8 °C temperatūroje, apie 12 val. arba per naktį. Baltymų precipitatas išsodinamas centrifuguojant 4 °C temperatūroje (20 000 × g, 50 min.). Baltymų nuosėdos suspenduojamos nedideliame tūryje (iki 10 ml) Tris-HCl buferio (pH 7,5; 50 mM) (Moreno ir kt., 2000; Rosenberg, 2005). Amonio sulfatas iš baltymų suspensijos pašalinamas dializės metodu (Rosenberg, 2002), naudojant „Snake Skin Dialysis Tubing 3,5 MWCO“ (Thermo Fisher Scientific) dializės maišelį. Dializė vykdoma 5-8 °C temperatūroje. Po dializės baltymų suspensija koncentruojama, naudojant PEG 35 000 (Sigma-Aldrich) (Rosenberg, 2002).

Baltymų koncentracija GABP mėginiuose nustatoma spektrofotometriškai, naudojant Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Kit™ (Thermo Fisher Scientific).

## **2.15 GABP fizikocheminių savybių įvertinimas**

### **2.15.1 Temperatūros poveikio GABP aktyvumui įvertinimas**

Įvairių temperatūrų poveikio įvertinimui, GABP mėginiai (po 220 µl) buvo inkubuojami atitinkamose temperatūrose (2.6 lentelė). Po inkubacijos šulinėlių metodu (2.13.2) nustatomas GABP mėginių antibakterinis aktyvumas (Lee ir kt., 2001; Kumar ir kt., 2010).

**2.6 lentelė.** Temperatūros poveikio GABP aktyvumui nustatymo eksperimentų sąlygos.

|                          |        |   |         |    |    |     |         |     |
|--------------------------|--------|---|---------|----|----|-----|---------|-----|
| <b>Temperatūra, °C</b>   | -20    | 4 | 70      | 80 | 90 | 100 | 121     | 121 |
| <b>Inkubavimo laikas</b> | 2 sav. |   | 30 min. |    |    |     | 15 min. |     |

### 2.15.2 Fermentų poveikio GABP aktyvumui įvertinimas

Naudoti Merck ir Sigma-Aldrich gamintojų fermentai. Fermentų tirpalai buvo ruošiami atsižvelgiant į gamintojų rekomendacijas ir literatūrą (Moreno ir kt., 2000; Kumar ir kt., 2010). Tirpalai ruošti 2 mg/ml koncentracijos ir sterilizuoti naudojant 0,22 µm filtrus (BioRad) (Moreno ir kt., 2000). Naudoti fermentai ir buferiai, kuriuose jie buvo tirpinami, pateikti 2.7 lentelėje.

**2.7 lentelė.** Fermentai ir jų tirpinimui naudoti buferiniai tirpalai.

| <b>Fermentas</b> | <b>Buferis</b> | <b>Buferio koncentracija (mM)</b> | <b>Buferio pH</b> |
|------------------|----------------|-----------------------------------|-------------------|
| Proteinazė K     | Tris-HCl       | 20                                | 7                 |
| Pronazė E        |                | 20                                | 8                 |
| α-chimotripsinas |                | 20                                | 8                 |
| β-chimotripsinas |                | 20                                | 8                 |
| Tripsinas        |                | 40                                | 8                 |
| Papainas         | Na fosfatinis  | 50                                | 6                 |
| Ficinas          |                | 20                                | 7                 |
| α-amilazė        |                | 20                                | 7                 |
| Lipazė           | K fosfatinis   | 100                               | 6                 |

GABP mėginiai sumaišomi su paruoštų fermentų tirpalais santykiu 1:1, mišiniai inkubuojami 37 °C temperatūroje, 2 val. Po inkubavimo, fermentų veikimas sustabdomas paveikus mėginius 100 °C, 5 min. (GABP aktyvumui toks poveikis įtakos neturi) (Moreno ir kt., 2000; Kumar ir kt., 2010). Kontroliniame mėginyje vietoje fermento tirpalo naudotas 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 buferis. GABP ir kontrolinio mėginio antibakterinis aktyvumas nustatomas šulinėlių metodu (2.13.2). Fermentų tirpalų poveikis jautraus kamieno augimui įvertintintas mėginiuose vietoj GABP naudojant 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 buferį.

### **2.15.3 pH įtakos GABP aktyvumui įvertinimas**

Įvairaus pH reikšmių 100 mM koncentracijos tirpalai buvo ruošiami remiantis literatūra (Lee ir kt., 2001): pH 3-6 – citratinis, pH 7 – Na fosfatinis, pH 8-10 – Tris-HCl. Tirpalai buvo ruošiami distiliuotame vandenyje ir sterilizuojami, naudojant 0,22 µm filtrus (BioRad). GABP mėginiai buvo sumaišomi su skirtingų pH reikšmių tirpalais, santykiu 1:1 ir inkubuojami 4 val. 4 °C temperatūroje. Kontroliniame mėginyje vietoje pH tirpalo naudotas 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 buferis. Po inkubacijos, pH atstatomas, pridėjus lygų tūrį 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 buferio. Išlikęs GABP antibakterinis aktyvumas nustatomas šulinėlių metodu (2.13.2).

### **2.15.4 Detergentų poveikio GABP aktyvumui įvertinimas**

Detergentų tirpalai (Tween-20, Tween-80, Triton X-100, NDS, karbamidas) gaminti 50 mM Tris-HCl buferyje, pH 7,5. GABP sumaišomas su 1 % detergento tirpalu santykiu 1:1, mišinys inkubuojamas 37 °C temperatūroje 5 val. (Kumar ir kt., 2010). Kontroliniame mėginyje vietoje detergento tirpalo naudotas 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 buferis. Po inkubavimo, tiriamojo mišinio antibakterinis aktyvumas nustatomas šulinėlių metodu (2.13.2). Detergentų tirpalų poveikis jautraus kamieno augimui įvertintintas mėginiuose vietoj GABP naudojant 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 buferį.

## **2.16 Tricino-NDS baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje**

Tricino-NDS baltymų elektroforezė atliekama naudojant 4 % T, 3 % C koncentruojantį ir 49,5 % T, 6 % C skirstomąjį gelius. % T žymi bendrą abiejų monomerų procentinę koncentraciją (akrilamido ir bisakrilamido), neatsižvelgiant į galimų ryšių sudarymą; % C žymi polimerizacijai išnaudotų vietų procentinę išraišką, priklausomai nuo visų galimai buvusių vietų (Schägger, 2006).

GABP mėginiai sumaišomi su 4x T-NDS-PAGE dažų (Schägger, 2006), ir inkubuojami 37 °C temperatūroje, apie 30 min., arba 5 min. pakaitinami 95 °C. Redukuojančių sąlygų sudarymui naudojamas 4x T-NDS-PAGE dažas su 6 % merkaptoetanolio (Schägger, 2006). Leidžiama po du takelius GABP mėginių. Viena gelio dalis po elektroforezės dažoma su PageBlue Protein Staining Solution™ (Thermo Fisher Scientific), antra – panaudojama žimogramai. Naudotas baltyminis molekulinės masės žymuo PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder™ (Thermo Fisher Scientific).

Elektroforezė iš pradžių vykdoma esant 30 V pastoviai elektros srovei, kol mėginiai pilnai pereina į koncentruojamąją gelio dalį (maždaug 1,5 val.). Vėliau srovė padidinama iki 90 V ir tokia paliekama iki elektroforezės pabaigos (Schägger, 2006). Elektroforezė stabdoma, kuomet fronto linija atsiduria maždaug 1 cm atstumu nuo gelio apačios (12-14 val.).

## **2.17 Žimogramos paruošimas**

Poliakrilamidinio gelio (PAG) dalis (be baltymų molekulinės masės žymens) inkubuojama 2 val. fiksavimo tirpale (10 % acto rūgštis, 20 % izopropanolis, 70 % dist. vanduo) švelniai vartant. Po inkubavimo gelis mažiausiai 2 val. plaunamas distiliuotu vandeniu, keičiant kas 15-20 min. Gelis perkeliamas į sterilią Petri lėkštelę ir užpilamas paruošta agarizuota terpe su inokuliuotu jautriu kamieniu (2.12.2) (Lee ir kt., 2001). Terpei sustingus, žimograma inkubuojama 60 °C temperatūroje 6-12 val. Išryškėjusi skaidri zona rodo bakteriocino vietą PAG. Gauta žimograma lyginama su PAG dalimi, nudažyta PageBlue Protein Staining Solution™ dažų (Thermo Fisher Scientific).



## 3. REZULTATAI IR APTARIMAS

### 3.1 Pienarūgščių bakterijų tyrimai

#### 3.1.1 Pienarūgščių bakterijų išskyrimas iš jogurtų

Pienarūgščių bakterijų (toliau LAB) išskyrimui atsitiktinai pasirinkti du probiotiniai jogurtai: „Actimel“ („Danone“) ir „Bifi“ (UAB „Rokiškio pienas“). Jogurtų pasirinkimą lėmė gamintojų nurodyta bakterijų rūšinė sudėtis ir kiekis minėtuose jogurtuose. Iš kiekvieno jogurto buvo išskirta po 20 atskirų izoliatų, pažymėtų didžiąja raide (A arba B, priklausomai nuo naudoto jogurto) bei eilės numeriu (nuo 1 iki 20).

Kadangi išaugusių ant MRS terpės bakterijų morfologija nesiskyrė, atsitiktinai atrinkti 9 *Lactobacillus* sp. izoliatai: 4 izoliatai iš „Actimel“ jogurto (A izoliatai), 5 – iš „Bifi“ jogurto (B izoliatai). Nustatyta, kad 1-ame grame tirtų jogurtų yra maždaug  $10^8$  *Lactobacillus* sp. kolonijas formuojančių vienetų (CFU). Gauti kiekybiniai duomenys atitinka gamintojų pateikiamą informaciją bei probiotinio produkto reikalavimus (Pan ir kt., 2009).

Darbe taip pat buvo tiriami tipiniai LAB kamienai (2.1 lentelė), priklausantys rūšims, kurių dauguma yra naudojamos kaip probiotikai maisto pramonėje (Saad ir kt., 2013; Dixit ir kt., 2016).

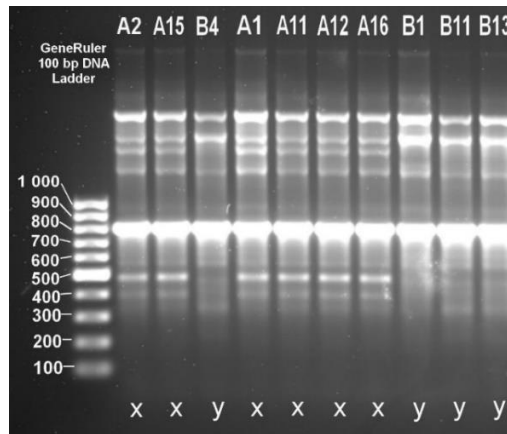
#### 3.1.2 Pienarūgščių bakterijų jogurtų izoliatų dalinis identifikavimas

Jogurtų izoliatų dalinis identifikavimas buvo atliktas lyginant izoliatų 16S rDNR sekas su NCBI duomenų baze. NCBI BLAST analizės rezultatuose buvo pateikiamos dviejų *Lactobacillus* sp. rūšių 16S ribosominių genų sekos: *Lactobacillus casei* arba *Lactobacillus paracasei*. Lyginant sekas su visų nukleotidų sekų NCBI duomenų baze (Nucleotide collection (nt)), visų analizuotų izoliatų (6 iš A grupės ir 4 iš B grupės) atvejais, sekos pasižymėjo 100 % panašumu visoms pirmajame 100-te BLAST analizės rezultatuose

pateiktoms abiejų *Lactobacillus* rūšių sekoms. Visais atvejais tarp pirmųjų 5-ių didžiausiu atitikimu pasižyminčių rezultatų buvo abiemis minėtoms rūšims priklausančių kamienų sekos, tik kai kuriais atvejais skyrėsi jų eiliškumas. Tačiau, lyginant jogurtų izoliatų sekas su NCBI bakterijų ir archėjų rRNR genų duomenų bazės sekomis (16S ribosomal RNA (Bacteria and Archaea)), visais atvejais jogurtų izoliatų sekos didžiausiu panašumu pasižymėjo *L. paracasei* kamienų 16S rRNR genų sekoms.

*L. casei* ir *L. paracasei* rūšys yra panašios tiek fenotipiškai, tiek filogenetiškai. Fenotipiniu atžvilgiu jos nežymiai skiriasi angliavandenių fermentacijos profiliais, o filogenetiškai jas galima atskirti pagal V1 16S rRNR genų sekos regiono skirtumus (Ward ir Timmins, 1999). Abi rūšys priklauso *L. casei* grupei, tačiau taksonominė šių rūšių padėtis ilgą laiką buvo diskutuojama. 2002 metais buvo pasiūlyta abi rūšis sujungti į vieną *L. casei* rūšį, su tipiniu kamieniu ATCC 334, o *L. paracasei* pavadinimą panaikinti (Dellaglio ir kt., 2002), tačiau 2008 metais pateiktas tarptautinės bakterijų sistematikos komisijos atsakymas pasiūlymą atmetė ir buvo paliktos abi rūšys su tipiniais kamienais: *L. casei* ATCC 393<sup>T</sup> ir *L. paracasei* ATCC 334<sup>T</sup> (Judicial Commission, 2008). Dėl ilgą laiką trukusių diskusijų, šioms rūšims literatūroje dažnai neteisingai priskiriami kamieniai (Kuo ir kt., 2013; Smokvina ir kt., 2013), o atitinkamai – ir jų DNR sekos NCBI duomenų bazėje. Šiame darbe atliktos BLAST analizės rezultatų sąrašė pateiktos BL23, Zhang, LC2W bei BD-II kamienų 16S rRNR genų sekos buvo priskiriamos *L. casei* rūšiai, o 2013 m. atliktos *L. casei* grupės rūšių genų analizės duomenimis, šie kamieniai priklauso *L. paracasei* rūšiai (Toh ir kt., 2013). Šie duomenys atitinka gamintojų pateikiamą „Bifi“ jogurto rūšinę sudėtį. Tuo tarpu, „Actimel“ jogurto sudėtyje nurodomos *L. casei* Danone, o ne *L. paracasei* bakterijos.

Taip pat buvo atliktas jogurtų izoliatų profiliavimas, taikant BOX-PGR metodą, skirtą įvertinti skirtingų bakterijų kamienų skaičiui. Gauti vienodi profiliai pasiskirstė pagal izoliatų grupes, atitinkančias išskyrimo šaltinį (A ir B) (3.1 pav.).



**3.1 pav.** Laktobacilų jogurtų izoliatų BOX-PGR produktų analizė agarozės gelyje. Viršuje pažymėti izoliatų numeriai; kairėje – Gene Ruler DNA Lader 100 bp (Thermo Fisher Scientific) molekulinės masės žymuo su nurodytais fragmentų dydžiais (bp); apačioje – gautų profilių tipai (skirtinga raidė žymi skirtingą profilį).

Remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad tiriami jogurtų izoliatai yra artimiausi *L. paracasei* rūšiai, o izoliatų grupės atitinka skirtingus šios rūšies kamienus.

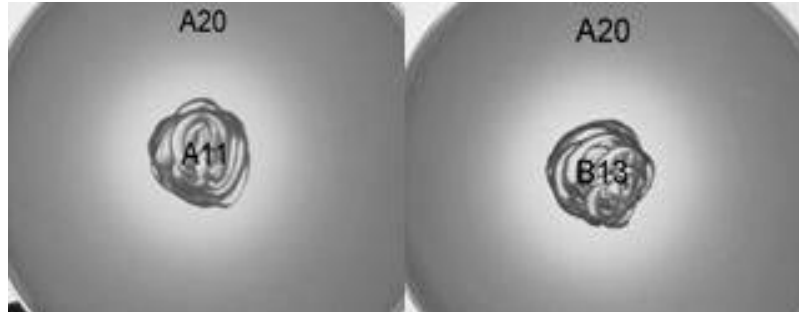
### 3.1.3 Pienarūgščių bakterijų izoliatų antibakterinio aktyvumo įvertinimas

Antibakterinio aktyvumo tyrimams A ir B grupių tarpe pasirinkta po tris izoliatas iš kiekvienos grupės. Užpylimo metodu buvo nustatyta, kad visi jogurtų izoliatai sudaro skaidrias zonas, inhibuodami užpildo izoliato augimą (3.2 pav., 3.1 lentelė) (izoliatai buvo tikrinami vieni prieš kitus). 3.1 lentelėje pateikti tirtų izoliatų tarpusavio antagonizmo rezultatai.

**3.1 lentelė.** Laktobacilų jogurtų izoliatų antibakterinio aktyvumo įvertinimo rezultatai. „+“ - aplink užsėtą kultūrą matoma skaidri zona iki 5 mm; „++“ - skaidri zona ≤ 10 mm, „+++“ - zona >10 mm.

|                          |     | Jautrus izoliatas |     |     |    |    |     |
|--------------------------|-----|-------------------|-----|-----|----|----|-----|
|                          |     | A11               | A15 | A20 | B1 | B4 | B13 |
| Sekretuojantis izoliatas | A11 |                   | +   | ++  | +  | +  | +   |
|                          | A15 | +                 |     | ++  | +  | +  | +   |
|                          | A20 | +                 | +   |     | +  | +  | +   |
|                          | B1  | ++                | ++  | +++ |    | ++ | ++  |
|                          | B4  | ++                | ++  | +++ | +  |    | +   |
|                          | B13 | +++               | +++ | +++ | ++ | ++ |     |

3.2 paveiksle pateikiami laktobacilų izoliatų antibakterinio aktyvumo įvertinimo užpylimo metodu pavyzdžiai. Plusų kiekis atspindi susidariusios apie lėkštelės centre pasėtą kultūrą skaidrios zonos dydį.



**3.2 pav.** Laktobacilų jogurtų izoliatų antibakterinio aktyvumo įvertinimo užpylimo metodu pavyzdžiai. Paveiksle pažymėti antibakterinę medžiagą sekretuojančio (centre) ir tariamai jautraus tai medžiagai (fone) izoliatų numeriai. A11 aktyvumo įvertinimas „++“, B13 – „+++“.

Gauti rezultatai leidžia teigti, kad A ir B grupėms priklausantys izoliatai sekretuoja antibakteriniu aktyvumu pasižyminčias medžiagas. Susidariusių skaidrių zonų dydis rodo, kad B grupės izoliatų sekretuojama antibakterinė medžiaga yra aktyvesnė arba yra sekretuojamas didesnis jos kiekis, arba A izoliatai pasižymi didesniu jautrumu B izoliatų sekretuojamoms medžiagoms. Aktyvumas prieš producentui artimas rūšis ar kamienus būdingas bakteriocinams (Gillor ir kt., 2008; Desriac ir kt., 2010; Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017; Kaškonienė ir kt., 2017), todėl remiantis gautais rezultatais galima daryti prielaidą, kad LAB jogurtų izoliatų antibakterinį aktyvumą galimai lemia bakteriocinų sekrecija.

Nors abiejų A ir B grupių izoliatai greičiausiai priklauso tai pačiai rūšiai, jų tarpusavio antagonizmas ir antibakterinio aktyvumo skirtumai gali būti paaiškinami tuo, kad atskirų grupių izoliatai atstovauja skirtingus kamienus, o yra parodyta, kad antibakterinio aktyvumo spektras ir/arba poveikio stiprumas, sąlygotas bakteriocinų sekrecijos, gali varijuoti ne tik rūšių, bet ir kamienų lygmenyje (Moreno ir kt., 2000; Darsanaki ir kt., 2012; Nuryshev ir kt., 2016).

Taip pat fenotipiškai įvertintas jogurtų izoliatų ir tipinių LAB kamienų tarpusavio antagonizmas (3.2 lentelė).

**3.2 lentelė.** LAB jogurtų izoliatų ir tipinių kamienų tarpusavio antagonizmo įvertinimo rezultatai. „+/-“ - praskaidrėjimas matomas tik užsėtos kultūros ribose; „+/-“ - skaidri zona aplink užsėtą kultūrą labai maža, ≤ 5 mm; „+“ - skaidri zona ≤ 10 mm; „++“ - skaidri zona ≤ 15 mm, „+++“ - zona >15 mm.

|                                |            | <b>Jautrus kamienas</b> |            |            |           |           |           |            |           |           |
|--------------------------------|------------|-------------------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
|                                |            | <b>A11</b>              | <b>B13</b> | <b>A20</b> | <b>LA</b> | <b>LD</b> | <b>LL</b> | <b>LL2</b> | <b>LC</b> | <b>LS</b> |
| <b>Sekretuojantis kamienas</b> | <b>A11</b> |                         | +          | ++         | +         | +++       | +++       | +++        | ++        | ++        |
|                                | <b>B13</b> | +++                     |            | +++        | +         | +++       | +++       | +++        | ++        | ++        |
|                                | <b>A20</b> | +                       | +          |            | ++        | +++       | +++       | +++        | ++        | ++        |
|                                | <b>LA</b>  | +/-                     | +/-        | +/-        |           | ++        | +         | +          | +/-       | +         |
|                                | <b>LD</b>  | -                       | -          | -          | -         |           | -         | -          | -         | -         |
|                                | <b>LL</b>  | +/-                     | +/-        | +/-        | +/-       | +         |           | +          | +         | +         |
|                                | <b>LL2</b> | ++                      | +          | ++         | +         | +++       | ++        |            | +++       | +++       |
|                                | <b>LC</b>  | -                       | +/-        | +/-        | +/-       | ++        | +         | +          |           | +         |
|                                | <b>LS</b>  | +                       | +/-        | +          | +/-       | +         | +         | +          | +         |           |

Gauti rezultatai (3.2 lentelė) rodo, kad stipriausiu antibakteriniu aktyvumu tarp tipinių kamienų pasižymi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LL2) kamienas. Šio kamieno gebėjimo slopinti tirtų kamienų augimą spektras bei antibakterinis aktyvumas nesiskyrė nuo jogurtų izoliatų A11, A20 ir B13 spektro ir aktyvumo. Pažymėtina, kad tik *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LD) neinhibavo nei vieno iš tirtų kamienų augimo ir buvo jautrus visų tirtų kamienų sekretuojamoms antibakterinėms medžiagoms, todėl tolesniuose tyrimuose nebuvo naudojamas.

### **3.1.4 Pienarūgščių bakterijų kamienų sekretuojamų antibakterinių medžiagų identifikavimas**

Viena iš galimybių sekretuojamų antibakterinių medžiagų identifikavimui yra genų, koduojančių bakteriocinus, paieška analizuojamų kamienų genomuose PGR metodu (Digaitiene ir kt., 2012; Prieto ir kt., 2012). Tuo tikslu darbe buvo panaudota 17 porų pradmenų, sukonstruotų pagal žinomų bakteriocinų genų sekas (NCBI, GeneBank) ir atrinktų iš mokslinių publikacijų (2.5 lentelė).

Visi pradmenys buvo panaudoti PGR reakcijose su 15-os (9 izoliatų ir 6 tipinių) LAB kamienų genomine DNR. Gautų PGR produktų sąrašas pateiktas 3.3 lentelėje.

**3.3 lentelė.** PGR produktai, gauti naudojant visų tirtų LAB kamienų ir jogurtų izoliatų DNR ir bakteriocinų genų identifikavimui skirtus pradmenis (2.5 lentelė). ND – nėra duomenų.

| Bakterijų kamienas   | Naudoti pradmenys (2.5 lentelė)           | Tikėtinas PGR produkto dydis (bp) | Gauto PGR produkto dydis (bp) |
|--|---|-----------------------------------|-------------------------------|
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (LD) | 1BACTP                                    | 257                               | ~ 250                         |
| Visi <i>Lactobacillus</i> spp. izoliatai (A ir B grupės)       | 1BACTP                                    | 257                               | ~ 1 700                       |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA)                          | 3BACTP                                    | 590                               | ~ 250                         |
| A grupės <i>Lactobacillus</i> spp. izoliatai                   | 3BACTP                                    | 590                               | ~ 2 100                       |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (LL)            | 3BACTP                                    | 590                               | ~ 1 100                       |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (LL2)           | 3BACTP                                    | 590                               | ~ 600                         |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (LL2)           | BACTWNC-NIZLL                             | ND                                | ~ 210                         |
| Visi <i>Lactobacillus</i> spp. izoliatai (A ir B grupės)       | m2163<br>m2386<br>m2393<br>m2405<br>m2406 | ≤ 300                             | ≤ 300                         |
| <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (LD)            | CurA2                                     | 622                               | ~1 400                        |

Gautų PGR produktų dydžio ir sekoskaitos analizės rezultatai pasiskirsto į keturias grupes:

- 1) 2 PGR produktai, dydžiu ir BLAST analizės rezultatais atitinkantys nizino genus (3BACTP ir BACTWNC-NIZLL). Tai patvirtina, kad LL2 kamienas greičiausiai sekretuoja niziną.
- 2) PGR produktai, gauti su 5 pradmenų poromis, skirtomis numanomų *L. paracasei* ATCC 334 bakteriocinų identifikavimui (m2163, m2386, m2393, m2405, m2406) (Kuo ir kt., 2012). Gautų produktų sekos buvo homologiškos minėtų bakteriocinų genų sekoms. Šie rezultatai leidžia daryti

prielaidą, kad fenotipiškai nustatomas A ir B izoliatų antibakterinis aktyvumas yra sąlygotas šių bakteriocinų raiškos, o izoliatai priklauso *L. paracasei* rūšiai.

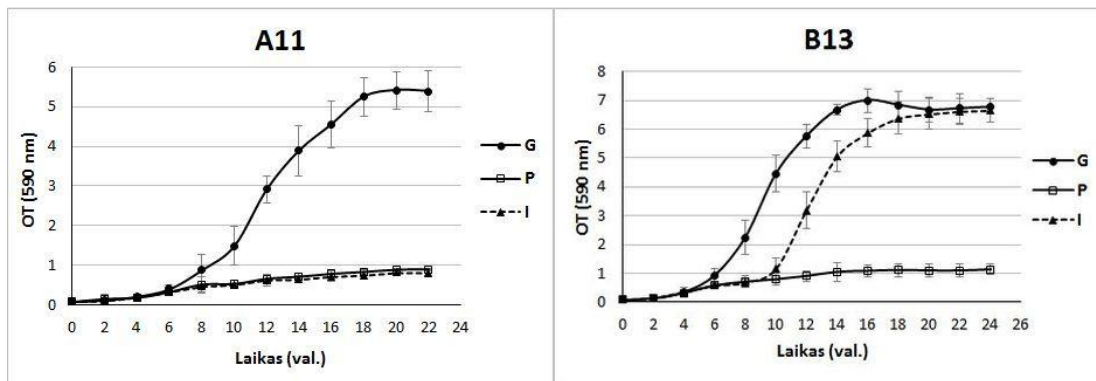
- 3) PGR produktai, gauti naudojant pradmenis, skirtus žinomų bakteriocinų identifikavimui (nizinui (3BACTP), išskyrus su LL2 kamieno genomine DNR; lakticinui 3147 (1BACTP); kurvacinui A ir jo imuniteto genui (CurA2)), nei pagal dydį, nei pagal produkto sekos analizę neatitiktys minėtų tipinių bakteriocinų sekų, o identifikuojami kaip hipotetiniai ar nesusijusios funkcijos baltymai.
- 4) PGR produktų nebuvo gauta nei su vieno kamieno genomine DNR, naudojant 7 pradmenų poras, sukonstruotas pagal žinomų bakteriocinų sekas: pediocino PA, sakacino P (2 poros pradmenų), sakacino A, lakticino S, acidocino 8120 ir kurvacino A (2.5 lentelė).

### **3.1.5 Pienarūgščių bakterijų gebėjimas įsisavinti oligosacharidus**

Remiantis laktobacilų jogurtų izoliatų tarpusavio antagonizmo ir BOX-PGR rezultatais, tolesniems darbams naudoti A11 ir B13 izoliatai, priklausantys skirtingiems kamienams (3.1.3) ir pasižymintys didžiausiu savo grupėse antibakteriniu aktyvumu (3.1.2). Jogurtų izoliatai artimiausi *L. paracasei* rūšiai, kuri priskiriama fakultatyviniams anaerobams, todėl izoliatas buvo galima auginti aerobinėmis sąlygomis. Tirti oligosacharidai (OS) – inulinas, palatinozė ir  $\alpha$ -ciklodekstrinas (CD). Gliukozė naudota kaip kontrolinis anglies šaltinis rezultatų palyginimui. Gauti rezultatai publikuoti straipsnyje „Development of synbiotics with inulin, palatinose,  $\alpha$ -cyclodextrin and probiotic bacteria” (Pranckutė ir kt., 2014).

Duomenys 3.3 pav. pateiktuose grafikuose leidžia teigti, kad visais atvejais, tiek A11, tiek B13 izoliatai silpniausiai įsisavina palatinozė. Yra parodyta, kad *L. paracasei* 1195 kamienas taip pat neįsisavino palatinozės (Kaplan ir Hutkins, 2003). Tuo tarpu, inuliną blogai įsisavina tik A11 izoliatas, o B13 izoliato augimas su inulinu prilygsta augimui su gliukoze, tik eksponentinė fazė, auginant su inulinu, prasideda maždaug 4 valandomis vėliau

(3.3 pav.). Literatūroje yra nurodomas *L. paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 kamieno gebėjimas įsisavinti inuliną ir įvairaus PL FOS (Makras ir kt., 2005), tačiau tame pačiame ir kituose šaltiniuose teigiama, kad OS įsisavinimas yra savitas rūšių ir net kamienų lygmenyje (Makras ir kt., 2005; Kunova ir kt., 2011; Mandadzhieva ir kt., 2011; Saminathan ir kt., 2011; Gänzle ir Follador, 2012). Tai paaiškina skirtingą A11 ir B13 izoliatų gebėjimą įsisavinti inuliną, nors šiame darbe nustatyta, kad abiejų grupių izoliatai priklauso tai pačiai rūšiai.



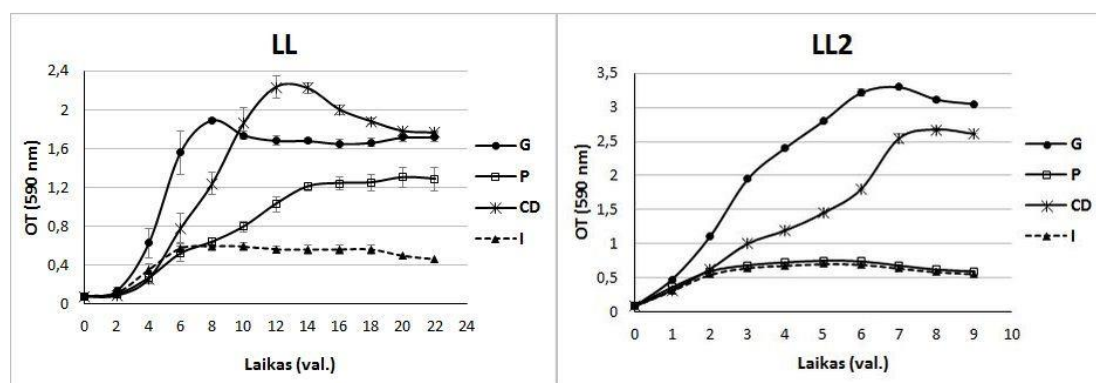
**3.3 pav.** OS įtaka iš jogurtų išskirtų A11 ir B13 izoliatų augimui. G – gliukozė, P – palatinozė, I - inulinas. Anglies šaltinio koncentracija – 1 %.

Kadangi MRSb terpė, pridėjus CD, praranda skaidrumą ir negalima objektyviai įvertinti kultūros OT pokyčių, A11 ir B13 izoliatų gebėjimas įsisavinti šį OS buvo vertintas atliekant kultūrų, augintų su CD arba gliukoze išsėjimus ant agarizuotos MRS terpės. Kultūros mėginiai imti kas 4 val. nuo augimo pradžios. Išsėjimų rezultatai parodė, kad abiejų grupių jogurtų izoliatai neįsisavina CD: 4 valandų kultūrose, augintose terpėse su gliukoze ir CD, nustatyti tos pačios eilės ( $10^7$  CFU/ml) ląstelių kiekiai. Tuo tarpu, 12 val. kultūrų mėginiuose su gliukoze ląstelių kiekiai padidėjo iki  $10^8$  CFU/ml, o terpėse su CD – išliko  $10^7$  CFU/ml eilės.

Tiriant anglies šaltinių – gliukozės arba OS – įtaką *Lactobacillus* ir *Lactococcus* gentims priklausančių tipinių kamienų augimui nustatyta, kad *L. lactis* subsp. *lactis* kamienai (LL ir LL2) (3.4 pav.), anglies šaltiniu naudojant gliukozę, augo greičiau nei *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* (LS) bei

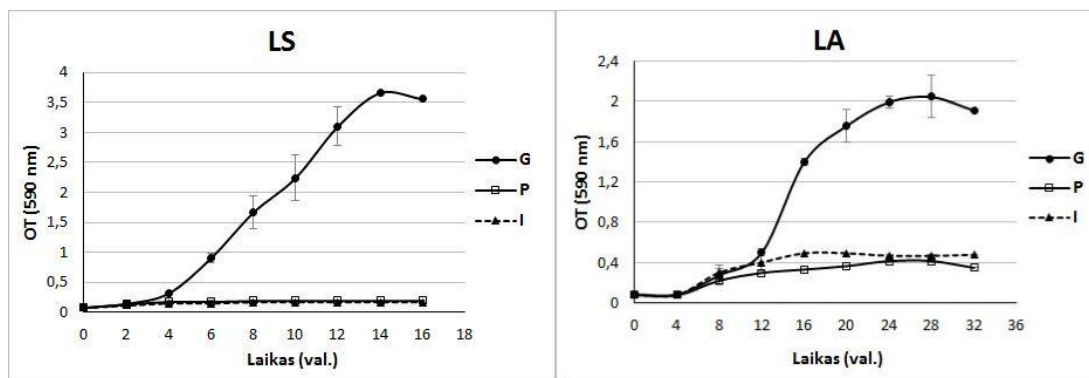


*Lactobacillus acidophilus* (LA) kamienai (3.5 pav.). LL ir LL2 kamienai stacionarią fazę pasiekė po 8 bei 6 val. atitinkamai (3.4 pav.). Tuo tarpu, LS ir LA kamienai šią augimo fazę pasiekė po 14 ir 28 val. atitinkamai (3.5 pav.). Vertinant augimo laiką bei ląstelių tankį stacionarios fazės pradžioje galima teigti, kad LL2 kamienas terpėje su gliukoze auga greičiausiai.



**3.4 pav.** OS įtaka *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LL ir LL2) kamienų augimui. G – gliukozė, P – palatinozė, I – inulinas, CD –  $\alpha$ -ciklodekstrinas. OS koncentracija – 1 %.

Iš visų tirtų tipinių LAB kamienų palatinozė geriausiai įsisavino LL kamienas (3.4 pav.), tačiau mažesniu efektyvumu (stacionarios fazės pradžioje po 14 val. augimo kultūra pasiekia 1,2 OT ląstelių tankį), nei gliukozę (maksimalus pasiekiamas OT siekia 1,9). Taip pat, terpėje su palatinoze eksponentinė augimo fazė trunka kur kas ilgiau (14 val.) lyginant su gliukoze (8 val.) (3.4 pav.). Tai rodo, kad palatinozės įsisavinimui LL kamienai greičiausiai reikia metabolinio persitvarkymo, kuris sulėtina kamieno augimą. LL kamienas mažiausiu efektyvumu įsisavina inuliną – pasiekiamas tik 0,6 OT, tačiau efektyviau, nei visi kiti tirti tipiniai kamienai (3.4 ir 3.5 pav.). Tuo tarpu, auginant LL kamieną su CD, pasiekiamas net didesnis OT, nei auginant su gliukoze, nors pastaruoju atveju maksimalus OT pasiekiamas greičiau (3.4 pav.). Tai rodo, kad LL kamienas efektyviau auga anglies šaltiniu esant CD, bet gliukozė yra lengviausiai pasisavinama, todėl jai esant vieninteliu anglies šaltiniu, maksimalus kultūros augimas pasiekiamas greičiausiai.



**3.5 pav.** OS įtaka *L. acidophilus* (LA) ir *L. sakei* subsp. *sakei* (LS) kamienų augimui. G – gliukozė, P – palatinozė, I – inulinas. Anglies šaltinio koncentracija – 1 %.

LL2 kamienas vienodai neefektyviai įsisavina inuliną ir palatinozė – stacionarios fazės pradžioje po 5 val. augimo pasiekiamas tik 0,5 OT ląstelių tankis (3.4 pav.). Kaip ir LL kamieno atveju, LL2 kamienas taip pat geba įsisavinti CD, tačiau mažesniu efektyvumu, nei gliukozę: su CD maksimalus pasiekiamas kultūros OT yra 2,6, o su gliukoze – 3,4. Kaip ir LL kamieno atveju, su CD maksimalus OT pasiekiamas vėliau (po 8 val.) nei su gliukoze (po 7 val.) (3.4 pav.). Nors remiantis pateiktais rezultatais didesnę OT auginant su CD pasiekia LL2 kamienas, tačiau lyginant su kultūrų augimu, kuomet anglies šaltiniu naudojama gliukozė, galima teigti, kad CD efektyviau įsisavina LL kamienas.

Analizuojant *Lactobacillus* sp. tipinių kamienų gebėjimą įsisavinti tirtus OS parodyta, kad inulino ir palatinozės visiškai neįsisavina LS kamienas (3.5 pav.), nors kultivavimo sąlygos šiam kamieniui buvo tinkamos ir auginant su gliukoze po 13 val. pasiekiamas maksimalus kultūros OT, siekiantis net 3,7 (3.5 pav.).

LA kamienas taip pat neefektyviai įsisavina inuliną ir palatinozė, nors literatūroje nurodoma, kad *L. acidophilus* bakterijos turėtų gebėti asimiliuoti palatinozė (Andersen ir kt., 2012; van Zanten ir kt., 2012; Gänzle ir Follador, 2012) bei inuliną (Goderska ir kt., 2008; Gänzle ir Follador, 2012). Stacionari fazė, esant 0,5 OT ląstelių tankiui, terpėje su inulinu pasiekiamą po 10 val., o terpėje su palatinoze – tik po 24 val. augimo (3.5 pav.). Šis kamienas yra

priskiriamas obligatiniams anaerobams, ir tai, kad auginimo metu pavyko palaikyti anaerobines sąlygas, patvirtina augimo su gliukoze rezultatai – po 28 augimo val. pasiekiamas 2,4 OT. Tai rodo, kad neefektyvus LA augimas su OS buvo stebimas dėl kamieno negebėjimo jį įsisavinti, o ne dėl netinkamų kultivavimo sąlygų.

Pateikti duomenys leidžia teigti, kad tirti LAB kamienai skirtingai reaguoja į naudotus OS kaip anglies šaltinius. Tai atveria galimybę reguliuoti atskirų *Lactobacillus* ir *Lactococcus* gentims priklausančių bakterijų kamienų augimą mišrioje populiacijoje.

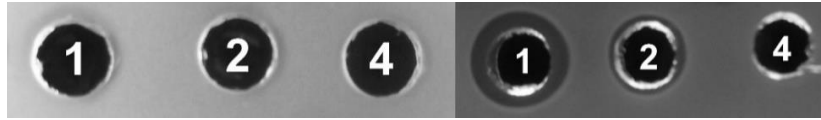
### **3.1.6 Oligosacharidų įtaka pienarūgščių bakterijų tipinių kamienų ir jogurtų izoliatų antibakteriniam aktyvumui**

Šiame etape buvo tiriama maisto pramonėje naudojamų, komercinių prebiotinių OS (inulino, palatinozės ir CD) įtaka LAB jogurtų izoliatų bei tipinių kamienų antibakteriniam aktyvumui.

A11 ir B13 jogurtų izoliatų antibakterinio aktyvumo įvertinimui buvo panaudoti visi turimi šių kamienų sekretuojamoms antibakterinėms medžiagoms jautrumu pasižymėję LAB kamienai (3.1.2), tačiau inhibicinių zonų nebuvo aptikta. Literatūroje yra aprašyti atvejai, kai LAB bakteriocinų produkcija yra stebima kultivuojant agarizuotoje terpėje, bet nėra nustatoma skystoje terpėje, tačiau teigiama, kad kai kuriais (ne visais) atvejais įmanoma stimuliuoti LAB bakteriocinų sekreciją skystoje terpėje, optimizavus kultivavimo sąlygas (Heng ir kt., 2007; Maldonado-Barragán ir kt., 2009; O'Shea ir kt., 2012). Tuo remiantis buvo atlikti A11 ir B13 izoliatų kultivavimo skystoje terpėje eksperimentai, taikant skirtingas aeracijos sąlygas, pH reikšmes (5,2 – 7,2), keičiant Tween-80 koncentraciją terpėje (1 %; 0,5 %; 0,1 %), naudojant mineralinių druskų priedus (Kaunietis ir kt., 2017) ar keičiant kultivavimo terpę (mM9), tačiau nei vienu atveju antibakterinis izoliatų aktyvumas nebuvo nustatytas.

Teigiami rezultatai buvo gauti jautriu kamieniu panaudojus termofilinį *G. stearothermophilus* 9A11 kamieną. Pati MRSb terpė (MRS terpė be

gliukozės), naudojama laktobacilų kultivavimui, šiek tiek slopina 9A11 kamieno augimą (tai gali būti paaiškinama faktu, kad MRS terpė yra selektyvi LAB ir matomas labai nežymus praskaidrėjimas aplink šulinėlį, bet esant baktericidiniam aktyvumui stebimos aiškios skaidrios zonos (3.6 pav.).



**3.6 pav.** Inhibicinių zonų pavyzdžiai, testuojant jautriu *G. stearothersophilus* 9A11 kamieniu. Kairėje – MRSb terpė; dešinėje – baktericidinį aktyvumą turintis mėginys. Skaičiai žymi mėginio praskiedimo laipsnį.

Abiejų izoliatų atvejais, nedidelis antibakterinis aktyvumas nustatytas tik auginant su gliukoze, kaip vieninteliu anglies šaltiniu. A11 izoliato atveju antibakterinis aktyvumas buvo aptinkamas nuo 20-os kultivavimo valandos ir siekė tik 10 AU/ml, o B13 izoliato atveju – nuo 18-os valandos ir siekė 20 AU/ml.

Vykdam OS įtakos antibakteriniam aktyvumui tyrimus su tipiniais LAB kamienais, antibakterinio aktyvumo kultūriniame skystyje nebuvo aptikta, nors jautriais kamienais buvo panaudoti visi turimi tipiniai LAB kamienai ir jogurtų izoliatai, kurie 3.2 lentelės duomenimis (3.1.2) buvo jautrūs atitinkamų kamienų antibakterinėms medžiagoms. Teigiami rezultatai gauti tik su LL2 ir LA kamienais (2.1 lentelė), jautriais kamienais panaudojus atitinkamai *Lactobacillus curvatus* (LC) ir *L. sakei* subsp. *sakei* (LS) kamienus, kurie tarpusavio antagonizmo tyrimuose pasižymėjo didžiausiu jautrumu minėtų kamienų sekretuojamoms antibakterinėms medžiagoms (3.2 lentelė). Šis LS kamienas naudotas jautriu *L. lactis* antibakterinių medžiagų identifikavimui ir kituose tyrimuose (Chen ir kt., 2007). OS įtakos LL2 ir LA kamienų augimui ir baktericidiniam aktyvumui rezultatai pateikti 3.5 ir 3.6 lentelėse bei publikuoti straipsnyje „Development of synbiotics with inulin, palatinose,  $\alpha$ -cyclodextrin and probiotic bacteria” (Pranckutė ir kt., 2014).

**3.4 lentelė.** OS įtaka *L. lactis* subsp. *lactis* (LL2) kamieno augimui ir antibakteriniam aktyvumui. AU/ml – sutartiniai antibakterinio aktyvumo vienetai. OT<sub>590</sub> – kultūros optinis tankis, matuojant ties 590 nm bangos ilgiu. Anglies šaltinio koncentracija – 1 %.

| Laikas<br>(val.) | Gliukozė (K) |                   | Palatinozė |                   | Inulinas |                   | CD    |                   |
|------------------|--------------|-------------------|------------|-------------------|----------|-------------------|-------|-------------------|
|                  | AU/ml        | OT <sub>590</sub> | AU/ml      | OT <sub>590</sub> | AU/ml    | OT <sub>590</sub> | AU/ml | OT <sub>590</sub> |
| <b>2</b>         | 0            | 1,11              | 0          | 0,59              | 0        | 0,55              | 0     | 0,63              |
| <b>4</b>         | 0            | 2,41              | 0          | 0,73              | 0        | 0,68              | 0     | 1,20              |
| <b>6</b>         | 40           | 3,22              | 0          | 0,74              | 0        | 0,70              | 80    | 1,80              |
| <b>8</b>         | 320          | 3,12              | 20         | 0,74              | 20       | 0,59              | 320   | 2,67              |
| <b>10</b>        | 160          | 3,06              | 10         | 0,59              | 10       | 0,56              | 320   | 2,61              |

Auginant LL2 kamieną terpėje su gliukoze arba CD, abiem atvejais antibakterinis aktyvumas pasireiškė po 6 val. augimo, tačiau terpės su CD supernatanto antibakterinis aktyvumas buvo dvigubai didesnis (80 AU/ml), nei su gliukoze (40 AU/ml) (3.4 lentelė), nors tuo laiku kultūros, augintos terpėje su gliukoze, ląstelių tankis buvo beveik dvigubai didesnis (1,8 ir 3,22 atitinkamai, 3.4 lentelė). Tai rodo, kad CD teigiamai veikia LL2 kamieno sekretuojamos antibakterinės medžiagos produkciją arba aktyvumą. Auginant su palatinoze ar inulinu, antibakterinis aktyvumas pasireiškė tik po 8 auginimo valandų ir siekė vos 20 AU/ml (3.4 lentelė). Mažą nustatytą antibakterinį aktyvumą paaikškina LL2 kamieno negebėjimas įsisavinti šių OS (3.1.5).

Auginant LA kamieną terpėse su skirtingais anglies šaltiniais (gliukozė, palatinozė, inulinas) parodyta skirtinga OS įtaka šio kamieno antibakteriniam aktyvumui (3.5 lentelė). Auginant LA kamieną terpėje su gliukoze, supernatanto antibakterinis aktyvumas pasireiškė 8-ą kultivavimo valandą. Didžiausiu aktyvumu pasižymėjo 16, 20 ir 24 valandų supernatantai (320 AU/ml), surinkti tiriamos kultūros eksponentinės augimo fazės metu. Po 8 augimo valandų terpėje su gliukoze ir terpėje su palatinoze ląstelių OT dar beveik nesiskiria, tačiau kultūros, augintos terpėje su palatinoze, supernatanto antibakterinis aktyvumas yra dvigubai mažesnis (3.5 lentelė).

**3.5 lentelė.** OS įtaka *L. acidophilus* (LA) kamieno antibakteriniam aktyvumui. AU/ml – sutartiniai antibakterinio aktyvumo vienetai. OT<sub>590</sub> – kultūros optinis tankis, matuojant ties 590 nm bangos ilgiu. Anglies šaltinio koncentracija – 1 %.

| Laikas<br>(val.) | Gliukozė (K) |                   | Palatinozė |                   | Inulinas |                   |
|------------------|--------------|-------------------|------------|-------------------|----------|-------------------|
|                  | AU/ml        | OT <sub>590</sub> | AU/ml      | OT <sub>590</sub> | AU/ml    | OT <sub>590</sub> |
| 4                | 0            | 0,08              | 0          | 0,08              | 0        | 0,08              |
| 8                | 160          | 0,27              | 80         | 0,22              | 20       | 0,31              |
| 12               | 160          | 0,50              | 80         | 0,30              | 20       | 0,40              |
| 16               | 320          | 1,40              | 160        | 0,33              | 10       | 0,50              |
| 20               | 320          | 1,76              | 160        | 0,36              | 0        | 0,50              |
| 24               | 320          | 2,00              | 160        | 0,41              | 0        | 0,47              |
| 28               | 160          | 2,05              | 160        | 0,41              | 0        | 0,47              |
| 32               | 0            | 1,91              | 0          | 0,35              | 0        | 0,47              |

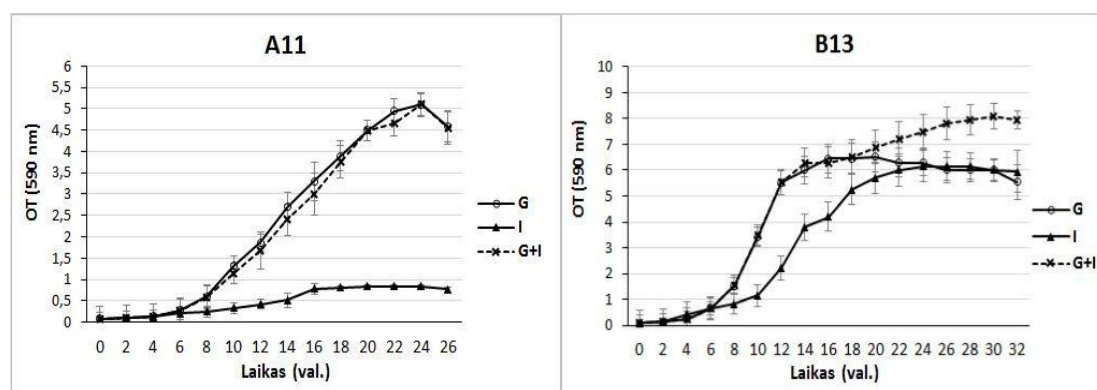
Lyginant pagal didžiausias terpėse su gliukoze ir su palatinoze pasiekiamas kultūros OT reikšmes, santykinis antibakterinis aktyvumas terpėje su palatinoze nustatomas net 2,5 karto didesnis nei gliukozės atveju (3.5 lentelė). Tai rodo, kad nors LA kamienas su palatinoze, kaip vieninteliu anglies šaltiniu, auga neefektyviai, tačiau vyksta žymiai intensyvesnė antibakterinių medžiagų produkcija nei gliukozės atveju. Tačiau bendras terpėje su palatinoze pasiekiamas aktyvumas (160 AU/ml) yra dvigubai mažesnis nei gliukozės atveju (320 AU/ml).

Po 12 LA kamieno augimo valandų ląstelių OT terpėse su gliukoze ir inulinu yra beveik vienodas (0,5 ir 0,4 atitinkamai), o antibakterinis terpės su inulinu aktyvumas yra 8 kartus mažesnis (3.5 lentelė). Po 16 augimo valandų terpėje su inulinu supernatantų antibakterinis aktyvumas sumažėja dvigubai, o po 20 augimo valandų – nepasireiškia. Pažymėtina, kad nors terpėse su inulinu ir palatinoze LA kamieno augimas, vertinant pagal kultūros optinį tankį, skiriasi nežymiai (1,25 karto), bet antibakterinis aktyvumas skiriasi ženkliai ir palatinozės atveju jis didesnis mažiausiai 4 kartus (3.5 lentelė).

### 3.1.7 Katabolinės represijos eksperimentai

Atlikti katabolinės represijos eksperimentai su tipiniais ir išskirtais kamienais, kuriuos auginant skystoje terpėje buvo aptiktas antibakterinis aktyvumas (A11, B13, LL2 ir LA; 3.1.6). Šiam tikslui minėti kamienai auginti terpėse su dviem anglies šaltiniais – gliukoze ir vienu iš tiriamų OS (inulinu, palatinoze arba CD). OS parinktas tas, su kuriuo tirtu kamieno atveju buvo nustatytas geriausias kultūros augimas ir/arba antibakterinis aktyvumas kultūros supernatante (3.1.5 ir 3.1.6). Eksperimento metu naudota gliukozės ir parinkto OS koncentracija terpėje – po 1 % (Pranckutė ir kt., 2016).

Lyginant B13 izoliato augimą su gliukoze ir dviem anglies šaltiniais (gliukoze ir inulinu), stebimas neryškus diauksinis augimas (3.7 pav.): iki 18-os augimo valandos, kuomet terpėje su gliukoze kultūra jau yra perėjusi į stacionariąją augimo fazę, kamienas terpėje su gliukoze ir terpėje su abiem anglies šaltiniais auga vienodai. Nuo 18-os augimo valandos terpėje su dviem anglies šaltiniais prasideda antroji eksponentinė augimo fazė, rodanti, kad kultūrai išsekvojus terpėje buvusią gliukozę, augimui palaikyti pradedamas naudoti inulinas. Literatūroje yra aprašytas *L. paracasei* 1195 kamieno diauksinis augimas terpėje su gliukoze ir fruktooligosacharidais (FOS) (Goh, 2007), o inulinas taip pat yra priskiriamas ilgos grandinės FOS (Gänzle ir Fallador, 2012; Mendlik ir kt., 2012).



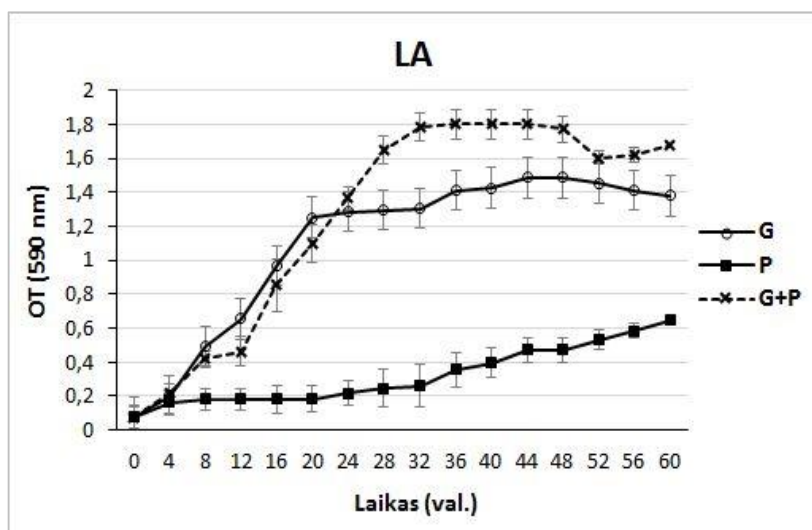
**3.7 pav.** Dviejų anglies šaltinių (gliukozės(G) ir inulino (I)) įtaka A11 ir B13 jogurtų izoliatų augimui. Kiekvieno anglies šaltinio koncentracija – po 1 %.

Tuo tarpu A11 jogurto izoliato atveju diauksija nebuvo stebima (3.7 pav.). Tiek auginant su gliukoze, tiek su dviem anglies šaltiniais (gliukoze ir inulinu) stebimi vienodi OT pokyčiai, rodantys, kad terpėje dar esant gliukoze, inulinas nėra skaidomas. A11 izoliatas inuliną įsisavina labai neefektyviai, todėl išaugus ląstelių tankiui augimo kartu su gliukoze metu, inulino įsisavinimo efektyvumas galėjo būti nepakankamas kultūros perėjimui į antrąjį eksponentinį augimą.

Antibakterinio aktyvumo tyrimo rezultatai atitinka jogurtų izoliatų augimą (3.7 pav.): A11 izoliato atveju, tiek auginant su gliukoze, tiek su gliukoze ir inulinu kartu, antibakterinis aktyvumas buvo aptinkamas nuo 20-os augimo valandos ir abiem atvejais siekė tik 10 AU/ml. B13 izoliato atveju, terpėje su gliukoze, 10 AU/ml antibakterinis aktyvumas buvo stebimas nuo 16-os augimo valandos ir toks išliko iki auginimo pabaigos. Tuo tarpu, terpėje su gliukoze ir inulinu, 10 AU/ml aktyvumas taip pat buvo stebimas nuo 16-os augimo valandos, tačiau nuo 24-os augimo valandos, kuomet kultūra perėjo į antrosios eksponentinės augimo fazės vidurį (3.7 pav.), padvigubėjo iki 20 AU/ml ir laikėsi iki auginimo pabaigos.

Auginant LA kamieną terpėje su dviem anglies šaltiniais, diauksinis augimas nebuvo stebimas, nors terpėje su gliukoze ir palatinoze buvo pasiektas didesnis OT (iki 1,8), nei auginant terpėje vien su gliukoze (OT iki 1,4) (3.8 pav.). Greičiausiai, LA kamienui augant terpėje su abiem anglies šaltiniais, palatinozės skaldymas prasideda dar neišeikvojus terpėje esančios gliukoze, todėl nėra stebima antroji logaritminė fazė (3.8 pav.). Nors literatūroje teigiama, kad LAB angliavandenių įsisavinimas yra valdomas hierarchiniu principu, tačiau kai kuriose *Lactobacillus* sp. bakterijose katabolinė represija pasireiškia ne visais atvejais ir kai kurie anglies šaltiniai gali būti asimiliuojami vienu metu su gliukoze (Sánchez ir kt., 2010; Gänzle ir Follador, 2012).



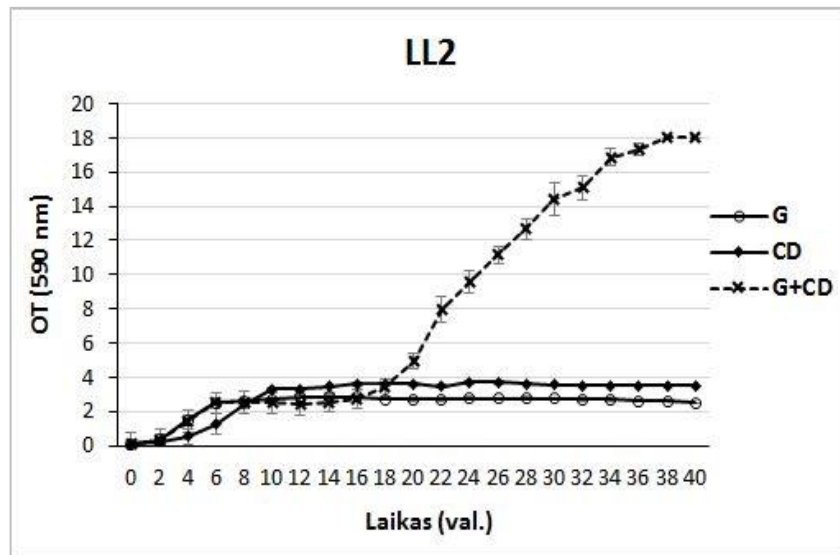


**3.8 pav.** Dviejų anglies šaltinių (gliukozės (G) ir palatinozės (P)) įtaka LA kamieno augimui. Kiekvieno anglies šaltinio koncentracija – 1 %.

Analizuojant kultūros supernatantų antibakterinį aktyvumą augimo metu, abiem atvejais (terpėje su gliukoze ir terpėje su dviem anglies šaltiniais (gliukoze ir palatinoze)) nebuvo nustatyta antibakterinio aktyvumo skirtumų: didžiausias antibakterinis aktyvumas (1280 AU/ml) buvo stebimas nuo 24-os augimo valandos ir toks išliko iki auginimo pabaigos.

Ryškiausias diauksinis augimas buvo stebimas auginant LL2 kamieną terpėje su gliukoze ir CD (3.9 pav.). Auginant šį kamieną tiek terpėje su gliukoze, tiek terpėje su CD, kaip vieninteliais anglies šaltiniais, viso auginimo metu (40 valandų) kultūros augimas išlieka panašus. Tuo tarpu, auginant LL2 kamieną terpėje su abiem minėtais OS, nuo 16-os augimo valandos, kuomet terpėse su vienu anglies šaltiniu ląstelės jau yra stacionaro fazėje, terpėje su abiem OS prasideda ryški eksponentinė fazė, kuri tęsiasi iki 38-os augimo valandos. Tai rodo, kad LL2 kamienas pirmiausiai suvartoja terpėje esančią gliukozę, o tik paskui – CD. Šio antrojo eksponentinio augimo metu pasiekiamas OT yra vidutiniškai 4,5 karto didesnis nei terpėse su vienu anglies šaltiniu. Gauti rezultatai rodo, kad augimo metu vyksta efektyvesnis CD skaldymas ir gautų produktų įsisavinimas. Šiuos rezultatus patvirtina ir literatūra, kurioje yra nurodoma, kad *L. lactis* kamienai gali įsisavinti oligodekstranus (PL nuo 3 iki 9)

geriau negu gliukozę (Grimoud ir kt., 2010), nors apie ciklinių dekstrinų poveikį šių bakterijų augimui nėra duomenų.



**3.9 pav.** Dviejų anglies šaltinių (gliukozės(G) ir  $\alpha$ -ciklodekstrino (CD)) įtaka LL2 kamieno augimui. Kiekvieno anglies šaltinio koncentracija – 1 %.

Antibakterinio aktyvumo tyrimai parodė, kad CD, kaip vienintelis anglies šaltinis, teigiamiausiai veikia LL2 kamieno antibakterinį aktyvumą: auginant LL2 kamieną su CD pasiekiamas dvigubai didesnis antibakterinis aktyvumas (iki 10240 AU/ml) nei terpėje su gliukoze ar abiem anglies šaltiniais (iki 5120 AU/ml), nors pastaruoju atveju pasiekiamas net 4,5 karto didesnis kultūros optinis tankis (3.9 pav.).

Gauti rezultatai rodo, kad, derinant gliukozę ir CD, galima stipriai padidinti LL2 kultūros pasiekiamą tankį, o tai yra labai svarbu siekiant panaudoti šias bakterijas kaip probiotikus maisto produktuose, nes produkto probiotinio statuso patvirtinimui jame turi būti ne mažiau nei  $10^7$  CFU/ml gyvybingų probiotinių bakterijų (Pan ir kt., 2009).

## **3.2 Termofilinio 118 kamieno tyrimai**

### **3.2.1 Termofilinio antibakteriniu aktyvumu pasižyminčio kamieno atranka**

Šiame darbe analizuotas kamienas, atrinktas iš Vilniaus universiteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kolekcijos. Šios kolekcijos kamienai buvo išskirti iš paviršinio dirvožemio, esančio virš naftos telkinio. Iš devynių mėginių buvo išskirti 68 termofiliniai izoliatai, gebantys augti 60 °C temperatūroje. Buvo atliktas mikroorganizmų dažymas Gramo būdu bei kalio šarmo testas, kurie parodė, kad visi 68 izoliatai yra gramteigiamos, lazdelės formos bakterijos. Įvertinus temperatūrinę augimo priklausomybę, nustatyta, kad kolekcijoje yra 19 fakultatyvinių ir 49 obligatinių termofilinių bakterijų kamienų (Pranckutė ir kt., 2015).

Atliekant antibakteriniu aktyvumu pasižyminčių kamienų atranką, izoliatai buvo testuojami užpylimo metodu (Hyronimus ir kt., 1998), jautriu kamieniu naudojant *G. stearothermophilus* NUB36187 (BGSC nr.: 9A11). Iš 68 kolekcijos izoliatų, 52 inhibavo jautraus kamieno augimą, suformuodami skaidrias inhibicines zonas. Taip pat įvertintas ir kamienų tarpusavio antagonizmas. Gauti rezultatai publikuoti straipsnyje (Pranckutė ir kt., 2015).

Tolesniems darbams pasirinktas vienas iš 7 kamienų, antibakterinio aktyvumo testų metu suformavusių didžiausio diametro inhibicines zonas. Šis kamienas (118) priskirtas fakultatyviniams termofilams (augimo ribos: 45-60 °C) (Pranckutė ir kt., 2015).

### **3.2.2 Dalinis termofilinio 118 kamieno identifikavimas**

Dalinis termofilinio 118 kamieno identifikavimas buvo atliktas lyginant 16S rDNR sekas NCBI duomenų bazėje. Pirmieji 10 didžiausių (99 %) panašumu pasižymėję NCBI BLAST analizės rezultatai buvo *Aeribacillus/Geobacillus pallidus* bei nekultivuojamų *Geobacillus* sp.

ribosominių genų sekos. Tuo remiantis galima teigti, kad termofilinis 118 kamienas yra artimiausias *Aeribacillus pallidus* rūšiai.

*Bacillus pallidus* sp. nov. pavadinimas pirmą kartą buvo suteiktas iš termiškai apdorotų nuotekų išskirtoms ir apibūdintoms termofilinėms *Bacillus* sp. bakterijoms (Scholz ir kt., 1987). Remiantis filogenetine analize bei kitomis charakteristikomis, pilnai atitinkančiomis *Geobacillus* sp. genties apibūdinimą (Nazina ir kt., 2001), 2004 m. buvo pasiūlyta *Bacillus pallidus* sp. nov. pervadinti *Geobacillus pallidus* comb. nov. su tipiniu kamieniu H12<sup>T</sup> (=ATCC 51176<sup>T</sup>=DSM 3670<sup>T</sup>=LMG 19006<sup>T</sup>) (Banat ir kt., 2004). Tačiau dėl filogenetinės analizės duomenų, riebalų rūgščių ir polinių lipidų profilių bei DNR G+C sąstato neatitikimų, 2010 metais *Geobacillus pallidus* comb. nov. pasiūlyta pervadinti *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov., su tipiniu kamieniu H12<sup>T</sup> (=ATCC 51176<sup>T</sup>=DSM 3670<sup>T</sup>=LMG 19006<sup>T</sup>) (Miñana-Galbis ir kt., 2010).

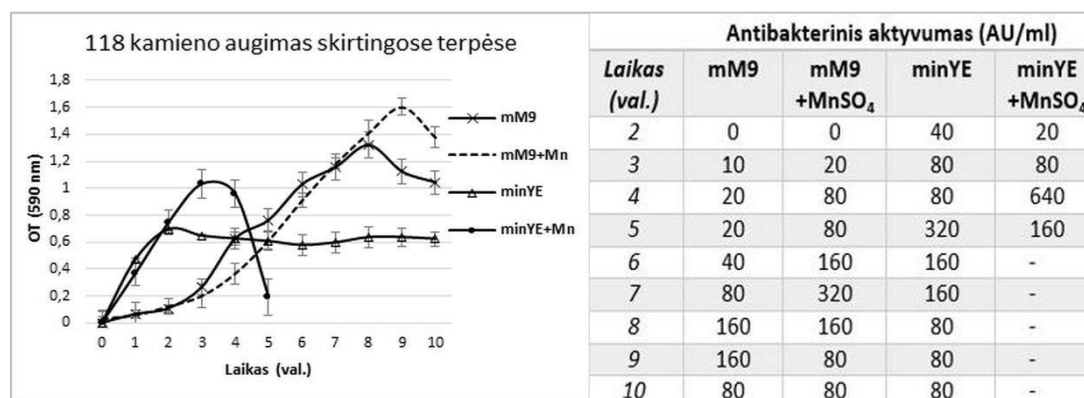
Bendradarbiaujant su Groningeno universitetu, buvo atlikta 118 kamieno genomo sekoskaita. Naudojantis RAST serveriu bei BAGEL3 programomis genomo sekoje buvo nustatytos numanomos dviejų bakteriocinų genų sekos. Detalesni duomenys pateikti straipsnyje (Kaunietis ir kt., 2016).

### **3.2.3 Termofilinio 118 kamieno kultivavimo sąlygų parinkimas**

Siekiant ištirti bakterijų sekretuojamą antibakterinę medžiagą, pirmiausiai reikia įvertinti tiriamo kamieno augimą ir parinkti tinkamą terpę bei kultivavimo sąlygas grubaus antibakterinio preparato išskyrimui (toliau GABP), nes yra žinoma, kad įvairūs aplinkos veiksniai turi įtakos antibakterinių medžiagų, tarp jų ir bakteriocinų, sekrecijai (Gautam ir Sharma, 2009; Anthony ir kt., 2009; O'Shea ir kt., 2012). Atsižvelgiant į tai, kad bus siekiama išskirti šią/šias antibakteriniu aktyvumu pasižyminčias medžiagas, buvo siekiama 118 kamieno auginimui parinkti terpę, kurios sudėtyje būtų kuo mažiau pašalinių baltymų. Minimali terpė taip pat naudinga siekiant sukurti bado sąlygas, nes yra žinoma, kad bakteriocinų produkcija yra indukuojama aplinkoje trūkstant

mitybinių medžiagų, kaip konkurencijos priemonė (Heng ir kt., 2007; Abriouel ir kt., 2011; Snyder ir Worobo, 2014; Egan ir kt., 2016). Todėl kamieno augimas ir antibakterinis aktyvumas tirti naudojant mineralinę mM9 terpę, kurios sudėtyje iš viso nėra baltymų, bei minimalią minYE terpę (2.3 lentelė).

Mitybinių medžiagų trūkumas indukuoja ir sporų formavimą. Yra žinoma, kad endosporas formuojančiose bakterijose sporuliacijos ir bakteriocinų sekrecijos valdymo sistemos gali būti susiję (Abriouel ir kt., 2011). Nuo seno yra žinoma, kad sporuliaciją *Bacillus* sp. bakterijose gali indukuoti divalenti mangano jonai, reikalingi tam tikrų anglies junginių metabolizme dalyvaujančių fermentų aktyvumui. Trūkstant mangano ląstelėje ima kauptis tarpiniai anglies junginių metabolizmo produktai, stabdantys sporuliacijos procesą (Vasantha ir Freese, 1979). Tuo remiantis 118 kamieno kultivavimui buvo panaudotas  $MnSO_4$  priedas, siekiant įvertinti, ar mangano jonai indukuoja šio kamieno sporuliaciją ir jos įtaką antibakteriniam aktyvumui. Kamieno kultivavimo eksperimentai atlikti abiejose terpėse, su ir be  $MnSO_4$  priedo. Gauti kultūros augimo ir antibakterinio aktyvumo rezultatai pateikti 3.10 pav.



**3.10 pav.** 118 kamieno augimo ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas skirtingose kultivavimo terpėse. Mn –  $MnSO_4$  priedas.

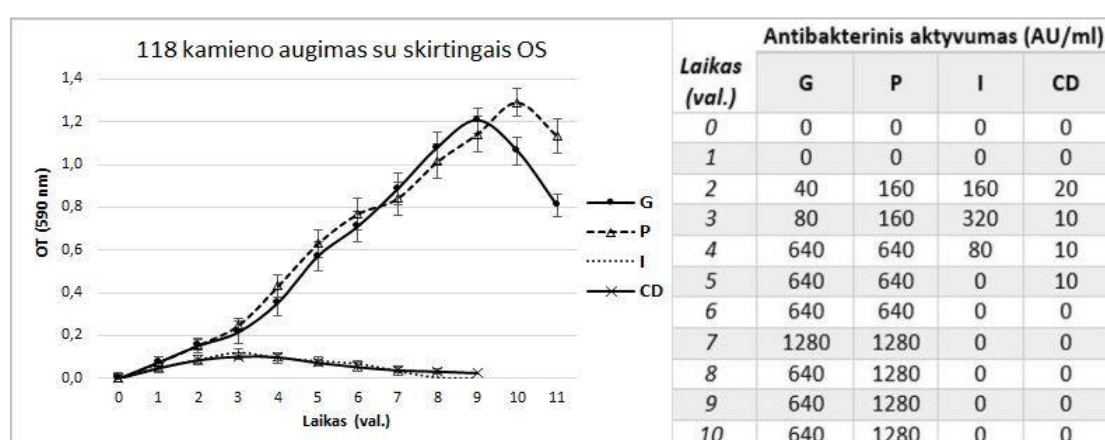
Kultivavimo eksperimentai parodė, kad tiriamas kamienas geba augti abiejose naudotose terpėse bei augimo metu sekretuoja antibakterinę/-es medžiagą/-as (3.10 pav.). Lyginant pagal kultūros pasiekiamą OT, auginant kamieną minYE terpėje buvo nustatomas didesnis antibakterinis aktyvumas, nei

mM9 terpės atvejais (3.10 pav.). Taip pat, iš grafike pateiktų rezultatų aiškiai matyti, kad minYE terpėje su  $MnSO_4$  eksponentinė augimo fazė trunka vos kelias valandas ir jau po 3-4 valandų kultūra pereina į stacionariąją augimo fazę (3.10 pav.). Sporuliacija indukuojama, kai išsekvojamos mitybinės medžiagos, ląstelėms pereinant iš eksponentinės į stacionarią augimo fazę (Sonenshein, 2000; Phillips ir Strauch, 2002; González-Pastor, 2010). Būtent šiuo kultūros augimo etapu nustatytos didžiausios antibakterinio aktyvumo reikšmės (3.10 pav.), rodančios, kad 118 kamieno antibakterinės medžiagos sekrecija yra teigiamai veikiama sporuliacijos indukcijos. mM9 terpės variantuose tokio ryškaus mangano poveikio augimo trukmei nenustatyta, galimai dėl itin minimalios terpės sudėties (2.3 lentelė). Tačiau mM9 terpėje su mangano priedu, padidėjęs antibakterinis aktyvumas stebimas anksčiau, nei terpėje be mangano (3.10 pav.). Šie duomenys patvirtina, kad mangano jonai indukuoja 118 kamieno sporuliaciją, kuri teigiamai veikia antibakterinės/-ių medžiagos/-ų produkciją. Efektyvesnė bakteriocinų sekrecija sporuliacijos metu parodyta ir kai kurių kitų endosporas formuojančių bakterijų atvejais (Abriouel ir kt., 2011; Touraki ir kt., 2012; Berić ir kt., 2014; Huang ir kt., 2016).

### **3.2.4 Oligosacharidų įtaka termofilinio 118 kamieno augimui ir antibakteriniam aktyvumui**

118 kamieno sekretuojama antibakterinė medžiaga tiriama siekiant nustatyti jos pritaikomumo maisto pramonėje potencialą. Todėl buvo atlikti kamieno kultivavimo tyrimai, anglies šaltiniais naudojant komercinius prebiotinius OS, siekiant įvertinti jų įtaką tiriamo kamieno augimui bei antibakteriniam aktyvumui. Tyrimai buvo atlikti naudojant mineralinę mM9 terpę (2.3 lentelė), su  $MnSO_4$  priedu. Terpės pasirinkimą lėmė jos minimali sudėtis bei ne tokia staigi eksponentinė augimo fazė, kaip minYE terpės atveju (3.10 pav.), kas leidžia tiksliau įvertinti vienintelio anglies šaltinio įtaką bakterijų augimui.

Auginant kamieną su OS – palatinoze, inulinu ir CD, bei gliukoze (kontrolė) – kaip vieninteliais anglies šaltiniais, nustatyta, kad tiriamas 118 kamienas iš naudotų OS efektyviai (vienodu efektyvumu, kaip gliukozę) įsisavina tik palatinozę (3.11 pav.). Didžiausias antibakterinis aktyvumas abiem atvejais nustatytas vienodas (iki 1280 AU/ml), tačiau terpėje su gliukoze ši reikšmė nustatyta tik 7 val. nuo augimo pradžios ir vėliau sumažėjo. Tuo tarpu terpėje su palatinoze maksimalus aktyvumas buvo pasiektas tuo pačiu laiku, tačiau išsilaikė iki pat augimo pabaigos (3.11 pav.).

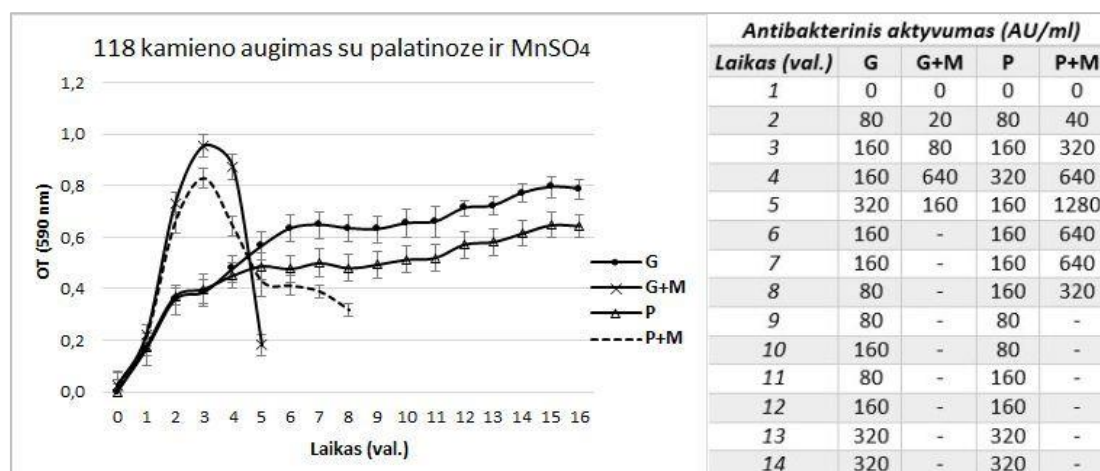


**3.11 pav.** 118 kamieno augimo ir antibakterinio aktyvumo rezultatai, kultivuojant kamieną mM9 terpėje su skirtingais anglies šaltiniais. G – gliukožė, P – palatinozė, I – inulinas, CD –  $\alpha$ -ciklodekstrinas. Anglies šaltinio koncentracija – 0,25 %.

118 kamienas visiškai neįsisavina inulino ir CD (kultivavimo metu kultūra pasiekia tik 0,1 OT), bet net tokio neefektyvaus augimo metu nuo 2-os iki 5-os kultivavimo valandos buvo aptinkamas antibakterinis aktyvumas (inulino atveju – iki 320 AU/ml, o CD atveju – vos 10 AU/ml) (3.11 pav.).

Remiantis šiais rezultatais, tyrimams su kita auginimo terpe (minYE), pasirinkta GABP išskyrimui (3.2.3), anglies šaltiniais naudotos tik gliukožė arba palatinozė. Kamieno augimo ir antibakterinio aktyvumo duomenys pateikti 3.12 paveiksle. Gauti rezultatai rodo, kad kamieno augimo tendencijos atitinkamuose terpių su gliukoze ir palatinoze variantuose atsikartoja ir kamienas geba įsisavinti palatinozę (didžiausios pasiekiamos OT reikšmės – 0,65 ir 0,83)

beveik tokiu pat efektyvumu, kaip gliukozę (didžiausios pasiekiamos OT reikšmės – atitinkamai 0,8 ir 0,95) (3.12 pav.).



**3.12 pav.** 118 kamieno augimo ir antibakterinio aktyvumo rezultatai, kultivuojant kamieną minYE terpėje su palatinoze (P), kaip anglies šaltiniu bei su arba be MnSO<sub>4</sub> priedo. Palyginimui atitinkami auginimo eksperimentai atlikti anglies šaltiniu naudojant gliukozę (G). Anglies šaltinio koncentracija – 0,25%.

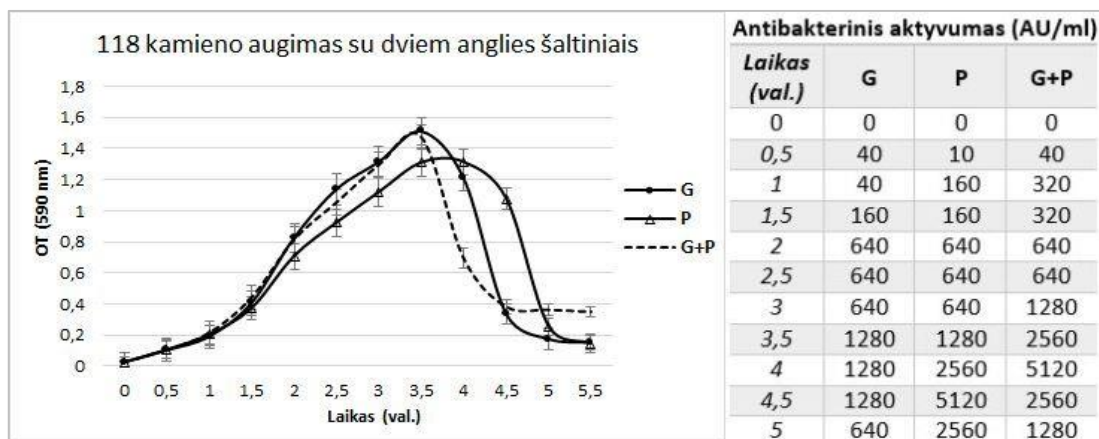
Antibakterinio aktyvumo įvertinimo rezultatai atkartoja OT pokyčių tendencijas (3.12 pav.). Pažymėtina, kad auginant 118 kamieną su palatinoze, kaip vieninteliu anglies šaltiniu, nustatytos didesnės antibakterinio aktyvumo reikšmės, nei gliukozės atvejais, atsižvelgiant į kultūros pasiekiamus optinius tankius šiuose terpių variantuose (3.12 pav.).

### 3.2.5 Katabolinės represijos eksperimentai

Taip pat buvo atliktas 118 kamieno kultivavimo tyrimas minYE terpėje su MnSO<sub>4</sub> priedu, anglies šaltiniu naudojant gliukozę ir palatinozę kartu (G+P). Palyginimui kamienas buvo paraleliai auginamas ir su pavieniais minėtais anglies šaltiniais. Auginant kamieną su abiem anglies šaltiniais, diauksinis augimas nepasireiškė ir OT reikšmės beveik nesiskyrė nuo nustatytų, auginant vien su gliukoze. Tačiau auginant su abiem anglies šaltiniais nustatytos didesnės antibakterinio aktyvumo reikšmės (3.13 pav.). Palatinozės, kaip vienintelio anglies šaltinio atveju, augimo tendencija atkartojo anksčiau aptartus variantus,



tik pasiektas nežymiai mažesnis maksimalus kultūros OT, o antibakterinio aktyvumo reikšmės nustatytos didesnės, nei vien su gliukoze, bet mažesnės, nei auginant su abiem anglies šaltiniais kartu, lyginant pagal kultūros pasiekiamą tankį (3.13 pav.).



**3.13 pav.** 118 kamieno katabolinės represijos augimo ir antibakterinio aktyvumo rezultatai. Naudota terpė – minYE su  $MnSO_4$  priedu. P – palatinozė, G – gliukozė. Kiekvieno anglies šaltinio koncentracija – po 0,25 %.

Remiantis atliktų termofilinio 118 kamieno kultivavimo ir antibakterinio aktyvumo tyrimų rezultatais, galima teigti, kad šis kamienas beveik vienodu efektyvumu įsisavina tiek gliukozę, tiek palatinozę, bet palatinozė gali padidinti 118 kamieno antibakterinės/-ių medžiagos/-ų sekreciją.

### 3.2.6 118 kamieno sekretuojamos/-ų antibakterinės/-ių medžiagos/-ų išskyrimas

Buvo daroma prielaida, kad tiriamo kamieno sekretuojama antibakterinė/-ės medžiaga/-os yra baltyminės kilmės, todėl grubaus antibakterinio baltymų preparato (GABP) gavimui buvo panaudota minYE terpė (2.3 lentelė), kurioje pašalinių baltymų kiekis yra labai nedidelis bei nustatytas efektyvus kamieno augimas ir antibakterinis aktyvumas (3.2.3). Antibakterinio aktyvumo įvertinimo šulinėlių metodu (2.13.2) pavyzdys pateiktas 3.14 paveiksle.



**3.14 pav.** Antibakterinio aktyvumo įvertinimo šulinėlių metodu pavyzdys. Šiuo atveju mėginio aktyvumas yra 1280 AU/ml.

Pramonėje gali būti taikomi ir neišgryninti bakteriocinai (Gálvez ir kt., 2007; Parada ir kt., 2007; Mills ir kt., 2011; Balciunas ir kt., 2013; Alvarez-Sieiro ir kt., 2016; López-Cuellar ir kt., 2016), todėl buvo siekiama įvertinti ar naudojamas anglies šaltinis bei sporuliacijos indukcija turi įtakos antibakterinės medžiagos savybėms baltymų mišinyje. Taip pat – nustatyti, ar skirtingi anglies šaltiniai bei sporuliacija neindukuoja papildomų baltyminės kilmės antibakterinių medžiagų sekrecijos. Šiam tikslui buvo išskirti keturi GABP variantai: auginant kultūrą su gliukoze arba palatinoze bei abiem atvejais – su arba be  $MnSO_4$ . Remiantis atliktais kultivavimo ir antibakterinio aktyvumo raiškos rezultatais (3.2.3 ir 3.2.4) bei literatūros duomenimis (Gillor ir kt., 2008; Gautam ir Sharma, 2009), GABP išskyrimui kultūra buvo auginama iki stacionarios augimo fazės pradžios. Baltymai iš kultūrų supernatantų išsodinti amonio sulfatu (2.14).

Po mėginių dializės ir koncentravimo, buvo įvertintas gautų GABP mėginių baltymų koncentracija (Bradford metodu) ir antibakterinis aktyvumas (šulinėlių metodu, 2.13.2). Duomenys pateikti 3.6 lentelėje.

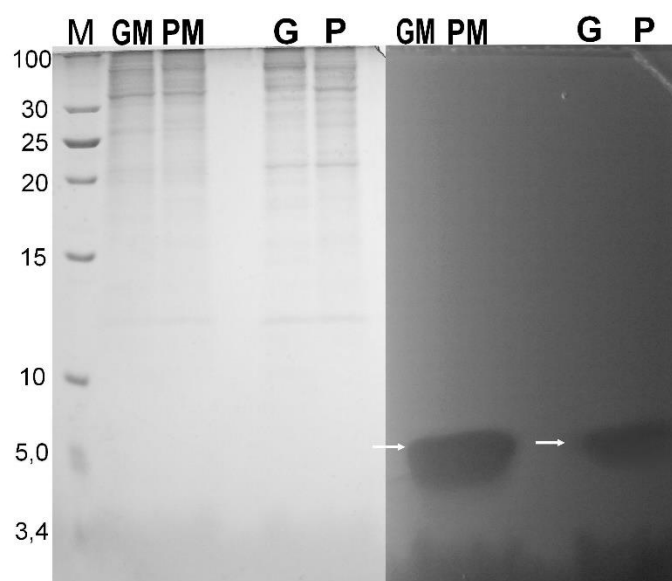
**3.6 lentelė.** 118 kamieno GABP mėginių baltymų koncentracija ir antibakterinis aktyvumas. G ir P – žymi naudotą anglies šaltinį (gliukozė arba palatinozė), M – žymi  $MnSO_4$  druskos priedą.

| Mėginys                          | G     | GM    | P     | PM    |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Baltymų koncentracija (mg/ml)    | 21,52 | 15,39 | 18,02 | 20,65 |
| Antibakterinis aktyvumas (AU/ml) | 40960 | 40960 | 20480 | 40960 |

Visuose GABP mėginiuose nustatyta panaši baltymų koncentracija (3.6 lentelė). Nors GM mėginyje baltymų koncentracija nustatyta mažiausia, tačiau antibakterinis mėginio aktyvumas prilygsta nustatytam kituose mėginiuose. Mažesnis P mėginyje nustatytas antibakterinis aktyvumas greičiausiai nėra reikšmingas ir nulemtas vertinimo paklaidos.

### 3.2.7 118 kamieno sekretuojamos/-ų antibakterinės/ių medžiagos/-ų skaičiaus ir molekulinės masės nustatymas

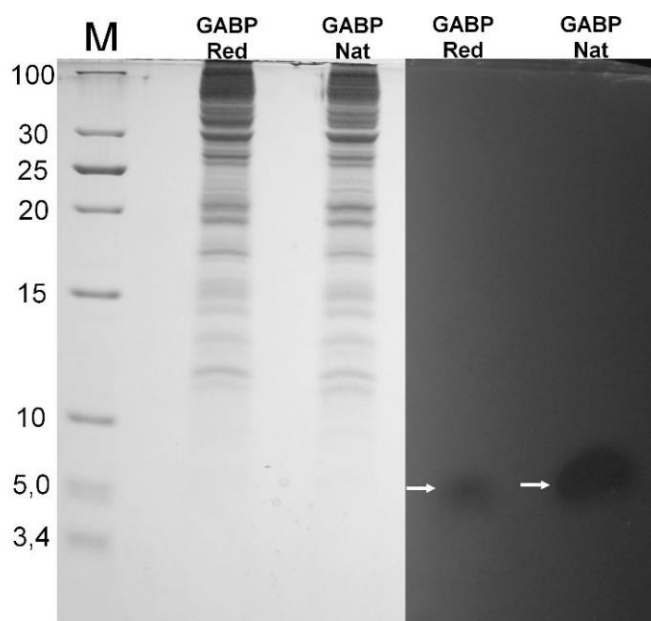
Siekiant įvertinti, ar naudojamas anglies šaltinis bei sporuliacijos indukcija turi įtakos 118 kamieno sekretuojamų antibakterinių medžiagų skaičiui, T-NDS-PAGE metodu buvo išfrakcionuoti visi 4 skirtingomis auginimo sąlygomis išskirti GABP mėginiai (3.2.6). Gauti baltymų profiliai ir zimograma pateikta 3.15 paveiksle.



**3.15 pav.** Skirtingų 118 kamieno GABP mėginių analizė T-NDS-PAGE ir zimografijos metodais. Kairėje – gelio dalis, dažyta PageBlue dažu, dešinėje – zimograma. Naudotas molekulinės masės žymuo (M) – „PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder“ (dešinėje nurodyti dydžiai, kDa). Viršuje sužymėti mėginių variantai: G ir P žymi naudotą anglies šaltinį (gliukozė arba palatinozė), M –  $MnSO_4$  priedas kultivavimo terpėje. Rodyklės žymi inhibicines zonas zimogramoje.

Gauti skirtingi GABP su ir be  $MnSO_4$  baltymų profiliai patvirtina, kad mangano jonai indukuoja 118 kamieno sporuliaciją, kurios metu ląstelės metabolizmas bei genų raiška, o atitinkamai – ir baltymų sekretomas, ženkliai pasikeičia (Phillips ir Strauch, 2002; Egan ir kt., 2016). Nustatyta, kad tiek naudojant skirtingus anglies šaltinius, tiek indukavus sporuliaciją, 118 kamienas sekretuoja vieną antibakterinę medžiagą, kurios molekulinė masė yra maždaug 5 kDa. Tai atitinka literatūroje nurodomą bakteriocinams būdingą molekulinę masę (1.3.1).

Taip pat, T-NDS-PAGE ir zimografijos metodais įvertintas reduktoriaus poveikis tiriamos antibakterinės medžiagos aktyvumui. Baltymų elektroforezėje buvo frakcionuota po du GABP mėginių variantus: po vieną – natyviomis sąlygomis, bei po vieną – redukuojančiomis sąlygomis. Viena gelio dalis dažyta Page Blue dažu, kita – panaudota zimogramai. Gauti rezultatai pateikti 3.16 paveiksle.



**3.16 pav.** 118 kamieno antibakterinės medžiagos molekulinės masės bei atsparumo reduktoriams įvertinimas T-NDS-PAGE ir zimografijos metodais. Kairėje – gelio dalis, dažyta PageBlue dažu, dešinėje – zimograma. Naudotas molekulinės masės žymuo (M) – „PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder“ (dešinėje nurodyti dydžiai, kDa). Viršuje sužymėti mėginių variantai: Red – redukuojančios, Nat – natyvios sąlygos. Rodyklės žymi inhibicines zonas zimogramoje.

Redukuojančiose sąlygose zimogramoje stebima žymiai mažesnė inhibicinė zona, nors baltymų koncentracijos mėginiuose buvo ruošiamos vienodos (3.6 lentelė). Tai rodo, kad tirama antibakterinė medžiaga savo struktūroje galimai turi disulfidinių tiltelių, svarbių antibakterinio aktyvumo pasireiškimui.

### **3.2.8 118 kamieno sekretuojamos antibakterinės medžiagos fizikocheminių savybių įvertinimas**

Remiantis 3.2.7 rezultatais, 118 kamieno sekretuojamos antibakterinės medžiagos fizikocheminių savybių įvertinimui naudotas tik vienas GABP mėginys (GM), kuriame atsižvelgiant į baltymų koncentraciją nustatyta didžiausia antibakterinio aktyvumo reikšmė (3.6 lentelė).

#### **3.2.8.1 Fermentų poveikis GABP antibakteriniam aktyvumui**

Buvo įvertinta proteoliziniu, lipoliziniu bei amiloliziniu aktyvumais pasižyminčių fermentų įtaka GABP mėginių aktyvumui. Proteinazė K ir pronazė E beveik visiškai panaikino GABP antibakterinį aktyvumą, o ficinas bei papainas aktyvumą sumažino dvigubai (3.7 lentelė). Kadangi minėti fermentai pasižymi proteoliziniu aktyvumu, gauti duomenys patvirtina tiriamos antibakterinės medžiagos baltyminę prigimtį.

Kiti naudoti proteoliziniai fermentai (tripsinas bei  $\alpha$ - ir  $\beta$ -chimotripsinai) neturėjo įtakos antibakteriniam aktyvumui. Tai gali būti paaiškinama tuo, kad, kaip minėta anksčiau, bakteriocinai, kuriems galimai priklauso tirama antibakterinė medžiaga, dažniausiai yra nedidelės molekulinės masės peptidai, o minėti fermentai pasižymi didesniu savitumu, nei proteinazė K bei pronazė E, todėl tiriamo peptido seka galėjo būti nepakankamai ilga, kad joje susidarytų tripsino ir chimotripsinų aktyvumui reikalingos skėlimo sekos.

**3.7 lentelė.** Fermentų poveikis GABP antibakteriniam aktyvumui.

| <b>Fermentas</b>         | <b>Likęs GABP aktyvumas (%)</b> |
|--------------------------|---------------------------------|
| Kontrolė                 | 100                             |
| Proteinazė K             | 0,016                           |
| Pronazė E                | 0,004                           |
| $\alpha$ -chimotripsinas | 100                             |
| $\beta$ -chimotripsinas  | 100                             |
| Tripsinas                | 100                             |
| Ficinas                  | 50                              |
| Papainas                 | 50                              |
| Lipazė                   | 100                             |
| $\alpha$ -amilazė        | 100                             |

Nei lipazė, nei  $\alpha$ -amilazė neturėjo įtakos antibakteriniam aktyvumui (3.7 lentelė). Tai rodo, kad tiriamos antibakterinės medžiagos sekoje nėra aktyvumo pasireiškimui būtinų lipidinių ar angliavandenių struktūrinių elementų. Remiantis šiais rezultatais ir galima daryti prielaidą, kad 118 kamieno sekretuojama antibakterinė medžiaga yra bakteriocinas arba peptidinis antibiotikas.

### **3.2.8.2 Temperatūrų poveikis GABP antibakteriniam aktyvumui**

Maisto pramonėje ypatingai aktualus naudojamos bioaktyvios medžiagos stabilumas įvairiose temperatūrose. Todėl buvo įvertinta įvairių temperatūrų įtaka tiriamos antibakterinės medžiagos aktyvumui.

Nustatyta, kad 118 kamieno sekretuojama antibakterinė medžiaga yra termostabili (3.8 lentelė): GABP išlaikė 100 % aktyvumą temperatūrų intervale nuo 70 iki 100 °C. Maisto produktų pasterizavimui dažniausiai naudojamos 70-80 °C temperatūros (Gautam ir Sharma, 2009).

**3.8 lentelė.** Įvairių temperatūrų poveikis GABP antibakteriniam aktyvumui.

| <b>Temperatūra, °C</b> | <b>Inkubavimo laikas</b> | <b>Likęs GABP aktyvumas (%)</b> |
|------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Kontrolė               | -                        | 100                             |
| -20                    | 2 sav.                   | 100                             |
| 4                      | 2 sav.                   | 100                             |
| 70                     | 30 min.                  | 100                             |
| 80                     | 30 min.                  | 100                             |
| 90                     | 30 min.                  | 100                             |
| 100                    | 30 min.                  | 100                             |
| 121                    | 15 min.                  | 12,5                            |
| 121                    | 30 min.                  | 6,75                            |

Pažymėtina, kad visi mėginiai išlaiko dalį aktyvumo (iki 12,5 %) net po autoklavavimo 121°C, 15 bei 30 min. (3.8 lentelė), todėl tirama antibakterinė medžiaga būtų tinkama pritaikymui trumpą laiką ultra aukštomis temperatūromis sterilizuojamų maisto produktų (pavyzdžiui, UAT pieno ar konservuojamų maisto produktų) (Egan ir kt., 2016) apsaugai ir/arba galiojimo laiko prailginimui.

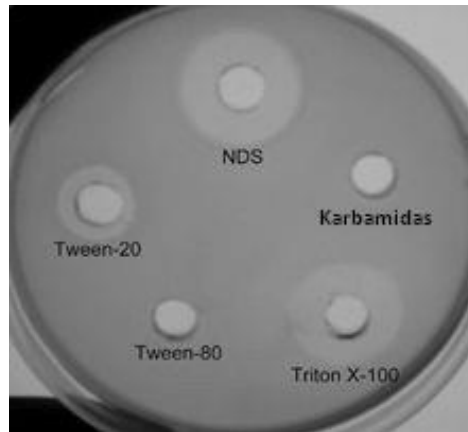
### **3.2.8.3 pH ir detergentų poveikis GABP antibakteriniam aktyvumui**

Maisto produktų pramonėje pH reikšmės būna labai įvairios, todėl svarbu, kad bioaktyvios medžiagos būtų atsparios pH pokyčiams (Gautam ir Sharma, 2009; Balciunas ir kt., 2013). Todėl buvo įvertintas tiriamos antibakterinės medžiagos stabilumas pH ribose nuo 3 iki 10. Nustatyta, kad minėtose pH ribose išlaikomas 100 % GABP aktyvumas.

Buvo vertinamas ir detergentų poveikis GABP aktyvumui, nes kai kurie jų naudojami maisto pramonėje (Food Safety Commission, 2007; EFSA, 2012). Be to, detergentai naudojami kartu su bakteriociniais, nes padidina jų antibakterinį efektą ir poveikio spektrą (Gänzle ir kt., 2000; Cleveland ir kt.,

2001). Taikymui maisto pramonėje net išleisti bakteriocinų derinimo su emulsikliais patentai (Blackburn ir De La Harpe, 1999; Liang ir kt., 2005).

Nustatyta, kad kai kurie iš naudotų detergentų patys inhibuoja jautraus 9A11 kamieno augimą (3.15 pav.), todėl tyrimams su GABP naudoti tik karbamidas ir Tween-80.



**3.15 pav.** Detergentų poveikis jautraus 9A11 kamieno ląstelėms.

Paveikus GABP mėginius Tween-80, inhibicinių zonų diametras nustatytas didesnis, nei kontroliniame mišinyje, nors vertinant sutartiniais aktyvumo vienetais, duomenys abiem atvejais sutapo ir atitiko 20480 AU/ml. Literatūroje dažnai minima, kad emulsikliai, tarp jų ir Tween-80, gali pagerinti hidrofobinių bakteriocinų tirpumą ir tokiu būdu – padidinti jų aktyvumą (Gänzle ir kt., 2000). Teigiama Tween-80 įtaka bakteriocinų aktyvumui parodyta ir kituose tyrimuose (Ogunbanwo ir kt., 2003; El-Shouny ir kt., 2013).

Nustatyta, kad karbamidas ir Tween-80 neturi neigiamos įtakos 118 kamieno sekretuojamos antibakterinės medžiagos aktyvumui, o tai yra naudinga, siekiant pritaikyti šią medžiagą maisto pramonėje ar žemės ūkyje, nes Tween-80 yra naudojamas įvairiuose maisto produktuose kaip emulsiklis (Food Safety Commission, 2007) ir dažnai derinamas su bakteriociniais (Blackburn ir De La Harpe, 1999; Liang ir kt., 2005), o karbamidas naudojamas kaip atrajojančių gyvulių pašarų priedas (EFSA, 2012).

Remiantis nustatyta 118 kamieno sekretuojamos antibakterinės medžiagos molekuline mase, fizikocheminėmis savybėmis, jautrumu



reduktoriams bei antibakterinio aktyvumo raiška eksponentinio augimo metu, galima daryti prielaidą, kad tiriamą medžiagą yra bakteriocinas, galintis priklausyti I-ai arba II-ai bakteriocinų klasėms (Heng ir kt., 2007; Perez ir kt., 2014; Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017). Panašūs duomenys gauti tiriant ir kai kurių kitų termotolerantinių bei termofilinių bakterijų sekretuojamus bakteriocinus, kaip termofiliną 1277 (Kabuki ir kt., 2007) ir termofiliną 347 (Vilani ir kt., 1995) bei *G. stearothermophilus* kamienų sekretuojamus bakteriocinus (Pokusaeva ir kt., 2009) (Priedas Nr. 1).

### **3.3 Antibakterinio aktyvumo spektrų tyrimai**

#### **3.3.1 Oligosacharidų įtakos pienarūgščių bakterijų antibakterinio aktyvumo spektrams tyrimai**

Atlikta kultūrų, augintų su tirtais komerciniais OS (palatinoze, inulinu arba CD) (2.4), supernatantų antibakterinio aktyvumo analizė prieš maisto produktuose sutinkamus patogenus. Tirti jogurtų izoliatai (A11 ir B13) bei tipiniai (LL2 ir LA) kamienai (2.1 lentelė), kurie pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu auginant skystoje terpėje su minėtais OS (3.1.6). Naudoti kultūrų supernatantai, gauti su tais OS, kuriuos naudojant kaip anglies šaltinius minėtų kamienų kultivavimui, buvo nustatytas antibakterinis aktyvumas (3.1.6). Analizė atlikta šulinėlių metodu. Tyrimo rezultatai apibendrinti 3.11 lentelėje. Pateikti tik tie patogeninių bakterijų kamienai, kurių augimą inhibavo bent vienas iš tirtų LAB mėginių.

Visų tirtų LAB kultūrų supernatantai pasižymėjo antibakteriniu poveikiu prieš *Bacillus cereus* DSM 12001 bei *Streptococcus pyogenes* MPK 2331 bakterijas. Nors tyrimui buvo panaudoti du *B. cereus* kamienai (2.2 lentelė), tačiau tirti LAB kamienai inhibavo tik *B. cereus* DSM 12001 bakterijų augimą. Antibakteriniu poveikiu prieš šį kamieną pasižymėjo tik supernatantai, gauti auginant kultūras skystoje terpėje su gliukoze, o LL2 kamieno atveju – ir su CD, kaip vieninteliais anglies šaltiniais (3.11 lentelė). Tuo tarpu *S. pyogenes* kamieno augimą inhibavo supernatantai, gauti auginant kultūras tiek su gliukoze, tiek su

tirtais OS (3.11 lentelė). Literatūroje rasta duomenų tik apie *L. acidophilus* aktyvumą prieš *S. pyogenes* bakterijas (Bharal ir Sophal, 2013; Abdulla, 2014). Šių patogeninių bakterijų rūšies taip pat naudoti du kamienai, tačiau tik LL2 kamieno supernatantai skirtingu stiprumu inhibavo abiejų tirtų *S. pyogenes* kamienų augimą (3.11 lentelė). Literatūroje yra parodyta, kad pačių patogeninių bakterijų jautrumas bakteriocinams gali varijuoti net tarp tos pačios rūšies skirtingų kamienų (Meghrous ir kt., 1999; Swetwivathana ir kt., 2009; Saraiva ir kt., 2014; Inglin ir kt., 2015).

**3.11 lentelė.** Išskirtų ir tipinių kamienų, augintų skystoje terpėje su skirtingais OS, supernatantų poveikis patogeninėms bakterijoms. „-“ – antibakterinis aktyvumas nebuvo nustatytas. G – gliukozė, P – palatinozė, I – inulinas, CD –  $\alpha$ -ciklodekstrinas.

| Testuojamas kamienas                     | Antibakterinis aktyvumas (AU/ml) |    |     |    |     |    |     |     |
|--|----------------------------------|----|-----|----|-----|----|-----|-----|
|  | A11                              |    | B13 |    | LA  |    | LL2 |     |
|  | G                                | I  | G   | I  | G   | P  | G   | CD  |
| <b>Naudotas mėginys</b>                  |                                  |    |     |    |     |    |     |     |
| <b>Patogenas</b>                         |                                  |    |     |    |     |    |     |     |
| <i>Bacillus cereus</i> DSM 12001         | 10                               | -  | 10  | -  | 10  | -  | 20  | 40  |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212  | 10                               | -  | -   | -  | -   | -  | 20  | 80  |
| <i>Enterococcus faecium</i> 402-3/03     | -                                | -  | -   | -  | -   | -  | 20  | 40  |
| <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434   | 10                               | -  | -   | -  | -   | -  | 20  | 80  |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117 | -                                | -  | 10  | -  | -   | -  | 40  | 40  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | -                                | -  | -   | -  | 20  | -  | -   | -   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923  | -                                | -  | -   | -  | -   | -  | 10  | 80  |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 | -                                | -  | -   | -  | -   | -  | 80  | 80  |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> MPK 2331   | 10                               | 10 | 40  | 40 | 160 | 20 | 640 | 640 |

Nei vienas iš LAB mėginių nepasižymėjo antibakteriniu poveikiu prieš *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ir *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 bakterijas (2.2 lentelė). Literatūroje dažnai minima, kad LAB dažniausiai nepasižymi aktyvumu prieš gramneigiamas bakterijas (Mills ir kt., 2011; Maina ir kt., 2017), bet yra ir išimčių (priedas Nr.2).

LL2 kamieno supernatantai, gauti auginant kultūrą skystoje terpėje su gliukoze ir su CD, kaip vieninteliais anglies šaltiniais, buvo aktyvūs prieš visas kitas naudotas gramteigiamas patogenines bakterijas (bent vieną iš naudotų kamienų) (2.2 lentelė). Pažymėtina, kad LL2 kamieno kultūros supernatantas, gautas auginant kamieną su CD, beveik visais atvejais patogeninių bakterijų augimą inhibavo du ar net keturis kartus stipriau, nei terpės su gliukoze kultūros supernatantas (3.11 lentelė).

LA kamieno supernatantas, gautas auginant kultūrą su gliukoze, pasižymėjo nedideliu aktyvumu (10 AU/ml) prieš *B. cereus* DSM 12001 bei vienintelis iš tirtų kamienų inhibavo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (20 AU/ml) bakterijas. Tuo tarpu, *S. pyogenes* MPK 2331 bakterijas LA kamieno mėginys, gautas auginant kultūrą su gliukoze, inhibavo žymiai stipriau (160 AU/ml). Pažymėtina, kad LA kultūros su P supernatantas taip pat pasižymėjo nedideliu antibakteriniu aktyvumu (20 AU/ml) prieš šias bakterijas (3.11 lentelė). Šis antibakterinio aktyvumo skirtumas gali būti paaiškintas mažu LA kamieno P įsisavinimo efektyvumu, todėl atitinkamai ir mažesniu nei gliukozės atveju antibakteriniu mėginio aktyvumu (3.1.6). Dėl to, P mėginio aktyvumas prieš patogenus, kuriuos inhibavo LA mėginiai su gliukoze (3.11 lentelė), galėjo būti nepakankamas vizualiam pasireiškimui.

Analizuojant darbo eigoje išskirtų jogurtų izoliatų supernatantų aktyvumą prieš patogenines bakterijas, nustatyta, kad A11 kamieno supernatantas iš kultūros, augintos su gliukoze, papildomai inhibavo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 bei *Enterococcus faecium* ATCC 19434 bakterijų augimą. *E. faecium* bakterijų taip pat naudoti du kamienai, tačiau A11 mėginiai pasižymėjo aktyvumu tik prieš vieną iš jų (3.11 lentelė). Atsižvelgiant į nustatytas mažas A11 kamieno mėginių antibakterinio aktyvumo reikšmes (3.11 lentelė), tokio aktyvumo galėjo nepakakti vizualiai išraiškai prieš antrąjį naudotą *E. faecium* kamieną, kurie tarpusavyje galėjo skirtis jautrumu A11 izoliato sekretuojamai antibakterinei medžiagai.

B13 izoliato supernatantas iš kultūros, augintos su gliukoze, papildomai nedideliu aktyvumu inhibavo *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 patogeninių bakterijų augimą (3.11 lentelė). Skirtingoms grupėms priklausančių jogurtų izoliatų antibakterinio aktyvumo spektrų skirtumai patvirtina, kad minėtos izoliatų grupės atstovauja skirtingus kamienus, nes literatūroje yra aprašyti atvejai, rodantys, kad antibakterinio aktyvumo spektrai gali varijuoti ir kamienų lygmenyje (Moreno ir kt., 2000; Abdulla, 2014; Nuryshev ir kt., 2016).

3.12 lentelėje pateiktas šiame darbe nustatyto tirtų kamienų antibakterinių aktyvumo spektrų palyginimas su literatūros duomenimis (Priedas Nr.2). Remiantis literatūros duomenimis, prieš patogenines bakterijas testuoti LAB kamienai daugumoje atvejų turėtų pasižymėti žymiai platesniu antibakterinio aktyvumo spektru (3.12 lentelė, priedas Nr. 2). Nustatytų ir literatūroje aprašytų antibakterinio aktyvumo spektrų skirtumus galėjo lemti naudotų patogeninių bakterijų bei šiame darbe tirtų (2.2 lentelė) ir literatūroje aprašytų (Priedas Nr. 2) kamienų neatitikimai.

Visais atvejais antibakterinis aktyvumas prieš patogenines bakterijas buvo nustatytas labai nedidelis (3.11 lentelė), lyginant su nustatytu kitų eksperimentų metu (3.1.6). Tai rodo, kad patogeninės bakterijos pasižymi silpnesniu jautrumu tirtų kamienų sekretuojamoms antibakterinės medžiagoms, nei kituose antibakterinio aktyvumo tyrimuose naudoti jautrūs kamienai (3.1.6). Tai iš dalies paaiškina, kodėl siauresnis antibakterinis spektras buvo nustatytas naudojant kultūrų supernatantus, gautus auginant kamienus skystoje terpėje su OS, nei supernatantų su gliukoze atvejais (3.11 lentelė), nes ir kitų tyrimų atveju, dėl kamienų negebėjimo efektyviai įsisavinti OS, bendras mėginių antibakterinis aktyvumas buvo nustatomas mažesnis nei gliukozės atveju (3.1.6).

**3.12 lentelė.** Šiame darbe tirtų LAB kamienų ir atitinkamų rūšių antibakterinio aktyvumo spektrų palyginimas. Ties bakterijų rūšimi pažymėtas literatūroje nurodomas tos rūšies antibakterinis aktyvumas, ties sutrumpintais kamienų pavadinimais – šiame darbe nustatytas tirtų kamienų ir izoliatų antibakterinis aktyvumas. „K“ - literatūroje aprašytas inhibuojamų patogeninių bakterijų kamienas sutampa su naudotu šiame darbe; „R“ - literatūroje naudotas kitas atitinkamos rūšies kamienas; „X“ - literatūroje yra ir teigiamų, ir neigiamų rezultatų; „-“ – inhibicinis poveikis nenustatytas. ND – nerasta duomenų.

| <b>Antibakteriniai LAB spektrai</b>                       |                                  |            |            |                           |           |  |            |
|---|----------------------------------|------------|------------|---------------------------|-----------|--|------------|
| <b>Šiame darbe naudoti patogeninių bakterijų kamienai</b> | <i>L. casei/<br/>L.paracasei</i> | <b>A11</b> | <b>B13</b> | <i>L.<br/>acidophilus</i> | <b>LA</b> | <i>L. lactis<br/>subsp.<br/>lactis</i> | <b>LL2</b> |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778                         | K                                | -          | -          | K                         | -         | K                                      | -          |
| <i>Bacillus cereus</i> DSM 12001                          | R                                | R          | R          | R                         | R         | R                                      | R          |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633                        | X                                | -          | -          | R                         | -         | R                                      | -          |
| <i>Clostridium perfringens</i>                            | ND                               | -          | -          | ND                        | -         | R                                      | -          |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212                   | R                                | R          | -          | ND                        | -         | R                                      | R          |
| <i>Enterococcus faecium</i> 402-3/03                      | R                                | -          | -          | ND                        | -         | R                                      | R          |
| <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434                    | R                                | R          | -          | ND                        | -         | R                                      | R          |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117                  | R                                | -          | -          | X                         | -         | K                                      | R          |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923                   | K                                | -          | -          | R                         | -         | K                                      | R          |
| <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA                         | ND                               | -          | -          | R                         | -         | R                                      | -          |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615                  | ND                               | -          | -          | R                         | -         | ND                                     | R          |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> MPK 2331                    | ND                               | R          | -          | R                         | R         | ND                                     | R          |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883                   | R                                | -          | -          | R                         | -         | ND                                     | -          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853                  | K                                | -          | -          | K                         | R         | K                                      | -          |
| <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076                  | K                                | -          | -          | R                         | -         | ND                                     | -          |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028                  | ND                               | -          | -          | R                         | -         | X                                      | -          |

Pažymėtina, kad literatūroje nerasta duomenų nei apie *L. paracasei*, nei *L. lactis* subsp. *lactis* kamienų aktyvumą prieš *S. pyogenes* bakterijas (3.12 lentelė, priedas Nr. 2). Be to, A11 ir B13 izoliatų antibakterinis aktyvumas ir kitų eksperimentų metu buvo labai nežymus, ir tokio aktyvumo galėjo nepakakti pilno antibakterinio spektro įvertinimui (3.1.6). Kita vertus, tyrime, kuriame aprašyti šiame darbe naudoti *L. paracasei* ATCC 344 bakteriocinams specifiniai pradmenys (Kuo ir kt., 2013), šių bakteriocinų sąlygotas antibakterinis spektras nustatytas net siauresnis, nei šiame darbe. O PGR metodu buvo parodyta, kad A

ir B grupių jogurtų izoliatų antibakterinį aktyvumą greičiausiai lemia minėtų bakteriocinų sekrecija (3.1.4).

### 3.3.2 Termofilinio 118 kamieno antibakterinio aktyvumo spektro tyrimai

Buvo įvertintas 118 kamieno bakteriocino poveikis per maistą plintančių patogenų augimui. 3.13 lentelėje pateikti antibakterinio aktyvumo duomenys tų atvejų, kuomet buvo nustatytas inhibicinis poveikis patogeninėms bakterijoms.

3.13 lentelė. 118 kamieno GABP aktyvumas prieš patogenines bakterijas.

| Jautrus patogeninių bakterijų kamienas  | GABP antibakterinis aktyvumas (AU/ml) |
|---|---------------------------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778       | 20                                    |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 10                                    |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 10                                    |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> MPK 2331  | 40                                    |

Visais atvejais nustatytas labai nedidelis antibakterinis GABP aktyvumas (iki 40 AU/ml), kurį, kaip ir LAB atveju (3.3.1), galėjo lemti mažesnis patogeninių bakterijų jautrumumas 118 kamieno sekretuojamam bakteriocinui, lyginant su GABP aktyvumo įvertinimui (3.6 lentelė) naudotu, didžiausiu jautrumu 118 kamienui pasižymėjusiu *G. stearothermophilus* 9A11 kamieniu (3.2.1).

Tyrimo metu nustatytas 118 kamieno sekretuojamo bakteriocino aktyvumas prieš 4 (3.13 lentelė) iš 16-os naudotų patogeninių bakterijų kamienų (2.2 lentelė). Siauras antibakterinio aktyvumo spektras yra būdingas bakteriocinams (Heng ir kt., 2007; Gillor ir kt., 2008; Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017). Nors tyrimuose naudota po du skirtingus *S. aureus*, *S. pyogenes* bei *B. cereus* kamienus (2.2 lentelė), bet aktyvumas nustatytas tik prieš vieną iš jų (3.13 lentelė), greičiausiai, dėl jau minėto (3.3.1) galimo skirtingo tos pačios rūšies

patogeninių bakterijų kamienų jautrumo bakteriocinams (Meghrous ir kt., 1999; Swetwivathana ir kt., 2009; Saraiva ir kt., 2014; Inglin ir kt., 2015).

Literatūroje nėra aprašytų *Aeribacillus pallidus* (ar kitų anksčiau vartotų šios rūšies pavadinimų), kuriai artimiausias 118 kamienas (3.2.2), sekretuojamų bakteriocinų ar į bakteriocinus panašių antibakterinių medžiagų (BLIS), todėl sunku objektyviai įvertinti šių bakterijų antibakterinį spektrą. Tik viena autorių grupė tyrė *A. pallidus* SAT4 kamieno antibakterinį aktyvumą, tačiau šio kamieno sekretuojama antibakterinė medžiaga, nors ir baltyminės kilmės, yra ne bakteriocinas, o antrinis 37 kDa dydžio metabolitas ir priskiriama peptidiniams antibiotikams (Muhammad ir Ahmed, 2015). Todėl galima teigti, kad 118 kamieno antibakterinį aktyvumą sąlygoja ne ta pati antibakterinė medžiaga, todėl netikslinga lyginti ir jų antibakterinio aktyvumo spektrą.

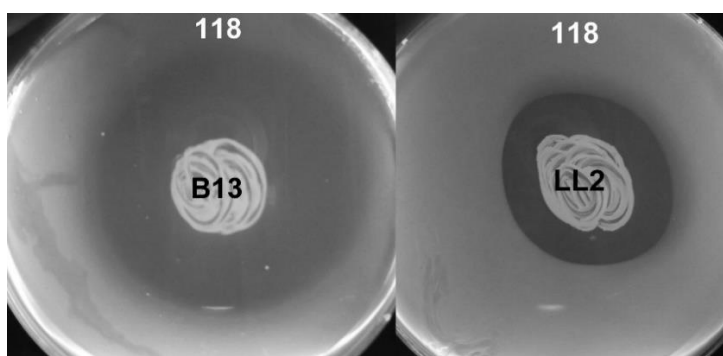
### **3.4 Pienarūgščių ir termofilinių bakterijų kamienų tarpusavio antagonizmo ir toksiškumo eukariotinėms ląstelėms įvertinimas**

Užpylimo metodu buvo įvertintas termofilinių (118 ir 9A11) bei tirtų LAB kamienų ir jogurtų izoliatų tarpusavio antagonizmas. Kadangi termofiliniai bakterijų kamienai neinhibavo nei vieno iš tirtų LAB kamienų augimo, 3.14 lentelėje pateikti tik jų jautrumo LAB sekretuojamoms antibakterinėms medžiagoms rezultatai.

**3.14 lentelė.** Tirtų termofilinių (118 ir 9A11) ir LAB kamienų tarpusavio antagonizmo įvertinimas. „+“ – skaidri zona ≤ 5 mm; „++“ – skaidri zona ≤ 10 mm, „+++“ – zona ≤ 15 mm. „++++“ – zona >15 mm; „-“ – skaidri zona nesusidarė, NT – netirta.

| <b>Antibakterines medžiagas sekretuojantys kamienai</b> |            |           |           |           |           |            |            |            |
|---|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| <b>Jautrūs kamienai</b>                                 | <b>LL2</b> | <b>LL</b> | <b>LA</b> | <b>LC</b> | <b>LS</b> | <b>A11</b> | <b>B13</b> | <b>118</b> |
| <b>118</b>  | ++         | +         | ++        | ++        | ++        | +++        | +++        | NT         |
| <b>9A11</b>   | +++        | -         | +++       | ++++      | ++++      | ++++       | ++++       | +++        |

Nustatyta, kad 118 kamienas yra jautrus visoms tirtų LAB sekretuojamoms antibakterinėms medžiagoms. Susidariusių inhibicinių zonų pavyzdžiai pateikti 3.17 paveiksle. Kadangi dauguma tirtų LAB rūšių priskiriamos probiotikams (Saad ir kt., 2013; Dixit ir kt., 2016), šie duomenys bei 118 kamieno neaktyvumas prieš LAB rodo, kad 118 kamieno bakteriocinas ar net pats bakterijų kamienas gali būti taikomas probiotinių maisto produktų apsaugai.



**3.17 pav.** LAB inhibicinio poveikio termofiliniam 118 kamienui pavyzdžiai.

Beveik visi LAB kamienai (išskyrus LL) pasižymėjo stipriu antagonistiniu poveikiu prieš *G. stearotherophilus* 9A11 bakterijas (3.14 lentelė). Kadangi šios rūšies bakterijos dažnai sutinkamos kaip konservuotus ar pieno produktus gadinančios bakterijos (Rigaux ir kt., 2014; Hussein ir kt., 2015; André ir kt., 2017), gauti rezultatai rodo galimą tirtų LAB kamienų ir/arba jų sekretuojamų antibakterinių medžiagų pritaikymą maisto pramonėje kovai prieš *G. stearotherophilus*.

Buvo įvertintas tirtų LAB ir termofilinio 118 bakterijų kamieno sekretuojamų antibakterinių medžiagų poveikis eukariotinėms (mielių) ląstelėms. Naudotos 4 mielių rūšys: *Saccharomyces cerevisiae* ir 3 *Candida* sp. rūšys (2.2 lentelė), tačiau nei vienu atveju inhibicinis poveikis nebuvo nustatytas.

Literatūroje nedaug duomenų apie LAB poveikį eukariotinėms ląstelėms, ypačingai sąlygotą baltyminės kilmės medžiagų. Plačiau tirtas šių bakterijų poveikis pelėsiniams grybams (De Muynck ir kt., 2004; Gerez ir kt., 2009; Dalié



ir kt., 2010; Digaitiene ir kt., 2012; Cizeikiene ir kt., 2013; Khalil ir kt., 2013; Bharti ir kt., 2016; Nuryshev ir kt., 2016), tačiau apie šiame darbe tirtų LAB rūšių poveikį mielėms žinoma labai nedaug. Tik keliuose šaltiniuose nurodomas *L. lactis* subsp. *lactis* aktyvumas prieš *Candida guilliermondii* mieles (Nuryshjev ir kt., 2016), *L. acidophilus* gebėjimas inhibuoti *Candida albicans* mielių augimą (Grimoud ir kt., 2010; Bharti ir kt., 2016) bei poros *L. paracasei* kamienų aktyvumas prieš *Candida lusitaniae* mieles (Schnürer ir Magnusson, 2005).

Nors tos pačios mielių rūšys buvo tirtos ir šiame darbe, tačiau inhibicinis poveikis nenustatytas, greičiausiai dėl tirtų bakterinių ir/arba naudotų mielių kamienų neatitikimo arba jau minėto pakankamai mažo tirtų supernatantų antibakterinio aktyvumo.

Vertinant termofilinio 118 kamieno GABP mėginių poveikį eukariotinėms (mielių) ląstelėms inhibicinės zonos taip pat nebuvo aptiktos. Kadangi, kaip jau minėta anksčiau (3.3.2), *A. pallidus* bakterijos mažai iširtos antagonistinio poveikio atžvilgiu, todėl negalima objektyviai įvertinti, ar poveikio mielėms nebuvo nustatyta dėl nepakankamo mėginių aktyvumo, ar tiesiog ši termofilinių bakterijų rūšis neinhibuoja mielių augimo.

## APIBENDRINIMAS

Atsižvelgiant į smarkiai išaugusį šių dienų vartotojų funkcionalių maisto produktų poreikį bei ypatingai išplitusį patogeninių bei maistą gadinančių bakterijų atsparumą įprastiems antibiotikams (Dixit ir kt., 2016; Egan ir kt., 2016), šiame darbe didžiausias dėmesys buvo skiriamas funkcionalaus maisto komponentų – probiotikų ir prebiotikų – tyrimams, bei naujų sinbiotinių kombinacijų veiksmingumo įvertinimui, derinant su prebiotikais ne tik pienarūgštes, bet ir potencialiai probiotines termofilines bakterijas.

Pirmoje darbo dalyje buvo tiriami pienarūgščių bakterijų (LAB) tipiniai kamienai ir jogurtų izoliatai. Iš dviejų probiotinių jogurtų („Actimel“ ir „Bifi“) buvo išskirta 20 izoliatų ir suskirstyta į dvi grupes (A ir B) pagal išskyrimo šaltinį. Įvertinus izoliatų antibakterinį aktyvumą tarpusavyje bei prieš tipinius LAB kamienus, tolesniems tyrimams naudoti didžiausiu aktyvumu pasižymėję A11 ir B13 izoliatai. Dalinio identifikavimo ir kamienų profiliavimo rezultatai parodė, kad jogurtų izoliatai yra artimiausi *L. paracasei* rūšiai, o A ir B grupės atstovauja skirtingus šios rūšies kamienus. Šią išvadą patvirtino ir kiti darbo metu gauti jogurtų izoliatų antibakterinių medžiagų identifikavimo, OS įsisavinimo bei antibakterinio aktyvumo spektrų tyrimo rezultatai.

Tipinių LAB kamienų ir jogurtų izoliatų gebėjimo įsisavinti komercinius prebiotinius OS (inuliną, palatinozę ir CD) tyrimai parodė, kad OS įsisavinimo efektyvumas varijuoja tarp skirtingų LAB rūšių (*Lactobacillus acidophilus* (LA), *Lactobacillus sakei* (LS), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LL ir LL2)) ir net tos pačios rūšies kamienų (LL ir LL2 bei A11 ir B13). Toks LAB bakterijų OS įsisavinimo savitumas nurodomas ir literatūroje (Makras ir kt., 2005; Kunova ir kt., 2011; Gänzle ir Follador, 2012). Tai rodo, kad tirti prebiotikai yra tinkami probiotinių bakterijų rūšinės sudėties moduliavimui. Taip pat parodyta, kad auginant LAB su dviem anglies šaltiniais (OS ir gliukoze), galima ženkliai padidinti kultūrų pasiekiamą tankį (LL2 ir CD, LA ir palatinozės, bei B13 ir inulino atvejais). Tai yra ypatingai svarbu siekiant pritaikyti tirtas LAB bakterijas kaip probiotikus, nes probiotinio maisto produkto

statuso patvirtinimui jame turi būti ne mažiau kaip  $10^7$  CFU/ml gyvybingų probiotinių bakterijų (Pan ir kt., 2009).

OS įtakos LAB antibakteriniam aktyvumui tyrimai parodė, kad tirti OS gali padidinti tirtų LAB antibakterinio aktyvumo raišką (LA ir palatinozės atveju), o LL2 ir CD atveju – ir prieš patogenines bakterijas. Visais atvejais antibakterinis aktyvumas buvo stebimas eksponentinio tirtų LAB kultūrų augimo metu. Taip pat, LAB tipinių kamienų ir jogurtų izoliatų tarpusavio antagonizmo tyrimai parodė, kad LAB sekretuojamos antibakterinės medžiagos yra aktyvios prieš producentui artimas rūšis ir kamienus. Šios savybės būdingos bakteriocinams ir yra vieni iš kriterijų, atskiriančių juos nuo peptidinių antibiotikų (Gillor ir kt., 2008; Chatterjee ir Raichaudhuri, 2017). Be to, literatūroje teigiama, kad LAB nėra būdinga antibiotinių peptidų produkcija (Lee ir Kim, 2011; Gemechu, 2015). Todėl galima daryti prielaidą, kad tirtų LAB antibakterinį aktyvumą lemia bakteriocinų sekrecija. Tai dalinai patvirtino ir antibakterinių medžiagų identifikavimo PGR metodu eksperimentai, kurių metu LL2 kamieno genome nustatytas nizino genas, o jogurtų izoliatai koduoja naujus *L. paracasei* 334 kamienne identifikuotus bakteriocinus (Kuo ir kt., 2013). Yra žinoma, kad bakteriocinų sekrecijos sąlygotas probiotinių bakterijų antibakterinis aktyvumas yra viena pagrindinių naudą vartotojo sveikatai lemiančių probiotikų savybių (Gillor ir kt., 2008; Dobson ir kt., 2011; O'Shea ir kt., 2012; Patel ir Goyal, 2012; Szkaradkiewicz ir Karpiński, 2013; Yang ir kt., 2014; Gemechu, 2015; Tomar ir kt., 2015), todėl šie rezultatai rodo aukštą minėtų kamienų probiotinį potencialą.

Nustatyta, kad tirtų LAB ir termofilinio 118 kamieno sekretuojamos antibakterinės medžiagos yra aktyvios prieš kai kurias svarbias patogenines ir maistą gadinančias bakterijas ir netoksiškos eukariotinėms (mielių) ląstelėms. Nors antibakterinio aktyvumo spektrai varijavo tarp skirtingų tirtų LAB kamienų ir izoliatų, tačiau visos tirtos bakterijos pasižymėjo aktyvumu prieš *Streptococcus pyogenes* bakterijas, galinčias sukelti įvairias infekcijas (Gillor ir kt., 2008; Ibrahim ir kt., 2016; Stevens ir kt., 2016), bei *Bacillus cereus* – svarbias mėsos ir pieno produktus gadinančias bakterijas (Abriouel ir kt., 2011;

Sumi ir kt., 2015). Plačiausiu antibakteriniu spektru pasižymėjo LL2 kamienas – jis inhibavo pusės naudotų patogeninių bakterijų kamienų augimą. Taip pat, tirti LAB kamienai pasižymėjo stipriu inhibiciniu poveikiu prieš termofilines endosporas formuojančias bakterijas, tarp jų - *Geobacillus stearothermophilus*, kurios yra dažnos pieno ir konservuotus maisto produktus gadinančios bakterijos (Özdemir ir Biyik, 2012; Rigaux ir kt., 2014; Hussein ir kt., 2015; Alkhalili ir kt., 2016; André ir kt., 2017).

Antroje darbo dalyje buvo vertinamas termofilinio endosporas formuojančio ir antibakteriniu aktyvumu pasižyminčio 118 kamieno probiotinis potencialas ir šio kamieno ir/arba jo sekretuojamos antibakterinės medžiagos pritaikymo maisto pramonėje galimybės. Kamienas atrinktas iš izoliatų, išskirtų iš dirvožemio virš naftos telkinių, kolekcijos. Atlikus dalinį identifikavimą nustatyta, kad 118 kamienas yra artimiausias *Aeribacillus pallidus* rūšies bakterijoms, anksčiau priskirtoms *Geobacillus* genčiai (Miñana-Galbis ir kt., 2010).

Darbo metu nustatyta, kad 118 kamieno sekretuojama antibakterinė medžiaga yra mažos molekulinės masės (apie 5 kDa), baltyminės prigimties, struktūroje greičiausiai turi disulfidinių tiltelių, pasižymi stipriu antibakteriniu aktyvumu prieš producentui artimas bakterijas, yra sekretuojama eksponentinio augimo metu ir jos sekrecija yra susijusi su sporuliacijos indukcija. Šie duomenys leidžia daryti išvadą, kad tiriamą antibakterinę medžiagą yra bakteriocinas, priklausantis I arba II bakteriocinų klasėms. Nustatytas bakteriocino stabilumas plačiose pH ir temperatūros ribose, bei aktyvumas prieš patogenines ir maistą gadinančias bakterijas, rodo aukštą jo pritaikymo maisto pramonėje potencialą.

Taip pat parodyta, kad 118 kamienas yra jautrus LAB sekretuojamoms antibakterinėms medžiagoms, bet pats tirtų probiotinių bakterijų augimo neinhibuoja, todėl šis kamienas arba jo sekretuojamas bakteriocinas galėtų būti taikomas probiotinių arba LAB fermentuojamų maisto produktų apsaugai (Gemechu, 2015). Šie rezultatai bei aktyvumas prieš patogenines ir maistą gadinančias bakterijas rodo termofilinio 118 kamieno probiotinį potencialą,

kuris iki šiol termofilinių endosporas formuojančių bakterijų tarpe buvo pasiūlytas tik *G. thermoleovorans* kamienui (Mahdhi ir kt., 2011).

OS asimiliacijos efektyvumo tyrimai parodė, kad 118 kamienas geba įsisavinti palatinozę beveik taip pat efektyviai kaip gliukozę. Taip pat parodyta, kad palatinozė teigiamai veikia 118 kamieno antibakterinio aktyvumo raišką. Šie rezultatai rodo gerą 118 kamieno suderinamumą su šiuo prebiotiku bei galimą pritaikymą maisto produktų, kuriuose palatinozė gali būti naudojama kaip prebiotikas ar kaip cukraus pakaitalas, apsaugai ir/arba galiojimo laiko prailginimui.

Nustatyta, kad 118 kamieno sekretuojamas bakteriocinas yra stabilus aukštose temperatūrose ir išlaiko dalį aktyvumo net sterilizacijos sąlygomis (121 °C), todėl gali būti pritaikomas ultra aukštomis temperatūromis apdorojamų maisto produktų apsaugai (Egan ir kt., 2016). Tirtu bakteriocino aktyvumas prieš *G. stearothermophilus* bakterijas dar labiau padidina jo pritaikomumą konservuotų maisto produktų apsaugai, kurių gedimą dažnai sukelia minėtos bakterijos, o apdorojimo procesuose taikomos aukštos temperatūros (Egan ir kt., 2016).

Aptartos šiame darbe tirtų LAB ir termofilinių bakterijų bei jų sekretuojamų antibakterinių medžiagų savybės rodo didelį šių bakterijų ir/arba jų sekretuojamų antibakterinių medžiagų pritaikymo maisto pramonėje potencialą. O nustatyta teigiama prebiotinių OS įtaka tirtų bakterijų augimui ir/arba antibakteriniam aktyvumui rodo, kad naudojant šias probiotines LAB ir potencialiai probiotines termofilines bakterijas bei atitinkamus prebiotinius OS, galima sukurti efektyvias sinbiotines kombinacijas. Remiantis šiame darbe nustatytais rezultatais, perspektyviausios pritaikymui maisto pramonėje yra LL2 ir CD bei termofilinio 118 kamieno ir palatinozės kombinacijos.

## IŠVADOS

1. Pienarūgščių bakterijų jogurtų izoliatai (A11 ir B13) bei tipiniai kamieniai (*Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 ir *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 20179) ir termofilinis 118 bakterijų kamienas geba įsisavinti prebiotinius oligosacharidus ir jie teigiamai veikia kamienų antibakterinį aktyvumą.
2. Visi tirti bakteriniai kamieniai yra aktyvūs prieš patogenines (*Streptococcus pyogenes*) ir maistą gadinančias (*Bacillus cereus* ir *Geobacillus stearothermophilus*) bakterijas.
3.  $\alpha$ -ciklodekstrinas padidina *L. lactis* subsp. *lactis* DSM 20179 kamieno antibakterinį aktyvumą prieš patogenines bakterijas.
4. Termofilinio 118 kamieno sekretuojama antibakterinė medžiaga yra I arba II klasės bakteriocinas, stabilus aukštose temperatūrose ir plačiose pH reikšmėse, atsparus detergentų poveikiui ir aktyvus prieš patogenines bei maistą gadinančias, bet neaktyvus prieš probiotines pienarūgštes bakterijas.
5. Tirtų antibakteriniu aktyvumu pasižyminčių bakterijų ir prebiotinių oligosacharidų deriniai – jogurto izoliato B13 ir inulino, *L. acidophilus* DSM 20079 ir palatinozės, *L. lactis* subsp. *lactis* DSM 20179 ir  $\alpha$ -ciklodekstrino bei termofilinio 118 kamieno (*Aeribacillus* sp.) ir palatinozės – gali būti pritaikomi maisto pramonėje kaip efektyvūs sinbiotikai.

# PUBLIKACIJŲ IR KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

## Publikacijos

### Desertacijos rezultatai paskelbti straipsniuose:

1. **Pranckute R**, Kaunietis A, Kuisiene N, Čitavičius D. Development of synbiotics with inulin, palatinose,  $\alpha$ -cyclodextrin and probiotic bacteria. *Polish J Microbiol.* 2014;63(1):33-41
2. **Pranckute R**, Kaunietis A, Kananavičiute R, Lebedeva J, Kuisienė N, Šaleikienė J, Čitavičius D. Differences of antibacterial activity spectra and properties of bacteriocins, produced by *Geobacillus* sp. bacteria isolated from different environments. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2015;5(2):155-161
3. **Pranckute R**, Kaunietis A, Kuisiene N, Čitavičius DJ. Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. *Int J Biol Macromol.* 2016;89:669-676

### Kiti straipsniai:

1. Kaunietis A, de Jong A, **Pranckutė R**, Buivydas A, Kuipers OP. Draft genome sequences of two *Geobacillus* species strains, isolated from oil wells and surface soil above oil pools. *Genome Announc.* 2016;4(5):e01129-16. doi:10.1128/genomeA.01129-16

## Konferencijos

### Tarptautinės konferencijos, kuriose pristatyti disertacijos rezultatai:

1. **Pranckutė R**, Kaunietis A, Kananavičiūtė R, Lebedeva J, Čitavičius D. Antibacterial spectrum and properties of bacteriocins of *Geobacillus* spp. Bacteria. BAMP 2013: International scientific conference on bacteriocins and antimicrobial peptides, 21-23 May, 2013, Košice, Slovakia. (Žodinis pranešimas)
2. **Pranckutė R**, Kuisienė N, Čitavičius DJ. Physicochemical properties of bacteriocin produced by thermophilic *Geobacillus* sp. strain, European Biotechnology Congress 2016, 5-7 May, 2016, Riga, Latvia. (Stendinis pranešimas)

### Kitos konferencijos:

1. Kaunietis A, Čitavičius D, **Pranckutė R**. Optimization of the secretion of bacteriocins and the bacterial cell growth of *Geobacillus* sp. 15 Strain. FEMS 2015: 6<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, 7-11 June, 2015, Maastricht, The Netherlands.
2. **Pranckute R**, Klusaite A, Bukelskis D, Kuisiene N. Antibacterial activity of microorganisms isolated from Krubera-Voronja cave. 3<sup>rd</sup> Congress of Baltic Microbiologists 2016 (CBM2016), 18-21 October, 2016, Vilnius, Lithuania.



## FINANSINĖ PARAMA

1. Lietuvos mokslų tarybos (LMT) finansuojamas projektas „TermozymOS“. 2011-2013 m. SVE-08/2011. Vadovė - Prof. N. Kuisienė.
2. Lietuvos mokslo tarybos (LMT) stipendija (2013-2014 m.)

# GYVENIMO APRAŠYMAS

## ASMENINĖ INFORMACIJA

---

RAMINTA PRANCKUTĖ

Adresas: Laisvės pr. 44-87, Vilnius

Tel. nr. +370 622 08027

El. paštas: raminta.pranckute@gmail.com

Gimimo data: 1987.08.18

## IŠSILAVINIMAS

---

- 2006 – 2010 Biologijos bakalauras (Molekulinės biologijos programa)  
Vilniaus universitetas
- 2010 – 2012 Mikrobiologijos programa, Biologijos magistras  
(*Cum Laude*)  
Vilniaus universitetas
- 2012 - 2016 Biologijos krypties doktorantūros studijos  
Vilniaus universitetas

## DARBO PATIRTIS

---

- 2017.01.25 - dabar Bibliotekininkė  
VGTU biblioteka, Mokslinės informacijos skyrius
- 2011.03 - 2012.08 Laborantė  
Vilniaus universitetas, Mikrobiologijos ir  
biotechnologijos katedra

## DALYVAVIMAS PROJEKTUOSE

---

- 2011-2013 „TermozymOS“. SVE-08/2011. Finansuojanti institucija - Lietuvos mokslų taryba. Vadovė - prof. dr. N. Kuisienė.
- 2011 m. „Kokybiškai naujo nuotekų valymo įrenginio, paremto nuoseklaus biologinio valymo technologija, sukūrimas“. VP2-1.3-ŪM-02-K-01-003. Jungtinės veiklos sutartis per Ūkio Ministeriją su UAB "Arginta". Vadovė - prof. L. Kalėdienė.
- 2016.04.01 - 2016.12.31 „Giliausio pasaulio urvo mikrobiomas: įvairovės, metabolizmo bei antimikrobinio aktyvumo analizė“. MIP-005/2014. Finansuojanti institucija - Lietuvos mokslo taryba. Projekto trukmė - 3 metai (2014.03.01. - 2016.12.31). Vadovė - prof. dr. N. Kuisienė.

## PADĖKA

Norėčiau išreikšti nuoširdžią padėką buvusiam vadovui prof. dr. Donaldui Čitavičiui – ačiū Jums už rūpestį, kantrybę, pastabas ir patarimus bei nukreipimą teisingu keliu, ne tik darbo tema.

Taip pat esu labai dėkinga dabartinei vadovei prof. dr. Nomedai Kuisienei už motyvaciją, supratingumą, visapusišką palaikymą, objektyvų vertinimą ir didžiulę pagalbą ruošiant šį darbą.

Dėkoju Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros vedėjai prof. Lilijai Kalėdienei bei visam kolektyvui už pagalbą ir draugišką darbo aplinką. Ačiū laboratorijos darbo ir studijų kolegoms, ypatingai Arnoldui Kauniečiui – už vertingus patarimus, pagalbą, įdomias idėjas, turiningas diskusijas ir geranorišką bendradarbiavimą, dr. Renatai Gudiukaitei ir dr. Audriui Gegeckui – už pagalbą tvarkant organizacinius reikalus, bei Viltei Stonytei ir Indrai Vaitkevičiūtei – už draugiškumą ir visapusišką palaikymą.

Taip pat esu labai dėkinga VGTU bibliotekos direktorei Ingridai Kasperaitienei, už suteiktas puikias sąlygas ir priemones rengiant šį darbą. Taip pat – ačiū visam VGTU bibliotekos kolektyvui, už šiltą priėmimą ir nuolatinį palaikymą.

Dėkoju Groningeno universiteto kolektyvui už atliktą termofilinio kamieno genomo sekoskaitą. Taip pat – Povilui Kavaliauskui už pagalbą atliekant antibakterinių spektrų tyrimus.

Tariu nuoširdų ačiū mamai, seseriai ir tėčiui, kurio jau nebėra tarp mūsų, už neišsenkančią kantrybę, šiltą palaikymą ir nenuilstantį pasitikėjimą mano jėgomis.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdelsamei HM, Ibrahim EMA, El Sohaimy SA, Saad MA. Effect of storage on the activity of the bacteriocin extracted from *Lactobacillus acidophilus*. *BENHA Vet Med J*. 2015;28(1):216-222
2. Abdulla AA. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus acidophilus* that carry the bacteriocin gene. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2014;3(6):269-276
3. Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB, Galvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35(1):201-232
4. Ahmad V, Khan MS, Jamal QMS, Alzohairy MA, Al Karaawi MA, Siddiqui MU. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49(1):1-11
5. Aktypis A, Kalantzopoulos G, Huis in't Veld JHJ, ten Brink B. Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC0040. *J Appl Microbiol*. 1998;84:568-576
6. Aktypis A, Kalantzopoulos G. Purification and characterization of thermophilin ST-1, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001. *Lait*. 2003;83:365-378
7. Aktypis A, Tychowski M, Kalantzopoulos G, Aggelis G. Studies on bacteriocin (thermophilin T) production by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 in batch and fed-batch fermentation modes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2007;92(2):207-220
8. Alkhalili RN, Bernfur K, Dishisha T, et al. Antimicrobial protein candidates from the thermophilic *Geobacillus* sp. Strain ZGt-1: Production, proteomics, and bioinformatics analysis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8):1-17
9. Al-Sheraji SH, Ismail A, Manap MY, Mustafa S, Yusof RM, Hassan FA. Prebiotics as functional foods: A review. *J Funct Foods*. 2013;5(4):1542-1553
10. Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100(7):2939-2951
11. Ambalam P, Raman M, Purama RK, Doble M. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2016;30(1):119-131

12. Amdekar S, Vinod S, Roy P, Kushwaha S, Dwivedi D. *In vitro* antibacterial activity of *Lactobacillus casei* against enteropathogens. *WebmedCentral Microbiol.* 2010;1(9):1-11
13. Anandharaj M, Sivasankari B, Parveen Rani R. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: A review. *Chinese J Biol.* 2014;2014:1-7
14. Andersen JM, Barrangou R, Hachem MA, Lahtinen SJ, Goh, YJ, Svensson B, Klaenhammer TR. Transcriptional analysis of prebiotic uptake and catabolism by *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *PLoS One.* 2012;7(9):e44409
15. André S, Vallaeys T, Planchon S. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Res Microbiol.* 2016;168:379-387
16. Anisimov AP, Amoako KK. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics. *J Med Microbiol.* 2006;55:1461-1675
17. Anthony T, Rajesh T, Kayalvizhi N, Gunasekaran P. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Bioresour Technol.* 2009;100(2):872-877
18. Arai H, Mizuno A, Sakuma M, et al. Effects of a palatinose-based liquid diet (Inslow) on glycemic control and the second-meal effect in healthy men. *Metabolism.* 2007;56(1):115-121
19. Arqués JL, Rodríguez E, Langa S, Landete JM, Medina M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: Effect on pathogens. *Biomed Res Int.* 2015:1-9
20. Astray G, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto JC, Rial-Otero R, Simal-Gándara J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll.* 2009;23(7):1631-1640
21. Atanasova N, Kitayska T, Bojadjieva I, Yankov D, Tonkova A. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. *Process Biochem.* 2011;46(1):116-122
22. Avci A, Dönmez S. A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase. *Process Biochem.* 2009;44(1):36-42
23. Aween MM, Hassan Z, Muhialdin BJ, Noor HM, Eljamel YA. Evaluation on antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from honey. *Am J Appl Sci.* 2012;9(6):807-817
24. Balciunas EM, Castillo Martinez FA, Todorov SD, Franco BDGM, Converti A, Oliveira RPS. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control.* 2013;32(1):134-142

25. Banat IM, Marchant R, Rahman TJ. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54(6):2197-2201
26. Barreteau H, Delattre C, Michaud P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technol Biotechnol.* 2006;44(3):323-333
27. Bartkiene E, Bartkevics V, Mozuriene E, et al. The impact of lactic acid bacteria with antimicrobial properties on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines in cold smoked pork sausages. *Food Control.* 2017;71:285-292
28. Bassyouni RH, Nassar MWA, Ibrahim ZA, Ahmed MSZ. The antimicrobial potential of *Lactobacillus acidophilus* on pathogenic bacteria causing diarrhea. *Int Arab J Antimicrob Agents.* 2015:1-9. doi:10.3823/764
29. Bastos MCF, Coelho MLV, Santos OCS. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology.* 2015;161(2015):683-700
30. Berić T, Stanković S, Draganić V, Kojić M, Lozo J, Fira D. Novel antilisterial bacteriocin licheniocin 50.2 from *Bacillus licheniformis* VPS50.2 isolated from soil sample. *J Appl Microbiol.* 2014;116(3):502-510
31. Bernet-Camard MF, Liévin V, Brassart D, Neeser JR, Servin AL, Hudault S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(7):2747-2753
32. Bharal A, Sohpal VK. Evaluation of antimicrobial activity of bacteriocin (*L. acidophilus*) against human pathogenic and food born microorganisms. *Int J Innov Res Sci Eng Technol.* 2013;2(9):4221-4225
33. Bharti V, Mehta A, Jain N, Singh S, Ahirwal L. *In vivo* acute toxicity, antibacterial, antiaquatic fungal, anthelmintic activity of *Lactobacillus plantarum* KP894100 and *Lactobacillus acidophilus* KP942831. *Asian J Pharm Clin Res.* 2016;9(1):44-48
34. Bierbaum G, Sahl H-G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol.* 2009;10(1):2-18
35. Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD, Walter J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(5):303-310

36. Blackburn P, De La Harpe J. Nisin compositions for use as enhanced, broad range bactericides. EU patents: WO 1989012399 A1. Filled: 8 Dec, 1993; Published: 24 Mar, 1999
37. Blanco-Padilla A, Soto KM, Hernández Iturriaga M, Mendoza S. Food antimicrobials nanocarriers. *Sci World J.* 2014;1-11
38. Bosscher D, Breynaert A, Pieters L, Hermans N. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(S6):5-11
39. Bosscher D, Van Loo J, Franck A. Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. *Nutr Res Rev.* 2006;19(2):216-226
40. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:645-666
41. Bron PA, Kleerebezem M, Brummer R-J, et al. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *Br J Nutr.* 2017;117(1):93-107
42. Buckley JD, Thorp AA, Murphy KJ, Howe PRC. Dose-dependent inhibition of the post-prandial glycaemic response to a standard carbohydrate meal following incorporation of alpha-cyclodextrin. *Ann Nutr Metab.* 2006;50(2):108-114
43. Cal K, Centkowska K. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;68(3):467-478
44. Carrier RL, Miller LA, Ahmed I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J Control Release.* 2007;123(2):78-99
45. Cavera VL, Arthur TD, Kashtanov D, Chikindas ML. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(5):494-501
46. Chandra TJ, Mani PS. A study of 2 rapid tests to differentiate Gram positive and Gram negative aerobic bacteria. *J Med Allied Sci.* 2011;1(2):84-85
47. Chatterjee M, Raichaudhuri A. Bacteriocin in harmony with ABC transporter exhibits antimicrobial activity. *EC Microbiol.* 2017;8(1):3-10
48. Cheigh CI, Pyun YR, Nisin biosynthesis and its properties, *Biotechnol Lett,* 2005;27:1641-1648
49. Chen YS, Srionnual S, Onda T, Yanagida F. Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 2007;45(2):190-193
50. Choi H-J, Cheigh C-I, Kim S-B, Pyun Y-R. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A1644 isolated from Kimchi. *J Appl Microbiol.* 2000;88:563-571

51. Chopra L, Singh G, Kumar Jena K, Sahoo DK. Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Sci Rep.* 2015;5:13412. doi:10.1038/srep13412
52. Chung WSF, Walker AW, Louis P, et al. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biol.* 2016;14(1):3. doi:10.1186/s12915-015-0224-3
53. Ciobanu A, Landy D, Fourmentin S. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. *Food Res Int.* 2013;53(1):110-114
54. Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskevicius A, Bartkiene E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control.* 2013;31(2):539-545
55. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2001;71(1):1-20
56. Cotter PD. An “Upp”-turn in bacteriocin receptor identification. *Mol Microbiol.* 2014;92(6):1159-1163
57. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Curr Protein Pept Sci*, 2005;6:61-75
58. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(2):95-105
59. Dahiya DK, Renuka, Puniya M, et al. Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: A review. *Front Microbiol.* 2017;8:563
60. Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F. Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control.* 2010;21(4):370-380
61. Damania P, Patel R, Shaw R, Kataria RP, Wadia A. Development of antimicrobial packaging materials for food preservation using bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Microbiol Res (Pavia).* 2016;7(1). doi:10.4081/mr.2016.6622
62. Darsanaki RK, Rokhi ML, Aliabadi MA, Issazadeh K. Antimicrobial activities of *Lactobacillus* strains isolated from fresh vegetables. *Middle-East J Sci Res.* 2012;11(9):1216-1219
63. De Muynck C, Leroy AIJ, De Maeseneire S, Arnaut F, Soetaert W, Vandamme EJ. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiol Res.* 2004;159(4):339-346
64. Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem.* 2004;39(9):1033-1046



65. Dellaglio F, Felis GE, Torriani S. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52(1):285-287
66. Deraz SF, Karlsson EN, Hedström M, Andersson MM, Mattiasson B. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *J Biotechnol.* 2005;117(4):343-354
67. Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Le Chevalier P, Fleury Y. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar Drugs.* 2010;8(4):1153-1177
68. Digaitiene A, Hansen AS, Juodeikiene G, Eidukonyte D, Josephsen J. Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. *J Appl Microbiol.* 2012;112(4):732-742
69. Diop MB, Dubois-dauphin R, Tine E, Ngom A, Destain J, Thonart P. Bacteriocin producers from traditional food products. *Biotechnol Agron Soc Env.* 2007;11(4):275-281
70. Dixit Y, Wagle A, Vakil B. Patents in the Field of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics: A Review. *J Food Microbiol Saf Hyg.* 2016;1(2):1-13
71. Djadouni F, Kihal M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2012;55(3):435-444
72. Dobson A, Cotter PD, Paul Ross R, Hill C. Bacteriocin production: A probiotic trait? *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(1):1-6
73. Drago L, Gismondo MR, Lombardi A, De Haën C, Gozzini L. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;153(2):455-463
74. Drider D, Fimland G, Hechard Y, McMullen LM, Prevost H. The continuing story of class IIa bacteriocins, *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70(2):564-582
75. EFSA. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Urea for ruminants. *EFSA J.* 2012;10(3):2624. doi:10.2903/j.efsa.2012.2624
76. Egan K, Field D, Rea MC, Ross RP, Hill C, Cotter PD. Bacteriocins: Novel solutions to age old spore-related problems? *Front Microbiol.* 2016;7:461. doi:10.3389/fmicb.2016.00461
77. El-Shouny W, Abo-Kamar A, Ragy S. Characterization of the partially purified plantaricin Sr18 produced by *Lactobacillus*. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2013;2(5):2301-2305

78. Enan G, Abdel-Shafi S, Ouda S, Negm S. Novel antibacterial activity of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* Z11 isolated from Zabady. *Int J Biomed Sci.* 2013;9(3):174-180
79. Etleva D. Efficiency of probiotics and prebiotics in farm animals. *Lucr Științifice-Universitatea Științe Agric și Med Vet Ser Zooteh.* 2010;54:274-279
80. Fahey GC. Probiotics the effects of inulin on gut health and bifidobacterial populations in the colon. *US Gastroenterol Hepatol Rev.* 2010;6:58-63
81. Farinha LRL, Sabo SS, Porto MC, Souza EC, Oliveira MN, Oliveira RPS. Influence of prebiotic ingredients on the growth kinetics and bacteriocin production of *Lactococcus lactis*. *Chem Eng Trans.* 2015;43:313-318
82. Fenyvesi É, Vikmon M, Szenté L. Cyclodextrins in food technology and human nutrition: benefits and limitations. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(12):1981-2004
83. Ferreira CL, Salminen S, Grzeskowiak L, et al. Terminology concepts of probiotic and prebiotic and their role in human and animal health. *Rev Salud Anim.* 2011;33(3):137-146
84. Fontaine L, Hols P. The inhibitory spectrum of Thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of BlpG<sub>St</sub>, a thiol-disulfide oxidase. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(4):1102-1110
85. Food Safety Commission. Evaluation Report of Food Additives Polysorbates (Polysorbates 20, 60, 65 and 80). 2007. Available at: [https://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/foodadditive/polysorbate\\_report.pdf](https://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/foodadditive/polysorbate_report.pdf).
86. Fujiwara T, Naomoto Y, Motoki T, et al. Effects of a novel palatinose based enteral formula (MHN-01) carbohydrate-adjusted fluid diet in improving the metabolism of carbohydrates and lipids in patients with esophageal cancer complicated by diabetes mellitus. *J Surg Res.* 2007;138(2):231-240
87. Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar NB. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol.* 2007;120(1-2):51-70
88. Gänzle MG, Follador R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: A review. *Front Microbiol.* 2012;3(SEP):1-15
89. Gänzle MG, Holtzel A, Walter J, Jung G, Hammes WP. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(10):4325-4333

90. Garg N, Tang W, Goto Y, Nair SK, van der Donk WA. Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(14):5241-5246
91. Gautam N, Sharma N. Bacteriocin: Safest approach to preserve food products. *Indian J Microbiol*. 2009;49(3):204-211
92. Ge J, Sun Y, Xin X, Wang Y, Ping W. Purification and partial characterization of a novel bacteriocin synthesized by *Lactobacillus paracasei* HD1-7 isolated from chinese sauerkraut juice. *Sci Rep*. 2016;6(1):19366. doi:10.1038/srep19366.
93. Gemechu T. Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *African J Food Sci*. 2015;9(4):170-175
94. Gerez CL, Torino MI, Rollán G, Font de Valdez G. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*. 2009;20(2):144-148
95. Ghosh AR. Appraisal of probiotics and prebiotics in gastrointestinal infections appraisal of probiotics and prebiotics in gastrointestinal infections. *WebmedCentral Gastroenterol*. 2012;3(10):1-27
96. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995;125(6):1401-1412
97. Gilbreth SE, Somkuti GA. Thermophilin 110: A Bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST110. *Curr Microbiol*. 2005;51:175-182
98. Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;81(4):591-606
99. Goderska K, Nowak J, Czarnecki Z. Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. *Acta Sci Pol*. 2008;7(2):5-20
100. Goh YJ, Lee JH, Hutkins RW. Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(18):5716-5724
101. González-Pastor JE. Cannibalism: A social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35(3):415-424
102. Gopal N, Hill C, Ross PR, Beresford TP, Fenelon MA, Cotter PD. The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Front Microbiol*. 2015;6:1-18
103. Grimoud J, Durand H, Courtin C, Monsan P, Ouarné F, Theodorou V, Roques C. *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*. 2010;16(5):493-500

104. Guerra NP, Pérez RA, González EA, Agrasar AT. Antibacterial activity produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CECT 539 in different culture media. In: Méndez-Vilas A, ed. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. Vol 5624. FORMATEX; 2013:815-822
105. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocoll.* 2009;23(7):1670-1677
106. Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR. The diversity of bacteriocins in gram-positive bacteria. In: Riley MA, Chavan MA, eds. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Berlin Heidelberg; 2007:45-92
107. Higuti LH, Silva PA, Papp J, Okiyama VME, Andrade EA, Marcondes AA, Nascimento, AJ. Colorimetric determination of alpha and beta-cyclodextrins and studies on optimization of CGTase production from *B. firmus* using factorial designs. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2004;47(6):837-841
108. Hyronimus B, Le Marrec C, Urdaci MC. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *J Appl Microbiol.* 1998;85(1):42-50
109. Holub I, Gostner A, Theis S, Nosek L, Kudlich T, Melcher R, Scheppach W. Novel findings on the metabolic effects of the low glycaemic carbohydrate isomaltulose (Palatinose™). *Brit J Nutr.* 2010;103(12):1730-1737
110. Huang T, Zhang X, Pan J, Su X, Jin X, Guan X. Purification and characterization of a novel cold shock protein-like bacteriocin synthesized by *Bacillus thuringiensis*. *Sci Rep.* 2016;6:35560. doi:10.1038/srep40975.
111. Hussein AH, Lisowska BK, Leak DJ. The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential. *Adv Appl Microbiol.* 2015;92:1-48
112. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014;5:1-10
113. Iannitti T, Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr.* 2010;29(6):701-725
114. Ibrahim J, Eisen JA, Jospin G, Coil DA, Khazen G, Tokajian S. Genome analysis of *Streptococcus pyogenes* associated with pharyngitis and skin infections. *PLoS One.* 2016;11(12):1-23

115. Inglin RC, Stevens MJA, Meile L, Lacroix C, Meile L. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *J Microbiol Methods*. 2015;114:26-29
116. Yule R, Barridge BD. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus stearothermophilus* strain NU-10. *Can J Microbiol*. 1976;22:1743-50
117. Ivanova I, Miteva V, Stefanova T, Pantev A, Budakov I, Danova S, Moncheva P, Nikolova I, Dousset X, Boyaval P. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int J Food Microbiol*. 1998;42:147-158
118. Jamalifar H, Rahimi H, Samadi N, Shahverdi AR, Sharifian Z, Hosseini F, Eslahi H, Fazeli MR. Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi- drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol*. 2011;3(1):21-25
119. Jebur MS. Therapeutic efficacy of *Lactobacillus acidophilus* against bacterial isolates from burn wounds. *N Am J Med Sci*. 2010;2(12):586-591
120. Jonker D, Lina BAR, Kozianowski G. 13-Week oral toxicity study with isomaltulose (Palatinose®) in rats. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(10):1383-1389
121. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Bacteria. The type strain of *Lactobacillus casei* is ATCC 393, ATCC 334 cannot serve as the type because it represents a different taxon, the name *Lactobacillus paracasei* and its subspecies names are not rejected and the revival of the name "*Lactobacillus zae*" contravenes Rules 51b (1) and (2) of the International Code of Nomenclature of Bacteria. Opinion 82. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58(Pt 7):1764-1765
122. Kabuki T, Uenishi H, Seto Y, Yoshioka T, Nakajima H. A unique lantibiotic, thermophilin 1277, containing a disulfide bridge and two thioether bridges, *J Appl Microbiol*. 2009;106:853-862
123. Kabuki T, Uenishi H, Watanabe M, Seto Y, Nakajima H. Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *J Appl Microbiol*. 2007;102:971-980
124. Kanatani K, Oshimura M, Sano K. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(3):1061-1067
125. Kanmani P, Lim ST. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. *Food Chem*. 2013;141(2):1041-1049

126. Kaplan H, Hutkins RW. Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(4):2217-2222
127. Karska-Wysocki B, Bazo M, Smoragiewicz W. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiol Res.* 2010;165(8):674-686
128. Kaškonienė V, Stankevičius M, Bimbraitė-Survilienė K, et al. Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(4):1323-1335
129. Kaunietis A, de Jong A, Pranckutė R, Buivydas A, Kuipers OP. Draft genome sequences of two *Geobacillus* species strains, isolated from oil wells and surface soil above oil pools. *Genome Announc.* 2016;4(5):e01129-16
130. Kaunietis A, Čitavičius DJ. *Geobacillus* sp. 15 kamieno sekretuojamų bakteriocinų raiškos optimizavimas bei jų gryninimas. Magistrinis darbas, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra, Vilniaus universitetas. 2012
131. Kaur G, Malik R, Mishra S, Singh T, Bhardwaj A, Singroha G, Vij S, Kumar N. Nisin and class IIa bacteriocin resistance among *Listeria* and other foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Microb Drug Resist.* 2011;17(2):197-205
132. Kfoury M, Auezova L, Greige-Gerges H, Fourmentin S. Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. *Carbohydr Polym.* 2015;131:264-272
133. Khalaf H, Nakka SS, Sandén C, et al. Antibacterial effects of *Lactobacillus* and bacteriocin PLNC8  $\alpha\beta$  on the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol.* 2016;16(1):188
134. Khalil AA, Abou-Gabal AE, Elfaramawy AM, Khaled AE, Abdellatef AA. Lactic acid bacteria as antimycotic and antimycotoxins agents against toxigenic fusarium species associated to maize grains stored in egyptian markets to maize grains stored in Egyptian markets. *J Pure Appl Microbiol.* 2013;7:93-105
135. Khan H, Flint S, Yu PL. Enterocins in food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2010;141(1-2):1-10
136. Khan I, Oh DH. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2015;34:376-384

137. Klemashevich C, Wu C, Howsmon D, Alaniz RC, Lee K, Jayaraman A. Rational identification of diet-derived postbiotics for improving intestinal microbiota function. *Curr Opin Biotechnol*. 2014;26:85-90
138. Kramer NE, Hasper HE, van den Bogaard PTC, et al. Increased D-alanylation of lipoteichoic and a thickened septum are main determinants in the nisin resistance mechanism of *Lactococcus lactis*. *Microbiology*. 2008;154(6):1755-1762
139. Krilaviciute A, Kuisiene N. Characterization and evaluation of tandem repeats for the identification of *Geobacillus*. *Open Life Sci*. 2013;8(6):549-560
140. Krivorotova T, Cirkovas A, Maciulyte S, Staneviciene R, Budriene S, Serviene E, Sereikaite J. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. *Food Hydrocoll*. 2016;54:49-56
141. Kumar M, Tiwari SK, Srivastava S. Purification and characterization of enterocin LR/6, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* LR/6. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160(1):40-49
142. Kunová G, Rada V, Lisova I, Ročková Š, Vlková E. *In vitro* fermentability of prebiotic oligosaccharides by lactobacilli. *Czech J Food Sci*. 2011;29(Special Issue):S49-S54
143. Kuo YC, Liu CF, Lin JF, Li AC, Lo TC, Lin TH. Characterization of putative class II bacteriocins identified from a non-bacteriocin-producing strain *Lactobacillus casei* ATCC 334. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(1):237-246
144. Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm*. 2013;453(1):167-180
145. Le Leu RK, Hu Y, Brown IL, Woodman RJ, Young GP. Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis*. 2010;31(2):246-251
146. Lee H, Kim HY. Lantibiotics, Class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *J Microbiol Biotechnol*. 2011;21(3):229-235
147. Lee KH, Jun KD, Kim WS, Paik HD. Partial characterization of polyfermentacin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Lett Appl Microbiol*. 2001;32(3):146-151
148. Leejeerajumnean A, Ames JM, Owens JD. Effect of ammonia on the growth of *Bacillus* species and some other bacteria. *Lett Appl Microbiol*. 2000;30(5):385-389
149. Leone RDS, Colman TAD, Schnitzler E, Ellendersen LN, Masson ML. Evolved gas analysis (coupled TG-DSC-FTIR) applied to the thermal behaviour of inulin. *J Anal Appl Pyrolysis*. 2014;108:323-326

150. Li Z, Chen S, Gu Z, Chen J, Wu J. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. *Trends Food Sci Technol.* 2014;35(2):151-160
151. Liang Y, Haiyan Y, Jianjun Z, Thomas LV. Anti-microbial composition. EU patents: WO 2005104878 A1. Filled: May 4, 2005; Published: Nov 10, 2005
152. Likotrafiti E, Tuohy KM, Gibson GR, Rastall RA. An *in vitro* study of the effect of probiotics, prebiotics and synbiotics on the elderly faecal microbiota. *Anaerobe.* 2014;27:50-55
153. Likotrafiti E, Tuohy KM, Gibson GR, Rastall RA. Development of antimicrobial synbiotics using potentially-probiotic faecal isolates of *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium longum*. *Anaerobe.* 2013;20:5-13
154. Lim KB, Balolong MP, Kim SH, Oh JK, Lee JY, Kang DK. Isolation and characterization of a broad spectrum bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* RX7. *Biomed Res Int.* 2016; 8521476. doi:10.1155/2016/8521476.
155. Lina BAR, Jonker D, Kozianowski G. Isomaltulose (Palatinose®): A review of biological and toxicological studies. *Food Chem Toxicol.* 2002;40(10):1375-1381
156. Liu Y, Gibson GR, Walton GE. Impact of high fat diets, prebiotics and probiotics on gut microbiota and immune function, with relevance to elderly populations. *Nutr Aging.* 2015;3:171-192
157. Liu X, Lee JY ong, Jeong SJ, et al. Properties of a bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* EMD4 isolated from ganjang (soy sauce). *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(9):1493-1501
158. Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2007;329(1-2):1-11
159. Loh JY, Lim YY, Ting AS. Bacteriocin-like substances produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CF4MRS isolated from fish intestine: Antimicrobial activities and inhibitory properties. *Int Food Res J.* 2017;24(1):394-400
160. Lohans CT, Vederas JC. Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *Int J Microbiol.* 2012;2012:1-13
161. Lonkar P, Harne SD, Kalorey DR, Kurkure N V. Isolation, *in vitro* antibacterial activity, bacterial sensitivity and plasmid profile of lactobacilli. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2005;18(9):1336-1342
162. López-Cuellar M del R, Rodríguez-Hernández, Adriana-Inés Chavarría-Hernández N. LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2016;30(6):1039-1050



163. Lozo J, Vukasinovic M, Strahinic I, Topisirovic L. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16, *J Food Prot.* 2004;67(12):2727-34
164. Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll GN, Kuipers OP. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(3):455-476
165. Lücking G, Stoeckel M, Atamer Z, Hinrichs J, Ehling-Schulz M. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *Int J Food Microbiol.* 2013;166(2):270-279
166. Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J Appl Microbiol.* 2008;104(2):305-344
167. Mahdhi A, Hmila Z, Behi A, Bakhrouf A. Preliminary characterization of the probiotic properties of *Candida famata* and *Geobacillus thermoleovorans*. *Iran J Microbiol.* 2011;3(3):129-134
168. Mahmood T, Masud T, Sohail A. Some probiotic and antibacterial properties of *Lactobacillus acidophilus* cultured from dahi a native milk product. *Int J Food Sci Nutr.* 2014;65(5):582-588
169. Maina JW, Mathara JM, Kikivi GM, Ouma SO. Bacteriocins : limiting factors to optimum activity. *J Food Secur.* 2017;5(2):19-25
170. Makinen K, Berger B, Bel-Rhliid R, Ananta E. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *J Biotechnol.* 2012;162(4):356-365
171. Makras L, Van Acker G, De Vuyst L. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):6531-6537
172. Maldonado-Barragán A, Ruiz-Barba JL, Jiménez-Díaz R. Knockout of three-component regulatory systems reveals that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. *Int J Food Microbiol.* 2009;130(1):35-42
173. Mandadzhieva T, Ignatova-Ivanova T, Kambarev S, Iliev I, Ivanova I. Utilization of different prebiotics by *Lactobacillus* spp. and *Lactococcus* spp. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2011;25(SUPPL. 4):117-120
174. Manigandan T, Mangaiyarkarasi SP, Hemalatha R, Hemalatha VT, Murali NP. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Biomed Pharmacol J.* 2012;5(2):295-304

175. Mantovani HC, Cruz AMO, Paiva AD. Bacteriocin activity and resistance in livestock pathogens. In: Méndez-Vilas A, ed. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. FORMATEX. 2011:853-863
176. Marciset O, Jeronimus-Stratingh MC, Mollet B, Poolman B. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J Biol Chem*. 1997; 272:14277-14284
177. Maria M, Janakiraman S. Detection of heat stable bacteriocin from *Lactobacillus acidophilus* NCIM5426 by liquid chromatography/mass spectrometry. *Indian J Sci Technol*. 2012;5(3):2325-2332
178. Martinez B, Böttiger T, Schneider T, Rodriguez A, Sahl HG, Wiedemann I. specific interaction of the unmodified bacteriocin lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II. *Appl Environ Microbiol*. 2008: 4666-4670
179. Martirani L, Varcamonti M, Naclerio G, De Felice M. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact*. 2002;1:1-5
180. Mathot AG, Beliard E, Thuault D. *Streptococcus thermophilus* 580 Produces a Bacteriocin Potentially Suitable for Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Hard Cheese. *J Dairy Sci*. 2003;86:3068-3074
181. Meghrous J, Lacroix C, Simard RE. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiol*. 1999;16(2):105-114
182. Mendlik K, Albrecht JA, Schnepf M. Effects of fructooligofructoses chain length on the bifidobacteria of the human colon: a pilot study. *Food Nutr Sci*. 2012;3:1615-1618
183. Messner M, Kurkov S V., Jansook P, Loftsson T. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *Int J Pharm*. 2010;387(1-2):199-208
184. Millette M, Cornut G, Dupont C, Archambault D, Lacroix M. Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(7):1997-2003
185. Mills S, Stanton C, Hill C, Ross RP. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2011;2:299-329
186. Miñana-Galbis D, Pinzón DL, Lorén JG, Manresa À, Oliart-Ros RM. Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(7):1600-1604

187. Mirkovic N, Polovic N, Vukotic G, Jovic B, Miljkovic M, Radulovic Z, Diep DB, Kojic M. *Lactococcus lactis* LMG2081 produces two bacteriocins, a nonlantibiotic and a novel lantibiotic. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(8):2555-2562
188. Mongkolthananuk W. Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *J Microbiol Biotechnol.* 2012;22(12):1597-1604
189. Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control. *Microbiol Lett.* 2007;270:1-11
190. Moreno I, Lerayer ALS, Baldini VLS, Leitão MFDF. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian J Microbiol.* 2000;31(3):184-192
191. Moriwaki C, Ferreira LR, Rodella JRT, Matioli G. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus sphaericus* strain 41: Production, characterization and catalytic properties. *Biochem Eng J.* 2009;48(1):124-131
192. Mozuriene E, Bartkiene E, Juodeikiene G, et al. The effect of savoury plants, fermented with lactic acid bacteria, on the microbiological contamination, quality, and acceptability of unripened curd cheese. *LWT - Food Sci Technol.* 2016;69:161-168
193. Muhammad SA, Ahmed S. Production and characterization of a new antibacterial peptide obtained from *Aeribacillus pallidus* SAT4. *Biotechnol Reports.* 2015;8:72-80
194. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr.* 2016;4(2):119-127
195. Mussatto SI, Mancilha IM. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr Polym.* 2007;68(3):587-597
196. Naclerio G, Ricca E, Sacco M, De Felice M. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(12):4313-4316
197. Naz SA, Rasool SA. Isolation, production and characterization of bacteriocins produced by strains from indigenous environments. *Pakistan J Bot.* 2013;45(1):261-267
198. Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB et al. 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 thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G.*

- thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:433–446
199. Nazzaro F, Fratianni F, Orlando P, Coppola R. Biochemical traits, survival and biological properties of the probiotic *Lactobacillus plantarum* grown in the presence of prebiotic inulin and pectin as energy source. *Pharmaceuticals*. 2012;5(5):481-492
  200. Nes IF, Diep DB, Holo H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol*. 2007;189(4):1189-1198
  201. Nissen-Meyer J, Oppegård C, Rogne P, Haugen HS, Kristiansen PE. Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2010;2(1):52-60
  202. Nissen-Meyer J, Rogne P, Oppegård C, Haugen HS, Kristiansen PE. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009;10(1):19-37
  203. Noonpakdee W, Santivarangkna C, Jumriangrit P, Sonomoto K, Panyim S. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *Int J Food Microbiol*. 2003;81(2):137-145
  204. Novotny JF, Perry JJ. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58:2393-2396
  205. Nuryshev MZ, Stoyanova LG. New probiotic culture of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*: effective opportunities and prospects. *J Microb Biochem Technol*. 2016;8(4):290-295
  206. O'Connor PM, Ross RP, Hill C, Cotter PD. Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective. *Curr Opin Food Sci*. 2015;2:51-57
  207. O'Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol*. 2012;152(3):189-205
  208. Ogunbanwo ST, Sanni a. I, Onilude a. a. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *African J Biotechnol*. 2003;2(7):179-184
  209. Oh S, Kim SH, Worobo RW. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J Dairy Sci*. 2000;83(12):2747-2752

210. Ooi LG, Liong MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of *in Vivo* and *in Vitro* Findings. *Int J Mol Sci.* 2010;11(6):2499-2522
211. Ovchinnikov K V., Chi H, Mehmeti I, Holo H, Nes IF, Diep DB. Novel group of leaderless multi-peptide bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(17):5216-5224
212. Özdemir GB, Biyik HH. Isolation and characterization of toebicin 218, a bacteriocin, produced by *Geobacillus toebii* HBB-218. *African J Biotechnol.* 2012;11(30):7711-7719
213. Pan X, Wu T, Zhang L, Cai L, Song Z. Influence of oligosaccharides on the growth and tolerance capacity of lactobacilli to simulated stress environment. *Lett Appl Microbiol.* 2009;48(3):362-367
214. Pandey KR, Naik SR, Vakil B V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol.* 2015;52(12):7577-7587
215. Papagianni M, Anastasiadou S. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb Cell Fact.* 2009;8(1):3
216. Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP, Socol CR. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2007;50(3):521-542
217. Parnell JA, Reimer RA. Prebiotic fiber modulation of the gut microbiota improves risk factors for obesity and the metabolic syndrome. *Gut Microbes.* 2012;3(1):29-34
218. Patel S, Goyal A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech.* 2012;2:115-125
219. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K, et al. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb Cell Fact.* 2014;13(Suppl 1):S3
220. Phillips ZEV, Strauch MA. *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(3):392-402
221. Pinho E, Grootveld M, Soares G, Henriques M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr Polym.* 2014;101(1):121-135
222. Piper C, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Discovery of Medically Significant Lantibiotics. *Curr Drug Discov Technol.* 2009;6(0):1-18
223. Pokusaeva K, Kuisiene N, Jasinskyte D, Rutiene K, Saleikiene J, Chitavichius D. Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*. *Cent Eur J Biol.* 2009;4(2):196-203
224. Pranckute R, Kaunietis A, Kananavičiute R, Lebedeva J, Kuisienė N, Šaleikienė J, Čitavičius D. Differences of antibacterial activity spectra

- and properties of bacteriocins, produced by *Geobacillus* sp. bacteria isolated from different environments. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*. 2015;5(2):155-161
225. Pranckute R, Kaunietis A, Kuisiene N, Čitavičius D. Development of synbiotics with inulin, palatinose,  $\alpha$ -cyclodextrin and probiotic bacteria. *Polish J Microbiol*. 2014;63(1):33-41
  226. Pranckute R, Kaunietis A, Kuisiene N, Čitavičius DJ. Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. *Int J Biol Macromol*. 2016;89:669-676
  227. Prieto ML, O'Sullivan L, Tan SP, et al. Assessment of the bacteriocinogenic potential of marine bacteria reveals lichenicidin production by seaweed-derived *Bacillus* spp. *Mar Drugs*. 2012;10:2280-2299
  228. Quigley EMM, Quera R. Small intestinal bacterial overgrowth: Roles of antibiotics, prebiotics, and probiotics. *Gastroenterology*. 2006;130(2S):78-90
  229. Rajaram G, Manivasagan P, Thilagavathi B, Saravanakumar A. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Adv J Food Sci Technol*. 2010;2(2):138-144
  230. Reale A, Di Renzo T, Rossi F, et al. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT - Food Sci Technol*. 2015;60(2):721-728
  231. Rezapour S, Ghahremani E, Mardani M. Analysis of antibiotic resistance and antimicrobial effects of *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* isolated from Khorramabad traditional cheeses. *J Appl Biotechnol Reports*. 2015;2(1):211-214
  232. Rigaux C, André S, Albert I, Carlin F. Quantitative assessment of the risk of microbial spoilage in foods. Prediction of non-stability at 55°C caused by *Geobacillus stearothermophilus* in canned green beans. *Int J Food Microbiol*. 2014;171:119-128
  233. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Brit J Nutr*. 2010;104(S2):S1-S63
  234. Roces C, Rodríguez A, Martínez B. Cell wall-active bacteriocins and their applications beyond antibiotic activity. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2012;4(4):259-272
  235. Rodríguez JM, Cintas LM, Casaus P, Suárez A, Hernández PE. PCR detection of the lactocin S structural gene in bacteriocin-producing lactobacilli from meat. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(7):2802-2805

236. Rosenberg IM. Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques. 2nd edn., XXVI, 520p, 2005
237. Saad MA, Abdelsamei HM, Ibrahim EMA, Abdou AM, El SA. Effect of pH, heat treatments and proteinase K enzyme on the activity of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin. *BENHA Vet Med J.* 2015;28(1):210-215
238. Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, Bressollier P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Sci Technol.* 2013;50(1):1-16
239. Sadgrove N, Greatrex B, Jones GL.  $\alpha$  - Cyclodextrin encapsulation enhances antimicrobial activity of cineole - rich essential oils from Australian species of *Prostanthera* ( *Lamiaceae* ). *Nat Volatiles Essent Oils.* 2015;2(2):30-38
240. Salazar-Marroquín EL, Galán-Wong LJ, Moreno-Medina VR, Reyes-López MÁ, Pereyra-Alfárez B. Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*. *Rev Med Microbiol.* 2016;27(3):95-101
241. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edn. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2001
242. Saminathan M, Sieo CC, Kalavathy R, Abdullah N, Ho YW. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. *African J Microbiol Res.* 2011;5(1):57-64
243. Sánchez S, Chávez A, Forero A, et al. Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot (Tokyo).* 2010;63(8):442-459
244. Sánchez-Hidalgo M, Montalbán-López M, Cebrián R, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Maqueda M. AS-48 bacteriocin: Close to perfection. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(17):2845-2857
245. Saraiva AMF, Nes IF, Baracat-Pereira MC, De Queiroz MV, Mantovani HC, De Moraes CA. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD6.9. *J Microbiol Antimicrob.* 2014;6(5):79-87
246. Scapin D, Grando WF, Rossi EM, Perez KJ, Malheiros PS, Tondo EC. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LA10 against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis SE86 in mice. *Brazilian J Microbiol.* 2013;44(1):57-61
247. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.* 2006;1(1):16-22
248. Schnürer J, Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Technol.* 2005;16(1-3):70-78
249. Scholz T, Demharter W, Hensel R, Kandler, O. *Bacillus pallidus* sp. nov., a new thermophilic species from sewage. *Syst Appl Microbiol.* 1987;9:91-96

250. Sharp RJ, Bingham HA, Comer MJ, Atkinson A. Partial characterization of a bacteriocin (Thermocin) from *Bacillus stearothermophilus* RS93. *J Gen Microbiol.* 1979;111:449-451
251. Shokryazdan P, Faseleh Jahromi M, Navidshad B, Liang JB. Effects of prebiotics on immune system and cytokine expression. *Med Microbiol Immunol.* 2017;206(1):1-9
252. Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite.* 2008;51(3):456-467
253. Slavin J. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients.* 2013;5(4):1417-1435
254. Śliżewska K, Kapuśniak J, Barczyńska R, Jochym K. Resistant dextrins as prebiotic. In: Chang C-F, ed. *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology.* InTech; 2012
255. Smokvina T, Wels M, Polka J, Chervaux C, Brisse S, Boekhorst J, van Vlieg, JETH, Siezen RJ. *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. *PLoS One.* 2013;8(7):e68731
256. Snyder AB, Worobo RW. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: Antimicrobial peptides for food safety. *J Sci Food Agric.* 2014;94(1):28-44
257. Sonenshein AL. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* 2000;3(6):561-566
258. Song LX, Bai L, Xu XM, He J, Pan SZ. Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry. *Coord Chem Rev.* 2009;253(9-10):1276-1284
259. Soukoulis C, Behboudi-Jobbehdar S, Yonekura L, Parmenter C, Fisk ID. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. *Food Chem.* 2014;159:302-308
260. Sousa VMC, Santos EF, Sgarbieri VC. The Importance of prebiotics in functional foods and clinical practice. *Food Nutr Sci.* 2011;2(2):133-144
261. Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol.* 2008;36(1):30-42
262. Stevens DL, Bryant AE. Severe Group A Streptococcal Infections. In: Stevens DL, Ferretti JJ, eds. *Streptococcus Pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations.* University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016:1-22
263. Straume D, Kjos M, Nes IF, Diep DB. Quorum-sensing based bacteriocin production is down-regulated by N-terminally truncated species of gene activators. *Mol Genet Genomics.* 2007;278:283-293



264. Sumi CD, Yang BW, Yeo I-C, Hahm YT. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol.* 2015;61(2):93-103
265. Swetwathana A, Zendo T, Nakayama J, Sonomoto K. Identification of Nisin Z producing *Lactococcus lactis* N12 associated with traditional Thai fermented rice noodle (Kanom Jien). *Asian J Food Agro-industry.* 2009;2(2):116-125
266. Swift S, Chepulis LM, Uy B, Radcliff FJ. Enhanced antibacterial activity of MGO TM Manuka Honey complexed with  $\alpha$  - cyclodextrin (Manuka Honey with CycloPower™). *Funct Foods Heal Dis.* 2014;4(5):173-181
267. Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research \*. *Pure Appl Chem.* 2004;76(10):1825-1845
268. Szente L, Szejtli J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci Technol.* 2004;15(3-4):137-142
269. Szerman N, Schroh I, Rossi AL, Rosso AM, Krymkiewicz N, Ferrarotti SA. Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Bioresour Technol.* 2007;98(15):2886-2891
270. Szkaradkiewicz K, Karpiński T. Probiotics and prebiotics. *J Biol Earth Sci.* 2016;3(1):M42-M47
271. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.* 1976;40(3):722-756
272. Tahara T, Oshimura M, Umezawa C, Kanatani K. Isolation, partial characterization, and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(3):892-897
273. Tan JN, Ahmar M, Queneau Y. Isomaltulose oxidation and dehydration products as starting materials towards fine chemicals. *Curr Org Chem.* 2014;18(14):1768-1787
274. Todorov SD, Wachsman M, Tomé E, et al. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiol.* 2010;27(7):869-879
275. Todorov SD. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action. *Brazilian J Microbiol.* 2009;40:209-221
276. Toh H, Oshima K, Nakano A, et al. Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. *PLoS One.* 2013;8(10):e75073
277. Tomar SK, Anand S, Sharma P, Sangwan V, Mandal S. Role of probiotic, prebiotics, synbiotics and postbiotics in inhibition of pathogens. In: Méndez-Vilas A, ed. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic*

- Science, Technological Advances and Educational Programs. FORMATEX; 2015:717-732*
278. Tonouchi H, Yamaji T, Uchida M, et al. Studies on absorption and metabolism of palatinose (isomaltulose) in rats. *Brit J Nutr.* 2011;105(1):10-14
  279. Topisirovic L, Kojic M, Fira D, Golic N, Strahinic I, Lozo J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int J Food Microbiol.* 2006;112(3):230-235
  280. Touraki M, Frydas I, Karamanlidou G, Mamara A. Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* NCIMB 3610 that exhibits antimicrobial activity against fish pathogens. *J Biol Res.* 2012;18:310-319
  281. Towle KM, Vederas JC. Structural features of many circular and leaderless bacteriocins are similar to those in saposins and saposin-like peptides. *Med Chem Commun.* 2017;8(2):276-285
  282. Truter I. Probiotics and prebiotics. *Prof Nurs Today.* 2010;16(3). doi:10.1002/9781118982907.ch30.
  283. Urbietta MS, Donati ER, Chan KG, Shahar S, Sin LL, Goh KM. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnol Adv.* 2015;33(6):633-647
  284. Valcheva R, Dieleman LA. Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016;30(1):27-37
  285. Valente AJM, Söderman O. The formation of host-guest complexes between surfactants and cyclodextrins. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;205:156-176
  286. Vamanu E, Vamanu A. The influence of prebiotics on bacteriocin synthesis using the strain *Lactobacillus paracasei* CMGB16. *African J Microbiol Res.* 2010;4(7):534-537
  287. van der Donk WA, Garg N, Goto Y, Tang W. Class I and II lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. US patents: US 20150050256 A1. Filled: 7 Feb, 2012; Published: 19 Feb, 2015
  288. van Zanten GC, Knudsen A, Röytiö H, et al. The effect of selected synbiotics on microbial composition and short-chain fatty acid production in a model system of the human colon. *PLoS One.* 2012;7(10):e47212
  289. Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, et al. Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. *Gut.* 2017;0:1-7
  290. Vasantha N, Freese E. The role of manganese in growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol.* 1979;(112):329-336

291. Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cel Biol*. 1994;5(1):25-40
292. Villani F, Pepe O, Mauriello G, Salzano G, Moschetti G, Coppola S. Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. *Int J Food Microbiol*. 1995;25:179-190
293. Wagner EM, Jen K-LC, Artiss JD, Remaley AT. Dietary alpha-cyclodextrin lowers low-density lipoprotein cholesterol and alters plasma fatty acid profile in low-density lipoprotein receptor knockout mice on a high-fat diet. *Metabolism*. 2008;57(8):1046-1051
294. Walsh CJ, Guinane CM, Hill C, Ross RP, O'Toole PW, Cotter PD. *In silico* identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome database. *BMC Microbiol*. 2015;15(1):183
295. Walsh CJ, Guinane CM, O'Toole PW, Cotter PD. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Lett*. 2014;588(22):4120-4130
296. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(16):4985-4996
297. Wang CY, Lin PR, Ng CC, Shyu YT. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*. 2010;16(6):578-585
298. Wang Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Res Int*. 2009;42(1):8-12
299. Ward GA, Somkuti DJ. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1995;43:330-335
300. Ward LJ, Timmins MJ. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol*. 1999;29:90-92
301. Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwivathana A. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Sci*. 2016;120:118-132
302. Wu L, Birch RG. Isomaltulose is actively metabolized in plant cells. *Plant Physiol*. 2011;157(4):2094-2101
303. Zeigler DR. The Genus *Geobacillus*. Introduction and strain catalog. In: *Bacillus Genetic Stock Center. Stain catalog*. Vol 3, 7th ed. 2001:1-25
304. Zeigler DR. The *Geobacillus* paradox: Why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology*. 2014;160:1-11

305. Zhang HM, Li Z, Uematsu K, Kobayashi T, Horikoshi K. Antibacterial activity of cyclodextrins against *Bacillus* strains. *Arch Microbiol.* 2008;190(5):605-609
306. Zhao R, Duan G, Yang T, Niu S, Wang Y. Purification, characterization and antibacterial mechanism of bacteriocin from *Lactobacillus acidophilus* XH1. *Trop J Pharm Res.* 2015;146(6):989-995
307. Zhao X, Kuipers OP. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of *Bacillales* species. *BMC Genomics.* 2016;17(1):882
308. Zimina MI, Sukhih SA, Babich OO, Noskova SY, Abrashina AA, Prosekov AY. Investigating antibiotic activity of the Genus *Bacillus* strains and properties of their bacteriocins in order to develop next-generation pharmaceuticals. *Food Raw Mater.* 2016;4(2):92-100

**Priedas Nr. 1** Šiame darbe tirta ir kitų aprašytų termofilinių bei termotolerantinių bakterijų produkuojamų bakteriocinų pagrindiniai bruožai. Crom. – bakteriocino genai lokalizuoti chromosomoje. ND – nėra duomenų.

| Bakteriocinas                    | Producentas  | Klasė/<br>Dydis/<br>Genai | Inhibuojantys fermentai                                | Atsparumas temperatūroms   | pH stabilumas                  | Antibakterinis spektras*  | Literatūros šaltinis    |
|----------------------------------|--|---------------------------|--|--|--------------------------------|---|-------------------------|
| <b>118 kamieno bakteriocinas</b> | 118 termofilinis kamienas (artimiausias <i>Aeribacillus pallidus</i> ) | ND<br>~5 kDa<br>Chrom.    | Proteinazė K<br>Pronezė E                              | Termostabilus (po 30 min. 100 °C lieka iki %, po 15 min. 121°C lieka iki 25% akt.) | 3-10                           | <i>B. cereus</i> ATCC 11778<br><i>Ec. faecalis</i> ATCC 29212<br><i>S. aureus</i> ATCC 25923<br><i>St. pyogenes</i> MPK 2331  | Šis darbas              |
| Toibicinas 218                   | <i>G. toebii</i> HBB-218   | ND<br>5,5 kDa<br>ND       | Pronezė E<br>Proteinazė K<br>B-glukuronidazė<br>Lipazė | Termostabilus (po 20 min. 121 °C lieka 69% akt.)                                   | 3-11                           | <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB-134, HBB-229<br><i>B. sphaericus</i> DSM 396<br><i>Bo. thermosphacta</i> DSM 20171<br><i>Ce. fimi</i> DSM 20114<br><i>Cl. pasteurianum</i> DSM 525<br><i>Ec. faecalis</i> ATCC 51299<br><i>Ec. gallinarium</i> MÇ-3, LC-M1<br><i>Ec. faecium</i> MS-1, KT-2<br><i>Ec. durans</i> K-1, KT-1, <i>Ec. avium</i> AS-3<br><i>Geobacillus</i> sp. HBB-234, HBB-247, HBB-269, HBB-270, HBB-301<br><i>G. stearothermophilus</i> DSMZ 22<br><i>Lb. plantarum</i> DSM 20174, <i>Listeria</i> sp.<br><i>Mc. luteus</i> ATCC 934 | Özdemir ir Biyik (2012) |
| Geobacilinas I                   | <i>G. thermodenitrificans</i> NG80-2                                   | IA<br>ND<br>Chrom.        | ND   | Stabilesnis už niziną A 60 °C temp.  | Stabilesnis už niziną A pH 7-8 | <i>B. anthracis</i> Sterne 7702<br><i>B. subtilis</i> ATCC 6633<br><i>Lc. lactis</i> HP ATCC 11602<br><i>St. dysgalatiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> ATCC 27957<br>Meticilinui atsparus <i>S. aureus</i> C5<br>Vankomicinui atsparus <i>E. faecium</i> CNRZ  | Garg ir kt. (2012)      |
| Geobacilinas II                  | <i>G. thermodenitrificans</i> NG80-2                                   | II<br>ND<br>Chrom.        | ND   | ND   | ND                             | ND  |                         |
| Termocinas                       | <i>G. stearothermophilus</i> NU10                                      | ND<br>mažas<br>ND         | Proteazės<br>$\alpha$ -amilazė                         | Termostabilus  | ND                             | ND  | Yule ir Barridge (1976) |

|                |  |                     |  |   |      |   |                            |
|----------------|--|---------------------|--|---|------|---|----------------------------|
| Termocinas 17  | G.<br><i>stearothermophilus</i><br>17  | ND<br>6,9 kDa<br>ND | Proteinazė K<br>Tripsinas<br>$\alpha$ -chymotripsinas<br>$\alpha$ -amilazė<br>(Stipriai sumažina akt.:<br>papainas ir ficinas) | Termostabilus<br>(akt. Išlieka po<br>30min. 100 °C) | 5-10 | <i>B. cereus</i> DSM 12001<br><i>G. vulcani</i> DSM<br><i>G. kaustophilus</i> DSM 7263 <sup>T</sup><br><i>G. subterraneus</i> DSM 13552 <sup>T</sup><br><i>G. uzenensis</i> DSM 13551 <sup>T</sup><br><i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366 <sup>T</sup><br><i>G. caldoxylosilyticus</i> DSM 12041 <sup>T</sup><br><i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 <sup>T</sup> , DSM 466<br><i>G. stearothermophilus</i> NUB36187, NUB3621R                                     | Pokusaeva<br>ir kt. (2009) |
| Termocinas 30  | G.<br><i>stearothermophilus</i><br>30  | ND<br>5,6 kDa<br>ND | Papainas   | Termostabilus<br>(akt. Išlieka po<br>30min. 100 °C) | 4-10 | <i>G. vulcani</i> DSM<br><i>G. kaustophilus</i> DSM 7263 <sup>T</sup><br><i>G. subterraneus</i> DSM 13552 <sup>T</sup><br><i>G. uzenensis</i> DSM 13551 <sup>T</sup><br><i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366 <sup>T</sup><br><i>G. caldoxylosilyticus</i> DSM 12041 <sup>T</sup><br><i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 <sup>T</sup> , DSM 466<br><i>G. stearothermophilus</i> NUB36187, NUB3621R<br><i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853<br><i>S. haemolyticus</i> P903 | Pokusaeva<br>ir kt. (2009) |
| Termocinas 31  | G.<br><i>stearothermophilus</i><br>31  | ND<br>7,1 kDa<br>ND | Proteinazė K<br>(Stipriai sumažina akt.:<br>$\alpha$ -chymotripsinas,<br>$\beta$ -chymotripsinas)                              | Termostabilus<br>(akt. Išlieka po<br>30min. 100 °C) | 4-10 | <i>G. vulcani</i> DSM<br><i>G. kaustophilus</i> DSM 7263 <sup>T</sup><br><i>G. subterraneus</i> DSM 13552 <sup>T</sup><br><i>G. uzenensis</i> DSM 13551 <sup>T</sup><br><i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366 <sup>T</sup><br><i>G. caldoxylosilyticus</i> DSM 12041 <sup>T</sup><br><i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 <sup>T</sup><br><i>G. stearothermophilus</i> NUB36187, NUB3621R   | Pokusaeva<br>ir kt. (2009) |
| Termocinas 32A | G.<br><i>stearothermophilus</i><br>32A | ND<br>7,2 kDa<br>ND | Proteinazė K<br>(Stipriai sumažina akt.:<br>$\alpha$ -chymotripsinas,<br>$\beta$ -chymotripsinas,<br>papainas, ficinas)        | Termostabilus<br>(akt. Išlieka po<br>30min. 100 °C) | 4-10 | <i>B. cereus</i> DSM 12001<br><i>G. vulcani</i> DSM<br><i>G. kaustophilus</i> DSM 7263 <sup>T</sup><br><i>G. subterraneus</i> DSM 13552 <sup>T</sup><br><i>G. uzenensis</i> DSM 13551 <sup>T</sup><br><i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366 <sup>T</sup><br><i>G. caldoxylosilyticus</i> DSM 12041 <sup>T</sup><br><i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 <sup>T</sup> , DSM 466<br><i>G. stearothermophilus</i> NUB36187, NUB3621R<br><i>S. haemolyticus</i> P903      | Pokusaeva<br>ir kt. (2009) |

|                    |  |   |   |   |         |  |                               |
|--------------------|--|---|---|---|---------|--|-------------------------------|
| Termocinas 93      | <i>G. stearothermophilus</i> RS93                    | ND<br>13,5 kDa<br>ND                          | Tripsinas<br>Pronazė<br>Chimotripsinas  | Termostabilus<br>(akt. lieka 75 °C)   | 4,1-9,4 | <i>B. caldolyticus</i><br><i>B. caldovelox</i> ,<br><i>B. caldotenax</i><br><i>B. subtilis</i> ATCC 10783<br><i>G. stearothermophilus</i> (NCAI503, ATCC 1201 6, 240, 262, 10, 4st, RS44)  | Sharp ir kt.<br>(1979)        |
| Termoleovorinas S2 | <i>B. thermoleovorans</i> NR-9 termofilinis kamienas | ND<br>42 kDa<br>ND                            | Proteinazė K (labiau N9)<br>Pepsinas  | Stabilūs iki 70-80 °C<br>(S2 stabilesnis nei N9)  | 3-10    | <i>B. thermoleovorans</i><br><i>Sl. typhimurium</i><br><i>Br. catarrhalis</i><br><i>St. faecalis</i><br><i>T. aquaticus</i>  | Novotny ir Perry<br>(1992)    |
| Termoleovorinas N9 |  | ND<br>36 kDa<br>ND                            |   |   |         |  |                               |
| Bacilocinas 490    | <i>B. licheniformis</i> 490/5 termofilinis kamienas  | ND<br>2 kDa<br>ND                             | Pronazė E<br>Proteinazė K   | Termostabilus<br>(po 1h 100 °C lieka 46,4 % akt., išlaiko akt. po 12 mėn. 4 °C)                     | 3,5-11  | <i>B. anthracis</i> 7700<br><i>B. cereus</i> 6A2<br><i>B. licheniformis</i> 5 A2<br><i>B. subtilis</i> AZ56<br><i>B. smithii</i> PRO/S<br><i>G. stearothermophilus</i> 9A19<br><i>L. innocua</i><br><i>S. epidermidis</i>  | Martirani ir kt. (2002)       |
| Termofilinas 110   | <i>St. thermophilus</i> ST110                        | ND<br>Iš dviejų komponentų po 4-4,5 kDa<br>ND | Pepsinas, tripsinas, papainas, pronazė, proteinazė K, amilogliukozidazė, <i>B. subtilis</i> proteazė, chimotripsinas, leucino aminopeptidazė, karboksipeptidazė, α-amilazė, lizocimas | Termostabilus<br>(po 60 min. 100 °C išlieka aktyvus, po 90 min. 100 °C akt. praranda)               | ND      | <i>Ec. faecalis</i><br><i>L. monocytogenes</i> (silpnai)<br><i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br><i>Lb. debrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i><br><i>Pc. acidilactici</i><br><i>Pc. pentosaceus</i><br><i>Pc. dextrinicus</i><br><i>Pc. parvulus</i><br><i>Pc. damnosus</i><br><i>St. thermophilus</i> | Gilbreth ir Somkuti<br>(2005) |
| Termofilinas 580   | <i>St. thermophilus</i> 91L580                       | ND<br>>100 kDa agregatai<br>ND                | Tripsinas<br>Ficinas<br>Pronazė E<br>Papainas<br>α-amilazė<br>Proteinazė K  | Termolabilus<br>(akt. išlaikomas iki 10 min. 60 °C, po 30 min. lieka 50 %, po 1 val. praranda akt.) | ND      | <i>B. cereus</i> 1101<br><i>Bo. thermosphacta</i> 6911<br><i>Ec. faecium</i><br><i>Ec. faecalis</i> 29912<br><i>Cl. sporogenes</i> 60531<br><i>Cl. butyricum</i> 5291<br><i>Cl. tyrobutyricum</i> 6081<br><i>L. innocua</i> 33090<br><i>St. thermophilus</i> NG402   | Mathot ir kt. (2003)          |

|                   |                                    |  |                     |  |        |   |   |                             |
|-------------------|------------------------------------|--|---------------------|--|--------|---|---|-----------------------------|
| Termofilinas 13   | <i>St. thermophilus</i> Sfi 13     | IIb, 2 peptidai: ThmA (5,776 kDa) ir ThmB (3,910 kDa) <i>ThmA</i> ir <i>ThmB</i> ; 3,8 kb  | ND                  | Termostabilus (1val. 100 °C)                   | 1,6-10 | <i>B. cereus</i> C14<br><i>B. subtilis</i> A2<br><i>Bf. bifidum</i> BB9<br><i>Cl. botulinum</i> 100003<br><i>Cl. tyrobutyricum</i> 107001<br><i>Ec. Faecium</i> SFM1<br><i>L. innocua</i> 24<br><i>L. monocytogenes</i> 59<br><i>Lb. acidophilus</i> LQ1  | <i>Lb. helveticus</i> LH3<br><i>Lc. cremoris</i> SC11<br><i>Le. cremoris</i> LCC1<br><i>Le. mesenteroides</i> LCM18<br><i>Mc. varians</i> MCV1<br><i>Propionibacterium</i> PP1<br><i>S. carnosus</i> STC7<br><i>St. thermophilus</i> SFi3 | Marciset ir kt. (1997)      |
| Termofilinas 1277 | <i>St. thermophilus</i> SBT 1277   | All 3,487 kDa<br>5 ORF, 2,7 kb (strukt. genas <i>tepA</i> , 0,42 kb)   | Proteinazė K        | Termostabilus                                  | ND     | <i>B. cereus</i> IFO13494<br><i>Cl. butyricum</i> SBT3516<br><i>Cl. sprogenes</i> IFH 493,<br><i>Cl. tyrobutyricum</i> SBT3517<br><i>Ec. faecalis</i> SBT3515<br><i>Lb. acidophilus</i> JCM1132<br><i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SBT0164<br><i>Lb. helveticus</i> SBT2171, SBT1270, SBT10511<br><i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC11454<br><i>M. lacticum</i> SBT3513, BT3514<br><i>St. thermophilus</i> SBT10137, SBT10814, ATCC19258, SBT10813, SBT10838, SBT10914 |   | Kabuki ir kt. (2007, 2009)  |
| Termofilinas 9    | <i>St. thermophilus</i> LMD-9      | IIb – daugiakomponentis (2,5-4,5 kDa)<br>Chrom, 3 bakteriocinų kod. operonai ( <i>blpD<sub>St</sub>-orf2</i> , <i>blpU<sub>St</sub>-orf3</i> , <i>blpE<sub>St</sub>-blpF<sub>St</sub></i> ( <i>bac<sub>St</sub></i> operonai) ir <i>blpG<sub>St</sub></i> genas (imuniteto ir modifikavimo), koduoja tiol-disulfido oksidazę | ND                  | ND   | ND     | <i>B. coagulans</i> NCIB8523<br><i>B. fusiformis</i> SI0056<br><i>Ec. faecalis</i> OG1X, JH2-SS, JH2-2<br><i>L. monocytogenes</i> IHE-92<br><i>L. ivanovii</i> IHE-3<br><i>L. innocua</i> IHE-2<br><i>L. seeligeri</i><br><i>Lc. lactis</i> IL-1403, MG1363<br><i>St. thermophilus</i> SFi16, LMG18311<br><i>St. salivarius</i>   |   | Fontaine ir Hols (2008)     |
| Termofilinas T    | <i>St. thermophilus</i> ACA-DC0040 | II 2,5 kDa<br>ND   | Proteazės α-amilazė | Termostabilus (akt. išlieka po 30 min. 100 °C) | 1-12   | <i>Cl. sporogenes</i> C22/10<br><i>Cl. tyrobutyricum</i> NCDO-1754<br><i>Lb. helveticus</i> ATCC 15009<br><i>Lc. cremoris</i> CNRZ-117  |   | Aktypis ir kt. (1998, 2007) |



|                   |                                       |                          |                      |  |                        |   |   |                                  |
|-------------------|---------------------------------------|--------------------------|----------------------|--|------------------------|---|---|----------------------------------|
| Termofilinas A    | <i>St. thermophilus</i><br>ST134      | II<br>3,849 kDa<br>ND    | ND                   | Termostabilus  | Toleruoja rūgštinių pH | <i>Bacillus</i><br><i>Bifidobacterium</i><br><i>Clostridium</i><br><i>Enterococcus</i><br><i>L. innocua</i><br><i>L. monocytogenes</i>  | <i>Lactobacillus</i><br><i>Lactococcus</i><br><i>Leuconostoc</i><br><i>Staphylococcus</i><br><i>Streptococcus</i> | Ward ir Somkuti (1995)           |
| Termofilinas 347  | <i>St. thermophilus</i><br>347        | IIa<br>2,5-6,2 kDa<br>ND | Proteazės            | Termostabilus<br>(akt. išlieka po 1 val.<br>100 °C, po 15 min.<br>121°C lieka 50 % akt.)                               | ND                     | <i>L. monocytogenes</i><br>Kelios artimai susiję LAB  |   | Villani ir kt. (1995)            |
| Termofilinas 81   | <i>St. thermophilus</i> 81            | II<br>4,5 kDa<br>ND      | ND                   | Termolabilus, bet išlaiko akt. po 6 mėn. laikymo 40 °C   | 3-10                   | <i>Bacillus</i><br><i>E.coli</i><br><i>Lb. delbrueckii</i><br>subsp. <i>bulgaricus</i>  | <i>L. monocytogenes</i><br><i>Sl. typhimurium</i><br><i>Y. pseudotuberculosis</i><br><i>Y. enterocolitica</i>     | Ivanova ir kt. (1998)            |
| Termofilinas ST-1 | <i>St. thermophilus</i><br>ACA-DC0001 | IIc<br>30 kDa<br>ND      | Pronazė<br>Tripsinas | Termolabilus<br>(po 10 min. 50 °C akt. išlieka, po 10 min. 60 °C akt. prarandamas), stabilus 30, 25 ir 4 °C kelis mėn. | 4-9                    | <i>Ec. faecalis</i> ATCC 10741, EF1<br><i>Er. rubrifasciens</i> BPIC 1710<br><i>L. innocua</i> BL 86/26<br><i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0085/86<br><i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ACA-DC 127<br><i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CNRZ 117<br><i>P. syringae</i> pv. <i>lisi</i> BPIC 1549<br><i>St. thermophilus</i> ST 20, ST 112<br><i>S. aureus</i> ATCC 29996<br><i>X. campestris</i> pv. <i>graminis</i> BPIC 1660 |   | Aktypis ir Kalantzopoulos (2003) |

\*Genčių sutrumpinimai: *B.* – *Bacillus*, *Bo.* – *Broxhothrix*, *Br.* – *Branhamella*, *Ce.* – *Cellulomonas*, *Cl.* – *Clostridium*, *E.* – *Escherichia*, *Ec.* – *Enterococcus*, *Er.* – *Erwinia*, *Y.* – *Yersinia*, *L.* – *Listeria*, *Lb.* – *Lactobacillus*, *Lc.* – *Lactococcus*, *Le.* – *Leuconostoc.*, *M.* – *Microbacterium*, *Mc.* – *Micrococcus*, *P.* – *Pseudomonas*, *Pc.* – *Pediococcus*, *S.* – *Staphylococcus*, *St.* – *Streptococcus*, *T.* – *Thermus*

**Priedas Nr. 2** LAB rūšių, atitinkančių naudotų šiame darbe, poveikis producentui artimoms ir patogeninėms mikroorganizmų rūšims.

| <i>Lactobacillus paracasei</i> ir <i>L. casei</i> kamienų antibakteriniai spektrai   |   |   |  |   |
|--|---|---|--|---|
| Tirti mikroorganizmai* ir poveikis jiems   |   |   | Aktyvus kamienas   | Literatūros šaltinis                                    |
| Inhibavo:<br><i>L. seeligeri</i> CIP79.46<br><i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112<br><i>L. innocua</i> ATCC 33091, CIP 78.44<br><i>L. welshimeri</i> ATCC 43551<br><i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 21052, ATCC 14957<br><i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014<br><i>Lb. casei</i> ATCC 393, ATCC 27139        | Neinhibavo:<br><i>Le. mesenteroides</i> ATCC 8293<br><i>St. thermophilus</i> ATCC 19987<br><i>Cit. freundii</i> ATCC 8090<br><i>Ec. faecalis</i> ATCC 19433<br><i>Ps. multocida</i> ATCC 15742<br><i>En. aerogenes</i> ATCC 13048<br><i>B. subtilis</i> ATCC 6633<br><i>Y. enterocolitica</i> HER 1068<br><i>Sh. dysenteriae</i> ATCC 13313<br><i>Sh. flexneri</i> ATCC 29903<br><i>Lc. lactis</i> ATCC 11454, MG1363 | <i>Lb. casei</i> ATCC 334, ATCC 27092<br><i>Lb. paracasei</i> ATCC 25302,<br><i>Lb. rhamnosus</i> DSM 6594, ATCC 53103, HN001,<br>ATCC 9595, TCELL-1, ATCC 10863<br><i>Lb. gasseri</i> ATCC 33323<br><i>Lb. crispatus</i> ATCC 33820<br><i>Lb. plantarum</i> ATCC 10241, ATCC 14917<br><i>Lb. helveticus</i> ATCC 15009<br><i>Lb. bulgaricus</i> ATCC 11842<br><i>Lb. fermentum</i> ATCC 14931<br><i>Lb. brevis</i> ATCC 8287 | <i>Lb. paracasei</i> ATCC 334                                      | Kuo ir kt. (2013)                                       |
| Inhibavo:<br><i>E. coli</i> ATCC 8733  | <i>K. pneumonia</i> ATCC 5510<br><i>P. fluorescens</i> ATCC 13525   | <i>Sl. enteritidis</i> ATCC 13076   | <i>Lb. paracasei</i> ATCC 334                                      | Amdekar ir kt. (2010)                                   |
| Inhibavo:<br><i>Ec. avium</i> DSM 20679T BHI/37<br><i>Ec. casseliflavus</i> DSM 20680 <sup>T</sup><br><i>Ec. cecorum</i> DSM 20682 <sup>T</sup><br><i>Ec. durans</i> DSM 20633 <sup>T</sup><br><i>Ec. saccharolyticus</i> DSM 20726 <sup>T</sup><br><i>Ec. sulfureus</i> DSM 6905 <sup>T</sup> | <i>Ec. faecalis</i> DSM 20478 <sup>T</sup> , DSM 2570, DSM 2981<br><i>Ec. faecium</i> DSM 20477 <sup>T</sup><br><i>Ec. gallinarum</i> DSM 20628 <sup>T</sup> , DSM 20160 <sup>T</sup><br><i>L. innocua</i> HPB13, L19<br><i>L. ivanovii</i> HPB28, DSM 20750 <sup>T</sup> , DSM 12491 <sup>T</sup><br><i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114, 10403S, H90 2008, F95 2008, Lm15<br><i>Lb. curvatus</i> RI-504              |   | <i>Lb. casei</i> ir <i>Lb. paracasei</i> izoliatai                 | Inglin ir kt. (2015)                                    |
| Inhibavo: Enterotoksigeninę <i>E. coli</i> ATCC 35401, Uropatogeninę <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>Sl. enteritidis</i> IMM 2   |   |   | <i>Lb. paracasei</i> B21060  | Drago ir kt. (1997)                                     |
| Inhibavo:<br><i>B. cereus</i> ATCC 11778   | <i>B. fragilis</i> ATCC 25285<br><i>B. subtilis</i> ATCC 8  | <i>St. faecalis</i> ATCC 29212<br><i>St. pneumoniae</i> ATCC 49619  | <i>S. aureus</i> ATCC 25923, MR-58<br><i>Mc. flavus</i> ATCC 10240 | <i>Lb. paracasei</i> BGHO1<br>Topisirovic ir kt. (2006) |
| Inhibavo:<br><i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Sl. enterica</i>  |   |   | <i>Lb. paracasei</i> F08   | Wang ir kt. (2010)                                      |
| Inhibavo:<br><i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853  |   |   | <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BGBUK2-16             | Lozo ir kt. (2004)                                      |
| Inhibavo:<br><i>B. subtilis</i> ATCC 11774 (jautrus kamienas), <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i>  |   |   | <i>Lb. paracasei</i> HD1-7   | Ge ir kt. (2016)  |

**Lactococcus lactis** kamienų antibakteriniai spektrai

| Tirti mikroorganizmai* ir poveikis jiems                             |   |                                      |   | Aktyvus kamienas   | Literatūros šaltinis      |
|--|---|--------------------------------------|---|--|---------------------------|
| Inhibavo:  | <i>Ec. faecalis</i> JCM 5803  |                                      | <i>L. innocua</i> ATCC 33090  | Nizino A producentas   |                           |
| <i>B. circulans</i> JCM 2504   | <i>Lb. plantarum</i> ATCC 14917, ATCC 8014  |                                      | <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117  | NCDO 497;  |                           |
| <i>B. coagulans</i> JCM 2257   | <i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157   |                                      | <i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124               | Nizino Z producentas   | Swetwathana ir kt. (2009) |
| <i>B. subtilis</i> JCM 1465  | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435   |                                      | <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 12600                            | IO-1 JCM 7638;   |                           |
| <i>Pc. pentosaceus</i> JCM 5885, JCM 5890, TISTR 536                 | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TUA  |                                      | <i>S. carnosus</i> LTH 2102   | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> N12   |                           |
|  | <i>Mc. luteus</i> IFO 12708   |                                      | <i>K. varians</i> LTH 1545  |  |                           |
| Inhibavo:  |   | <i>Cl. difficile</i> CIP 104282      |   |  |                           |
| <i>E. coli</i> O157:H7 CIP 103571                                    |   | <i>L. monocytogenes</i> CIP 82.110T  |   | <i>Lc. lactis</i> R1058  | Grimoud ir kt. (2010)     |
| <i>Sl. enterica</i> spp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium CIP 60.62T |   | <i>Cam. jejuni</i> CIP 70.2T         |   |  |                           |
| Inhibavo:  | <i>Ec. faecium</i>  | <i>Lb. plantarum</i> πr              | Neinhibavo:   | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>   |                           |
| <i>B. cereus</i> BS12  | <i>L. monocytogenes</i>   | <i>Lb. plantarum</i> gobetti         | <i>S. aureus</i> (2 kamienai)   | 3 izoliatai: CWBI-B1410/27/28 iš fermentuotų maisto produktų                       | Diop ir kt. (2007)        |
| <i>B. coagulans</i> LMG 6326   | <i>Lb. brevis</i> 7761  | <i>Lb. rhamnosus</i>                 | <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LMG 9192                       |  |                           |
| <i>B. subtilis</i>   | <i>Lb. fermentum</i> MU1  | <i>Lb. rhamnosus</i> mbanick Senegal | <i>Sl. typhimurium</i>  |  |                           |
| <i>S. carnosus</i>   | <i>Lb. helveticus</i> LMG 6413T   | <i>Lb. curvatus</i>                  | <i>C. albicans</i>  |  |                           |
| <i>St. thermophilus</i>  | <i>Lb. doderlein</i> THT  | <i>Pc. pentosaseus</i>               |   |  |                           |
| Inhibavo:  | <i>L. innocua</i> BL86/26B  |                                      | <i>S. aureus</i> ME8245-3, 8452 (LMGT)                                      |  |                           |
| <i>B. subtilis</i> DSMZ 347  | <i>L. ivanovii</i>  |                                      | <i>S. aureus</i> 4759, 4052, 4784, 3870, 4119, 3212, 3702, 4716, 3975, 3129 | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PD6.9                                       | Saraiva ir kt. (2014)     |
| <i>Ec. faecalis</i> v583   | <i>L. monocytogenes</i> Scott A   |                                      | <i>St. pneumoniae</i> TIGR4   |  |                           |
| <i>Lc. lactis</i> IL1403   | <i>Mc. luteus</i> ATCC 4698, ATCC 10240   |                                      |   |  |                           |
| Inhibavo:  | <i>P. aeruginosa</i> ATCC29212  | <i>Sl. paratyphi</i> A               |   | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGSM1-19                                    | Topisirovic ir kt. (2006) |
| <i>Mc. flavus</i> ATCC10240  | <i>S. aureus</i> ATCC25923  |                                      |   |  |                           |
| Inhibavo:  | <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313, ATCC 19113, Lm 04, Lm 21, FRDC, Scott A3, FRDC 8853, FRDC 8856, FRDC 88171  | <i>L. welchimeri</i> ATCC 35897      |   | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> UL719 (Nizinas Z) | Meghrous ir kt. (1999)    |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633   |   | <i>Lc. cremoris</i> ATCC 9596        |   | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 (Nizinas A)                      |                           |
| <i>Cl. butyricum</i> ATCC 860  |   | <i>Lc. diacetylactis</i> ATCC 11057  |   |  |                           |
| <i>Cl. perfringens</i> ATCC 3628                                     | <i>L. grayi</i> ATCC 19120  | <i>Mc. luteus</i> ATCC 272           |   |  |                           |
| <i>Cl. sporogenes</i> ATCC 19404                                     | <i>L. innocua</i> HW 13   | <i>Pc. acidilactici</i> UL5          |   |  |                           |
| <i>Cl. tyrobutyricum</i> ATCC 25755                                  | <i>L. ivanovii</i> HW 28  | <i>S. aureus</i> ATCC 25923          |   |  |                           |
| <i>Ec. faecalis</i> ATCC 27275                                       | <i>L. murrayi</i> ATCC 25401  |                                      |   |  |                           |
| <i>G. stearothermophilus</i> CRSTL                                   | <i>L. seeligeri</i> ATCC 35967  |                                      |   |  |                           |
| Inhibavo:  | <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>E. coli</i> , <i>Ec. Faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Sh. boydii</i> , <i>Sh. shiga</i> , <i>P. aeruginosa</i> |                                      |   | <i>Lc. lactis</i> kamienas iš jūrinės aplinkos                                     | Rajaram ir kt. (2010)     |
| Inhibavo:  | <i>P. aeruginosa</i> PTCC 1430  | <i>S. aureus</i> ATCC 64542          | Neinhibavo:   | <i>Lc. lactis</i> iš sūrio   | Rezapour ir kt. (2015)    |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 1156   | <i>Pr. vulgaris</i> ATCC 1312   | <i>St. faecalis</i> PTCC 1237        | <i>B. cereus</i> ATCC 1015  |  |                           |

|  |   |  |   |  |   |   |
|--|---|--|---|--|---|---|
| Inhibavo:<br><i>Car. piscicola</i> CECT 4020<br><i>Ec. faecium</i> CECT 410, CECT 964<br><i>Ec. hirae</i> CECT 279<br><i>L. monocytogenes</i> ES<br><i>Le. mesenteroides ssp. mesenteroides</i> CECT 4046  |   | <i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> CECT 277<br><i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 1106<br><i>Lb. fermentum</i> CECT 285, CECT 4007<br><i>Lb. helveticus</i> CECT 404, CECT 541, CECT 800, CECT 402<br><i>Lb. curvatus</i> CECT 904<br><i>Lb. plantarum</i> CECT 229, CECT 4044  |   |  | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br>CECT 539  | Guerra ir kt. (2013)  |
| Inhibavo:<br><i>Ae. hydrophila</i> ATCC 49140<br><i>E. coli</i> ATCC 25922   | <i>Ed. tarda</i> BCRC 16703<br><i>K. pneumonia</i> ATCC 10031<br><i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145  | <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525<br><i>Sr. marcescens</i>  |   |  | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br>CF4MRS iš žuvų<br>žarnyno                                   | Loh ir kt. (2017)   |
| Inhibavo:<br><i>B. cereus</i> LMG 14579<br><i>L. monocytogenes</i> LMG 10470   | <i>Lb. plantarum</i> UG1<br><i>Lb. casei</i> LMG 8152<br><i>Lb. alimentarius</i> HL2  | <i>Lc. lactis</i> LIM-MG1614<br><i>S. aureus</i> DSM 1104<br>Neaktyvus prieš Gram-   |   |  | <i>Lc. lactis</i> Z <sub>11</sub> iš<br>arabiško jogurto  | Enan (2013)   |
| Inhibavo:<br><i>B. cereus</i> IFRPD 2037, ATCC 11778<br><i>B. pumilus</i> TISTR 061<br><i>B. subtilis</i> A-48<br><i>Lb. plantarum</i> TISTR 850<br><i>Lb. sake</i> TISTR 911<br><i>Lb. pentosus</i> LP-711<br><i>Lb. curvatus</i> ATCC 25601  | <i>Lactobacillus sp.</i> A28<br><i>L. monocytogenes</i> IFRPD 2068, DMST 7995, DMST 2871<br><i>L. inocua</i> IFRPD 2071<br><i>Mc. luteus</i> TISTR 884<br><i>Pc. acidilactici</i> ATCC 8081<br><i>Pc. pentosaceus</i> TISTR 374<br><i>Pr. freudenreichii</i> TISTR 446  | <i>Ec. faecalis</i> TISTR 927<br><i>Ec. faecium</i> TISTR 928<br><i>S. aureus</i> TISTR 118, IFRPD 2034<br><i>Cl. butyricum</i> A-4<br><i>Cl. perfringens</i> DMST 11147<br><i>Le. cremoris</i> ATCC 19254<br><i>Le. mesenteroides</i> ATCC 10830<br>Neaktyvus prieš <i>Salmonella</i> ir <i>E. coli</i>                                       |   |  | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br>WNC 20 ir<br><i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br>DL11 | Noonpakdee ir kt.<br>(2003)   |
| Inhibavo:<br><i>Al. faecalis</i> 82<br><i>As. niger</i> 369  | <i>B. coagulans</i> 429<br><i>B. mycoides</i> 32<br><i>B. subtilis</i> 2  | <i>C. guilliermondii</i> 17<br><i>E. coli</i> 52<br><i>F. oxysporum</i> 81   | <i>Mc. luteus</i> 128<br><i>Pr. vulgaris</i> 206<br><i>P. aeruginosa</i> 54 | <i>Pn. chryzogenum</i> 37<br><i>Rh. aurantiaca</i> 226<br><i>S. aureus</i> 144 |   | <i>Lc. lactis</i> subsp.<br><i>Lactis</i> kamienai<br>Nuryshev ir kt.<br>(2016) |
| Inhibavo:<br><i>Lb. brevis</i> ATCC 14869, ATCC 13648, <i>Lb. lactis</i><br><i>Lb. casei</i> ATCC 4646<br><i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014, ATCC 14917<br><i>Lb. rhamnosus</i> IFO 3425<br><i>Lb. sake</i> ATCC 15521<br><i>Lc. cremoris</i> ATCC 19254<br><i>Lc. dextranicum</i> ATCC 8086<br><i>Lc. lactis</i> IFO 12455 | <i>B. cereus</i> ATCC 9372<br><i>B. subtilis</i> ATCC 13061<br><i>Car. divergens</i> ATCC 35677<br><i>Car. piscicola</i> ATCC 43225<br><i>Ec. faecium</i> IFO 3128<br><i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313<br><i>Le. carnosum</i> ATCC 49367<br><i>Le. mesenteroides</i> ATCC 9135, ATCC 10830<br><i>Le. pseudomesenteroides</i> ATCC 12291<br><i>Mc. luteus</i> ATCC 10240 | <i>Pc. acidilactici</i> ATCC 8081, ATCC 8042<br><i>Pc. dextranicus</i> ATCC 33087<br><i>Pc. parvulus</i> ATCC 19371<br><i>Pc. pentosaceus</i> ATCC 10791, ATCC 43200<br><i>Pro. acnes</i> ATCC 6919<br><i>S. aureus</i> ATCC 12600<br><i>Sl. typhimurium</i> IFO 12529<br><i>W. confusa</i> IFO 3958<br><i>W. paramesenteroides</i> ATCC 33313 |   |  | <i>Lc. lactis</i> subsp.<br><i>lactis</i> A164 ir ATCC<br>11454                                       | Choi ir kt. (2000)  |

|                     |                         |                          |  |   |                      |
|---------------------|-------------------------|--------------------------|--|---|----------------------|
| Inhibavo:           | <i>L. monocytogenes</i> | <i>Lb. acidophilus</i>   | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>                         |   |                      |
| <i>B. cereus</i>    | <i>L. innocua</i>       | <i>Lb. casei</i>         | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>                           |   |                      |
| <i>B. subtilis</i>  | <i>L. ivanovii</i>      | <i>Lb. bulgaricus</i>    | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i><br>kamieniai | Moreno ir kt. (2000) |
| <i>Ec. faecalis</i> | <i>L. murayi</i>        | <i>Lb. plantarum</i>     | <i>Pc. pentosaceus</i>   |   |                      |
| <i>Ec. faecium</i>  | <i>L. seeligeri</i>     | <i>Le. mesenteroides</i> | Neaktyvus prieš Gram-  |   |                      |
| <i>S. aureus</i>    | <i>L. weshimeri</i>     |                          |  |   |                      |

**Lactobacillus acidophilus** kamienų antibakteriniai spektrai

| Tirti mikroorganizmai* ir poveikis jiems                  |   |   |   | Aktyvus kamienas   | Literatūros šaltinis                            |
|---|---|---|---|--|---|
| Inhibavo:<br><i>B. subtilis, E. coli, S. aureus</i>       |   |   |   | <i>Lb. acidophilus</i> DSMZ<br>20079   | Abdelsamei ir kt. (2015);<br>Saad ir kt. (2015) |
| Inhibavo:   |   | <i>Sh. flexneri</i> ATCC 29903, CCM 4422                  |   | <i>Lb. acidophilus</i> DSM<br>20079 (ATCC 4356) ir<br><i>Lb. acidophilus</i> la5 | Bassyouni ir kt.<br>(2015)                      |
| Enterotoksigeninė <i>E. coli</i> (ETEC) ATCC 25922        |   | <i>S. aureus</i> ATCC 13565                               |   |  |   |
| Enterohemoraginė <i>E. coli</i> O157:H7 (EHEC) ATCC 51659 |   | <i>Sl. typhimurium</i> ATCC 25566                         |   |  |   |
| Inhibavo:   |   | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DSM 20080 |   | <i>Lb. acidophilus</i> DSM<br>20079  | Deraz ir kt. (2005)                             |
| <i>Lb. sakei</i> NCDO 2714                                | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 20076 |   |   |  |   |
| Inhibavo:   |   | <i>E. coli</i> O157:H7 CIP 103571                         | <i>L. monocytogenes</i> CIP 82.110T                                 | <i>Lb. acidophilus</i> R0240   | Grimoud ir kt. (2010)                           |
| <i>Cam. jejuni</i> CIP 70.2T                              | <i>Ec. faecalis</i> CIP 106996                        |   | <i>S. enterica</i> spp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium CIP 60.62T |  |   |
| <i>Cl. difficile</i> CIP 104282                           | <i>C. albicans</i> UMIP 884.65                        |   |   |  |   |
| Inhibavo:   |   | <i>L. monocytogenes</i> EGD                               | <i>Sl. typhimurium</i> SL 1344, C5                                  | <i>Lb. acidophilus</i> LA1   | Bernet-Camard ir kt.<br>(1997)                  |
| <i>En. cloacae</i> (klin.)                                | <i>P. aeruginosa</i> (klin.)                          |   | <i>Sh. flexneri</i> FL5M 90T  |  |   |
| <i>K. pneumonia</i> (klin.)                               | <i>S. aureus</i> , D grupė (klin.)                    |   |   |  |   |
| Inhibavo:   |   | Nainhibavo:   | <i>L. monocytogenes</i>   | <i>Lb. acidophilus</i> JCM<br>1132   | Tahara ir kt. (1996)                            |
| <i>Lb. acidophilus</i>                                    | <i>Lactococcus</i> spp.                               |   | <i>Bacillus</i> spp.  |  |   |
| <i>Lb. casei</i>  | <i>Pediococcus</i> spp.                               |   | <i>Propionibacterium</i> spp.                                       |  |   |
| <i>Lb. fermentum</i>                                      | <i>Streptococcus</i> spp.                             |   | <i>Staphylococcus</i> spp.  |  |   |
| <i>Lb. plantarum</i>                                      |   |   | <i>Tetragenococcus</i> spp.   |  |   |
| Inhibavo: MRSA <i>S. aureus</i> ATCC 43300                |   |   |   | <i>Lb. acidophilus</i> CL1285  | Karska-Wysocki ir kt.<br>(2010)                 |
| Inhibavo:   |   | <i>Lb. casei</i>  | <i>Ec. faecalis</i>   | <i>Lb. acidophilus</i> TK9201  | Kanatani ir kt. (1995)                          |
| <i>Lb. acidophilus</i>                                    | <i>Lb. fermentum</i>                                  | <i>L. monocytogenes</i>                                   | <i>St. bovis</i>  |  |   |
| <i>Lb. brevis</i>   | <i>Lb. plantarum</i>                                  | <i>Pc. pentosaceus</i>                                    | <i>S. lactis</i>  |  |   |
|   |   | <i>Pc. halophilus</i>                                     | <i>S. thermophilus</i>  |  |   |
|   |   |   | <i>Propionibacterium</i> sp.  |  |   |
| Neinhibavo:   |   |   |   | <i>B. subtilis</i>   |   |
|   |   |   |   | <i>Pc. acidilactici</i>  |   |
|   |   |   |   | <i>S. aureus</i>   |   |

|  |  |   |  |  |                                |
|--|--|---|--|--|--------------------------------|
| Inhibavo:<br><i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>Proteus</i> sp.   |  |   |  | <i>Lb. acidophilus</i> kamienai I ir II                | Lonkar ir kt. (2005)           |
| Inhibavo:<br><i>Sl. enteritidis</i> IMM 2  | Enterotoksigeninė <i>E. coli</i> ATCC 35401<br>Uropatogeninė <i>E. coli</i> ATCC 25922   |   |  | <i>Lb. acidophilus</i> B21070                          | Drago ir kt. (1997)            |
| Inhibavo:<br><i>B. cereus</i> ATCC1 11778<br><i>B. subtilis</i> 1A650, 1A651<br><i>Lb. casei</i> Y2<br><i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797                            | <i>Lb. fermentum</i> ATCC 11931<br><i>Lb. plantarum</i><br><i>Leuconostoc</i> sp. K2<br><i>L. ivanovii</i><br><i>S. aureus</i> | Neinhibavo:<br><i>Lb. acidophilus</i> ATCC 43121<br><i>Lb. helveticus</i> 1213<br><i>Lc. lactis</i> ATCC 1145<br><i>Lactococcus</i> sp. CU216 | <i>L. innocua</i><br><i>L. monocytogenes</i><br><i>St. faecalis</i><br>Visų naudotų Gram-<br>bakterijų | <i>Lb. acidophilus</i> 30SC                            | Oh ir kt. (2000)               |
| Inhibavo: Daugybinio atsparumo <i>P. aeruginosa</i> (klin.)  |  |   |  | <i>Lb. acidophilus</i> JFSH                            | Jamalifar ir kt. (2011)        |
| Inhibavo: <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Sl. Typhi</i> 2   |  |   |  | <i>Lb. acidophilus</i> NCIM5426                        | Maria ir<br>Janakiraman (2012) |
| Inhibavo: <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Sl. enterica</i>   |  |   |  | <i>Lb. acidophilus</i> C11                             | Wang ir kt. (2010)             |
| Inhibavo: <i>Sl. enterica</i> serovar Enteritidis SE86   |  |   |  | <i>Lb. acidophilus</i> LA10                            | Scapin ir kt. (2013)           |
| Inhibavo:<br><i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>S. aureus</i>   |  |   |  | <i>Lb. acidophilus</i> iš jogurto                      | Jebur (2010)                   |
| Inhibavo:<br><i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Salmonella</i> spp.   |  |   |  | <i>Lb. acidophilus</i> iš probiotinių<br>pašarų priedų | Lonkar ir kt. (2005)           |
| Inhibavo:<br><i>E. coli</i> ATCC 25922   | <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115<br><i>P. aeruginosa</i> ATCC 25923  | <i>S. aureus</i> ATCC 6538  |  | <i>Lb. acidophilus</i> iš pieno<br>produkto            | Mahmood ir kt.<br>(2014)       |
| Inhibavo:<br><i>Ae. hydrophila</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Pr. Vulgaris</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>St. pyogenes</i> |  |   |  | <i>Lb. acidophilus</i> izoliatai<br>iš jogurtų         | Abdulla (2014)                 |
| Inhibavo:<br><i>E. coli</i> ATCC 25922   | <i>En. aerogenes</i><br><i>Sl. Typhimurium</i> ATCC 13311  |   |  | <i>Lb. acidophilus</i> izoliatai<br>iš medaus          | Aween ir kt. (2012)            |
| Inhibavo:<br><i>B. subtilis</i> MTCC3053   | <i>E. coli</i> MTCC1674<br><i>Mc. luteus</i> MTCC4428  | <i>P. aeruginosa</i> MTCC4676<br><i>S. albus</i> MTCC7407   | <i>S. aureus</i> MTCC7405<br><i>St. pyogenes</i> MTCC 1926   | <i>Lb. acidophilus</i> iš išmatų                       | Bharal ir Sophal,<br>(2013)    |
| Inhibavo: <i>B. anthracis</i> , <i>E. coli</i> JM109, <i>S. aureus</i> ATCC6538  |  |   |  | <i>Lb. acidophilus</i> XH1                             | Zhao ir kt. (2015)             |

\*Genčių sutrumpinimai: *Ae.* – *Aeromonas*, *Al.* – *Alcaligenes*, *As* – *Aspergillus*, *B.* – *Bacillus*, *C.* – *Candida*, *Cam.* – *Campylobacter*, *Cit.* – *Citrobacter*, *Cl.* – *Clostridium*, *E.* – *Escherichia*, *Ec.* – *Enterococcus*, *Ed.* – *Edwardsiella*, *En.* – *Enterobacter*, *F.* – *Fusarium*, *K.* – *Klebsiella*, *L.* – *Listeria*, *Lb.* – *Lactobacillus*, *Lc.* – *Lactococcus*, *Le.* – *Leuconostoc.*, *Mc.* – *Micrococcus*, *P.* – *Pseudomonas*, *Pc.* – *Pediococcus*, *Pn.* – *Penicillium*, *Pr.* – *Proteus*, *Pro.* – *Propionibacterium*, *Ps.* – *Pasteurella*, *Rh.* – *Rhodotorula*, *S.* – *Staphylococcus*, *Sc.* – *Saccharomyces*, *Sh.* – *Shigella*, *Sl.* – *Salmonella*, *Sr.* – *Serratia*, *St.* – *Streptococcus*, *Y.* – *Yersinia*, *W.* – *Weissella*